

R-1307+ T 984

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA,**  
**BROMATOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA**

**ESTUDIO DE LA CALIDAD PROTEICA DE LA SEMILLA DE**  
**GARBANZO (*Cicer arietinum* L.) var. Athenas: OBTENCION DE**  
**AISLADOS E HIDROLIZADOS PROTEICOS**

11

302

02 MAR. 1998

Alfonso Clemente Gimeno

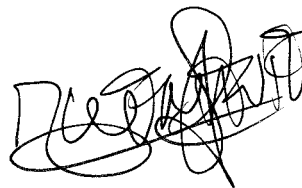
**MEMORIA que presenta**  
**el Ldo. ALFONSO CLEMENTE GIMENO para optar**  
**al grado de Doctor en Biología**

**Sevilla, Febrero 1998**

LBS 1178296

ESTUDIO DE LA CALIDAD PROTEICA DE LA SEMILLA  
DE GARBANZO (*CICER ARIETINUM* L.) VAR. *ATHENAS*:  
OBTENCION DE AISLADOS E HIDROLIZADOS  
PROTEICOS

Memoria presentada por el Licenciado  
Alfonso Clemente Gimeno para optar  
al grado de Doctor en Biología.



Sevilla, 1998.

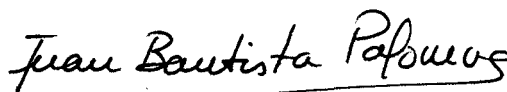
ESTUDIO DE LA CALIDAD PROTEICA DE LA SEMILLA  
DE GARBANZO (*CICER ARIETINUM* L.) VAR. *ATHENAS*:  
OBTENCION DE AISLADOS E HIDROLIZADOS  
PROTEICOS

VºBº

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.

## **CAPITULO 1**

---

## 1.INTRODUCCION GENERAL

### 1.1 INTRODUCCIÓN

El garbanzo, perteneciente a la familia Leguminoseae, constituye una fuente importante de proteínas en la alimentación humana. Su contenido proteico oscila en el intervalo 15-25 %, destacando, junto con otras leguminosas, por su elevado contenido en lisina. Dentro de las leguminosas, la semilla de garbanzo se caracteriza por su elevada calidad proteica, similar a la de soja.

El uso principal del garbanzo es el consumo directo mediante el procesado de las semillas, que puede ser realizado de muy diferentes formas, atendiendo a tradiciones culturales. Sin embargo, al menos el 20% de las semillas de garbanzo, no pueden ser utilizadas para el consumo doméstico, debido a diversas causas, principalmente, la rotura de la semilla, el tamaño excesivamente pequeño de las mismas, pérdidas postcosecha y almacenamiento inadecuado dando lugar al fenómeno denominado “hard to cook”. Las pérdidas postcosecha pueden ser reducidas mediante la aplicación de medidas apropiadas en la recogida del grano y su posterior almacenamiento, sin embargo, las pérdidas relacionadas con la rotura y tamaño de las semillas son difíciles de solucionar. En este sentido, una posible utilización de estas semillas, no aptas para consumo directo, es la preparación de productos de elevada calidad proteica, tales como aislados e hidrolizados proteicos.

En esta memoria se analizará la calidad de la semilla de garbanzo así como los cambios que se producen a lo largo del procesado doméstico, remojo y cocinado. Además, se caracterizarán aislados e hidrolizados proteicos obtenidos enzimáticamente, que podrían ser utilizados por parte de la industria alimentaria como ingredientes alimenticios, dada sus propiedades funcionales y su elevada calidad nutricional.

## 1.2 OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo es el estudio de la calidad proteica de la semilla de garbanzo, así como los cambios que se pueden producir en la misma a consecuencia de su utilización, bien mediante el procesado doméstico bien mediante la obtención de productos proteicos, tales como aislados e hidrolizados proteicos.

## 1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante los últimos años, el grupo de Proteínas Vegetales, ha dirigido sus estudios hacia el aprovechamiento de residuos agroindustriales. En colaboración con la empresa Koipesol Semillas S.A. se planteó el estudio de la calidad proteica de la semilla de garbanzo y la posible utilización de semillas no aptas para el consumo directo en la obtención de diferentes productos proteicos.

## 1.4 CONTENIDO DE LA MEMORIA

Dado el carácter amplio del estudio, esta memoria se presenta en capítulos separados de la siguiente forma:

En el **capítulo 2** se realiza una caracterización química de la semilla de garbanzo var. Athenas.

En el **capítulo 3** se caracterizan las proteínas de garbanzo y sus principales fracciones proteicas, albúminas y globulinas. En este capítulo quedan incluidos diferentes estudios relacionados con la calidad proteica de la semilla, que incluyen la caracterización química de las mismas y la presencia de factores antinutricionales que disminuyen su calidad, tales como polifenoles e inhibidores de las enzimas digestivas tripsina y quimotripsina. Asimismo, se discuten qué factores son los responsables de la baja digestibilidad proteica de la semilla de garbanzo.

---

En el **capítulo 4** se describe la presencia en las semilla de garbanzo de proteínas con propiedades antigénicas, de naturaleza termorresistente. Además, se realizan estudios relacionados con el fenómeno de alergenicidad cruzada existente entre distintas especies de leguminosas.

En el **capítulo 5** se estudia el efecto del procesado doméstico, remojo y cocinado, sobre la calidad proteica de la semilla. Se discuten los cambios ocurridos en la composición la composición aminoacídica de la semilla, digestibilidad y solubilidad proteica.

En el **capítulo 6** se caracteriza el aislado proteico de garbanzo obtenido mediante precipitación isoeléctrica, desde el punto de vista de las propiedades funcionales y composición química.

En el **capítulo 7** se describe la obtención de hidrolizados proteicos obtenidos enzimáticamente en un sistema discontinuo a partir de aislados proteicos de garbanzo. Se incluye la optimización del proceso hidrolítico y caracterización química de los hidrolizados obtenidos a partir de la acción enzimática de exo- y/o endoproteasas. Además, se evalúa la pérdida de alergenicidad de las proteínas de garbanzo a consecuencia del proceso hidrolítico.

En el **anexo 1** se presentan las gráficas correspondientes a las curvas de calibrado de los diferentes procedimientos analíticos utilizados.

## **CAPITULO 2**



## 2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA SEMILLA DE GARBANZO

### 2.1 INTRODUCCIÓN

Las leguminosas constituyen una de las familias botánicas más importantes desde el punto de vista económico, siendo un recurso nutricional esencial en la dieta de numerosos países en desarrollo. Las legumbres pueden ser divididas en dos grupos: (a) aquellas que presentan un elevado contenido lipídico y (b) aquellas que tienen al almidón como componente energético de almacenamiento. Al primer grupo pertenecen, entre otras, la soja, el cacahuete y el altramuz, mientras que habas, guisantes, lentejas y judías forman parte del segundo grupo. En este segundo grupo, el garbanzo puede ser considerado una excepción debido a su contenido lipídico relativamente alto (Gueguen, 1983) (Tabla 1).

Tabla 1. Composición bioquímica de las principales leguminosas<sup>a</sup>

Leguminosa	Proteína (Nx6.25)	Grasa	Carbohidratos
<b>Haba<sup>b</sup></b> ( <i>Vicia faba</i> )	27-35	1-2	50-62
<b>Guisante<sup>b</sup></b> ( <i>Pisum sativum</i> )	22-29	1-2	46-50
<b>Lenteja<sup>c</sup></b> ( <i>Lens culinaris</i> )	20-31	1-2	35-53
<b>Judía<sup>c</sup></b> ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	20-30	1-2	30-50
<b>Garbanzo<sup>d,e</sup></b> ( <i>Cicer arietinum</i> )	12-31	3-7	31-57
<b>Altramuz<sup>b</sup></b> ( <i>Lupinus albus</i> )	27-46	11-15	20-45
<b>Soja<sup>b</sup></b> ( <i>Glycine max</i> )	30-40	26-29	26-29
<b>Cacahuete<sup>b</sup></b> ( <i>Arachis hypogaea</i> )	27-30	49-53	15-18

<sup>a</sup>Los resultados están expresados en % de materia seca.

<sup>b</sup>Bioven y Bertrand (1985)

<sup>c</sup>Hulse (1992)

<sup>d</sup>Chavan *et al.* (1986).

<sup>e</sup>Saini y Knights (1984)

El garbanzo es una de las leguminosas de grano más importantes a nivel mundial, desde el punto de vista de producción y superficie de cultivo, con un rendimiento medio de 750 Kg/Ha (Tabla 2). Su área de cultivo comprende zonas situadas entre los 15° y los 40° de latitud norte, sometida a muy diferentes regímenes termo- y fotoperiódicos. La superficie mundial de cultivo supera los 10 millones de hectáreas, de las cuales más del 70% se concentran en la India. Otras áreas productoras importante son la región mediterránea, Méjico, Pakistán, Turquía, Irán, Burma, Tanzania y Etiopía. De las leguminosas grano que se cultivan en España, las más importantes son, y por este orden, garbanzos, habas y lentejas. Sin embargo, a pesar de ser la leguminosa más cultivada en España, se importa el 40% de los garbanzos que se consumen, principalmente de Méjico (Ponz *et al.*, 1992).

**Tabla 2 .** Áreas de cultivo y producción, a nivel mundial, de las principales leguminosas (FAO, 1986).

<b>Leguminosa</b>	<b>Area de cultivo (10<sup>3</sup> ha)</b>	<b>Producción (10<sup>3</sup> Tm)</b>
<b>Soja</b>	52103	95521
<b>Cacahuete</b>	19681	21512
<b>Judía</b>	26207	14750
<b>Guisante</b>	9586	14313
<b>Garbanzo</b>	10456	7842
<b>Haba</b>	3182	4291
<b>Lenteja</b>	2882	2284

El garbanzo puede ser clasificado en dos tipos básicos, desi y kabuli, que corresponden fundamentalmente a diferencias en el tamaño, forma y coloración de las semillas. Las semillas de tipo desi son de color oscuro, pequeñas y presentan la superficie rugosa; en cambio, las semillas de tipo kabuli, son de mayor tamaño, redondeadas y de color crema. El garbanzo kabuli se cultiva preferentemente en la región mediterránea,

---

América Central y América del Sur mientras que el garbanzo desi predomina en el subcontinente indio y este de Africa, representando el 85% de la producción mundial. Sin embargo, las dos terceras partes de países productores, incluido España, cultivan exclusivamente el tipo kabuli.

### 2.1.1 Composición nutricional

La importancia nutricional del garbanzo y su utilización como dieta básica en numerosos países ha supuesto que se hayan llevado a cabo numerosos estudios relativos a su composición (Singh, 1985; Chavan *et al.*, 1986). De manera general, podemos afirmar que el garbanzo es una fuente importante de carbohidratos y proteínas, constituyendo cerca del 80 % del peso seco de la semilla. Sin embargo, su aceptabilidad se encuentra afectada por la presencia de determinados factores antinutricionales.

El almidón es el principal componente de la semilla de garbanzo (30-50%) (Shohana *et al.*, 1976). Este alto contenido en almidón pone de manifiesto su gran aptitud como fuente de energía, debido a la liberación de unidades de glucosa por acción de la enzima  $\alpha$ -amilasa. Sin embargo, su biodisponibilidad, determinada tanto por procedimientos *in vivo* como *in vitro*, es inferior a la obtenida en otras leguminosas, pudiendo ser debido a su reducida capacidad de interacción con las enzimas hidrolíticas y/o presencia de inhibidores de la enzima  $\alpha$ -amilasa (Singh *et al.*, 1982; Geervani y Theophilus, 1981; Shurpalekar *et al.*, 1979; Rao, 1976), así como de polifenoles y fitatos (Thompson y Yoon, 1984).

El contenido proteico de las semillas de garbanzo es muy variable (14-30%) y está determinado tanto por factores genéticos como medioambientales (Singh y Jambunathan, 1980). Recientemente, Singh *et al.* (1988) han caracterizado las diferentes fracciones proteicas del garbanzo, mostrando a las globulinas, proteínas de almacenamiento, como la fracción más abundante en los cotiledones. Las albúminas se encuentran constituidas principalmente por enzimas y factores antinutricionales, jugando un importante papel biológico en las semillas del garbanzo. Como otras leguminosas, el perfil de aminoácidos se

---

caracteriza por una baja concentración de aminoácidos azufrados, metionina y cisteína, y una relativamente alta concentración de lisina.

El contenido de fibra en la semilla de garbanzo es elevado (5-19%), superior al encontrado en otras leguminosas (Khan *et al.*, 1979), siendo sus componentes mayoritarios la celulosa y la hemicelulosa. La fibra del garbanzo se encuentra localizada fundamentalmente en su cubierta seminal, constituyendo el 80% de la fibra total del grano. Como consecuencia de este hecho, Jambunathan y Singh (1979) encontraron importantes diferencias en el contenido en fibra de los tipos desi y kabuli, debido al mayor grosor y cantidad de cubierta seminal del tipo desi. Por otro lado, se ha estudiado la importancia de la fibra de garbanzo como agente hipocolesterolémico tras su consumo, observándose una mayor reducción del colesterol en sangre respecto al obtenido para otras leguminosas (Singh *et al.*, 1983). Estas observaciones sugieren que la fibra de la cubierta de la semilla de garbanzo pudiera ser utilizada en tratamientos de arterioesclerosis, aunque es necesario realizar investigaciones adicionales al respecto (Chavan *et al.*, 1986).

El contenido de lípidos totales de la semilla de garbanzo se encuentra dentro del intervalo 3-8%. Estos lípidos constituyen un grupo heterogéneo que incluyen ácidos grasos, mono-, di- y triglicéridos, fosfolípidos, esteroides, glucolípidos y lipoproteínas. Los principales ácidos grasos son linoleico, oleico y palmítico. Los triglicéridos constituyen los lípidos neutros más abundantes, mientras que la lecitina es el principal componente de los lípidos polares (Ghirardi *et al.*, 1974; Ling y Robinson, 1976; Sánchez-Vioque, 1997). Estudios realizados *in vivo* con ratas parecen demostrar que los ácidos grasos esenciales presentes en las leguminosas, principalmente linoleico y linolénico, disminuyen el nivel de colesterol en sangre (Murthy y Urs, 1985). Por otro lado, los lípidos de garbanzo, aunque minoritarios desde el punto de vista cuantitativo, son importantes ya que pueden interactuar con proteínas, aminoácidos, almidón, vitaminas y minerales durante el almacenamiento y procesado de las semillas, reduciendo la biodisponibilidad de dichos compuestos. La presencia de apreciables cantidades de ácidos grasos poliinsaturados, aunque nutricionalmente ventajoso, puede contribuir esencialmente a la oxidación lipídica y producir procesos tales como la polimerización de proteínas, pardeamiento no enzimático y modificaciones en las propiedades funcionales de las proteínas (Roubal y Tappel, 1966).

---

La semilla de garbanzo es rica en minerales, siendo una buena fuente de calcio, fósforo, magnesio, hierro y potasio. El calcio se encuentra de manera mayoritaria en la cubierta de la semilla y la biodisponibilidad de hierro es elevada (91%), superior a otras leguminosas (Cowan *et al.*, 1967). La información sobre el contenido de vitaminas en la semilla de garbanzo es escasa, destacando el contenido en ácido ascórbico (Chandra y Arora, 1968).

### 2.1.2 Factores antinutricionales

El garbanzo, al igual que otras leguminosas, contiene diversas sustancias que afectan a su calidad nutricional, agrupadas bajo el nombre de factores antinutricionales (Liener, 1976). Estas sustancias han sido objeto de estudio por numerosos investigadores ya que hacen decrecer el valor nutritivo de las semillas. En el garbanzo debemos destacar la presencia de inhibidores de proteasas y amilasas, oligosacáridos, polifenoles y otros compuestos, tales como lectinas y fitatos.

Son numerosos los trabajos científicos relacionados con la presencia, función fisiológica, caracterización y mecanismos de acción de los inhibidores de proteasas presentes en distintas especies vegetales, incluidas las leguminosas (Liener, 1976; Richardson, 1977; Laskowski y Kato, 1980; Richardson, 1991). La presencia de estos inhibidores en las semillas de garbanzo provoca una disminución de la digestibilidad proteica. Existen datos contradictorios respecto al contenido de inhibidores de tripsina en la semilla de garbanzo, observándose una gran variabilidad entre los diferentes cultivos estudiados (Smirnoff *et al.*, 1976; Chavan y Hejgaard, 1981). La termoestabilidad de los inhibidores de proteasas en las semillas de garbanzo ha acaparado la atención de numerosos investigadores en los últimos años, ya que se observan descensos no superiores al 50% de la actividad inhibidora de tripsina tras el proceso de cocinado, disminuyendo, por tanto, la biodisponibilidad de los distintos aminoácidos esenciales (Sotelo *et al.*, 1987; Attia *et al.*, 1994).

---

En los últimos años, se ha puesto de manifiesto el importante papel, desde el punto de vista nutricional, de los inhibidores de amilasas. Sin embargo, la semilla de garbanzo parece mostrar bajos contenidos de estos inhibidores respecto a otras legumbres y, a diferencia de los inhibidores proteolíticos, pueden ser fácilmente inactivados mediante tratamiento térmico a 100 °C durante 10 minutos (Singh *et al.*, 1982). Por lo tanto, los inhibidores de amilasas no presentan este carácter antinutricional cuando las semillas son procesadas térmicamente.

La semilla de garbanzo muestra un importante contenido de oligosacáridos de la familia rafinosa ( $\alpha$ -galactósidos de sacarosa), siendo estaquiosa y rafinosa los más abundantes (Saini y Knights, 1984). Estos oligosacáridos son responsables del fenómeno de la flatulencia, dado que su digestión completa requiere la presencia de dos enzimas, invertasa y  $\alpha$ -galactosidasa, estando ausente esta última en el tracto gastrointestinal humano. Debido a ello, tiene lugar un proceso de fermentación microbiana de los mismos en el intestino grueso, con la consiguiente formación de metano, dióxido de carbono e hidrógeno (Rackis, 1975; Aman, 1979; Iyengar y Kulkarni, 1977; Reddy *et al.*, 1980). De esta forma, los oligosacáridos constituyen un factor limitante en la utilización de las legumbres de grano para monogástricos. La producción de gas parece ser mayor en el garbanzo que en otras legumbres, pudiendo ser debido a su mayor contenido en oligosacáridos (Jaya *et al.*, 1979), aunque existe una gran variabilidad del mismo entre diferentes cultivos (Singh *et al.*, 1982). Recientemente se ha insinuado la posibilidad de que la hemicelulosa esté también implicada en el fenómeno de la flatulencia.

En la semilla de garbanzo los compuestos polifenólicos se encuentran localizados preferentemente en la cubierta seminal. Estos compuestos juegan un importante papel en la digestibilidad de proteínas y carbohidratos de leguminosas, ya que inhiben la acción de varias enzimas digestivas, tanto de proteasas como  $\alpha$ -amilasas (Singh y Jambunathan, 1981; Singh, 1984; Thompson y Yoon, 1984), y dificultan la absorción mineral (Roy y Mukherjee, 1979). Además, otros autores también asocian la presencia de estos compuestos al fenómeno del endurecimiento de las semillas debido a la formación de

complejos de tipo proteína-fenol y almidón-fenol (Hincks y Stanley, 1986; Srisuma *et al.*, 1989).

Otros factores antinutricionales presentes en la semilla de garbanzo son el ácido fítico, saponinas y lectinas. El ácido fítico, ampliamente distribuido entre cereales y legumbres, es una molécula de almacenamiento de fósforo en el grano, no siendo digerida por nuestro organismo. Además, el ácido fítico disminuye la biodisponibilidad de los minerales (Nolan y Duffin, 1987) e inhibe las enzimas proteolíticas (Serraino *et al.*, 1985) y amilolíticas (Yoon *et al.*, 1983; Desphande y Cheryan, 1984). Sin embargo, los niveles de ácido fítico encontrados en la semilla de garbanzo (0.7-0.8%) disminuyen de manera muy significativa durante el procesado de las mismas (Duhan *et al.*, 1989). Las saponinas, presentes en cantidades importantes en la semilla de garbanzo (3-4%), dan amargor a los alimentos, pudiendo causar alteraciones fisiológicas al organismo humano (Jood *et al.*, 1986). Sin embargo, parecen reducir el nivel de colesterol plasmático, disminuyendo, por tanto, el riesgo de enfermedades cardíacas (Cheeke, 1976; Oakenfull *et al.*, 1979). Algunas leguminosas contienen lectinas. Éstas son proteínas que interactúan con las glicoproteínas de la superficie de los eritrocitos, causando la aglutinación de células (Liener, 1979). La actividad hemaglutinante de las semillas de garbanzo es muy escasa, descendiendo de manera significativa tras el procesado de las mismas (Bansal *et al.*, 1988).

## 2.2 MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.2.1 Material.

Las semillas de garbanzo utilizadas en este estudio pertenecen a la variedad Athenas, dentro del tipo kabuli. Estas han sido cultivadas en las plantaciones experimentales de Koipesol Semillas, en el término municipal de Carmona (Sevilla). D-fructosa, D-glucosa, sacarosa, <sup>14</sup>C-sacarosa, rafinosa y estaquiosa fueron proporcionadas por Sigma (St.Louis, MO, USA).

### 2.2.2 Obtención de harina

Las semillas de garbanzo fueron trituradas con un molinillo doméstico, previa eliminación de semillas rotas y materiales extraños. La harina resultante fue tamizada por  $\mu\text{m}$  y, posteriormente, desengrasada mediante un sistema soxhlet con hexano durante 12 horas a temperatura ambiente, y almacenada en botellas herméticamente cerradas.

### 2.2.3 Determinación de almidón.

La determinación de almidón se realizó utilizando un desarrollo enzimático-colorimétrico, que consta de los siguientes pasos: eliminación previa de mono-, di- y oligosacáridos mediante extracción etanólica, solubilización de la muestra mediante la adición de dimetilsulfóxido y posterior incubación a 60 °C durante 30 minutos, sucesivas digestiones con las enzimas amiloglucosidasa, hexoquinasa y glucosa 6P dehidrogenasa, y posterior determinación de glucosa libre mediante espectrofotometría (Boehringer Lab., 1980).

La eliminación de los azúcares solubles de la muestra (400 mg) se realizó mediante extracción etanólica (etanol 80%, 10 ml, 60 °C), repitiéndose el proceso dos veces. La solubilización de la muestra se llevó a cabo mediante la adición de 20 ml de dimetilsulfóxido y 5 ml de HCl 8M, y posterior incubación durante 30 minutos a 60 °C. La solución resultante se dejó enfriar, se ajustó el pH (4-5) con NaOH 5 M y se enrasó a 100 ml. Se utilizaron alícuotas (0.1 ml) para la determinación de glucosa libre tras sucesivas incubaciones enzimáticas: 1) amiloglucosidasa (3U, 15 minutos, 55 °C), y 2) hexoquinasa y glucosa 6P dehidrogenasa (3 y 1.5 U, respectivamente), previa adición de NADP<sup>+</sup> y ATP. La absorbancia de las muestras se midió a 365 nm.

### 2.2.4 Determinación de nitrógeno.

La determinación de nitrógeno total (NT) se realizó mediante el método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1975), a partir de 0.1 g de muestra. La determinación de nitrógeno no proteico se realizó mediante extracción con etanol 70% (Bhatty, 1973). Para ello, la harina fue extraída en una



proporción 1:40 (p:v). Se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y se centrifugó a 4000xg durante 10 minutos, midiéndose en el sobrenadante el contenido en nitrógeno no proteico.

### 2.2.5 Determinación de proteína.

El contenido proteico se calculó mediante el método de Kjeldalh, multiplicando el contenido en nitrógeno proteico por el factor 6.25. Además, la determinación del contenido proteico de las muestras se realizó mediante el método de Biuret (1954), utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón para la obtención de la curva de calibrado (Anexo 1, Figura 1).

### 2.2.6 Azúcares solubles.

El proceso de extracción, separación y cuantificación de azúcares solubles mediante cromatografía líquida de la semilla de garbanzo se muestra, de manera esquemática, en la figura 2.1, y consta de las siguientes etapas:

**1) Extracto etanólico.** El análisis del contenido de azúcares totales de la semilla de garbanzo se llevó a cabo mediante la extracción de 10 gramos de harina desengrasada en 200 ml etanol 80%, en agitación durante 45 minutos, a 60 °C. Las extracciones se repitieron hasta que el extracto final mostró un test negativo para azúcares. Los extractos se reunieron, siendo el extracto etanólico obtenido filtrado a través de papel Whatman nº 1. El contenido de azúcares totales solubles se determinó colorimétricamente mediante el método de Dubois (1956), utilizando una recta patrón de glucosa (Anexo 1, Figura 2).

**2) Separación de productos hidrosolubles.** El extracto etanólico se evaporó en un horno a 60 ° C con el objeto de eliminar el etanol, disolviéndose el residuo seco en 5 ml de agua bidestilada. Los distintos productos hidrosolubles se separaron mediante cromatografía de intercambio iónico según el método de Redwell (1980). Para ello, se tomaron alícuotas de 1 ml, depositándose en la columna catiónica Sephadex SP-C-25 (Pharmacia), conectada en serie con la columna aniónica Sephadex QAE-A-25 (Pharmacia). La elución se realizó con 20 ml de agua destilada, con un flujo de 1.5 ml/min, recolectándose la fracción

correspondiente a azúcares. La eficacia del proceso se verificó con la utilización de  $^{14}\text{C}$ -sacarosa, siendo del 91.5%.

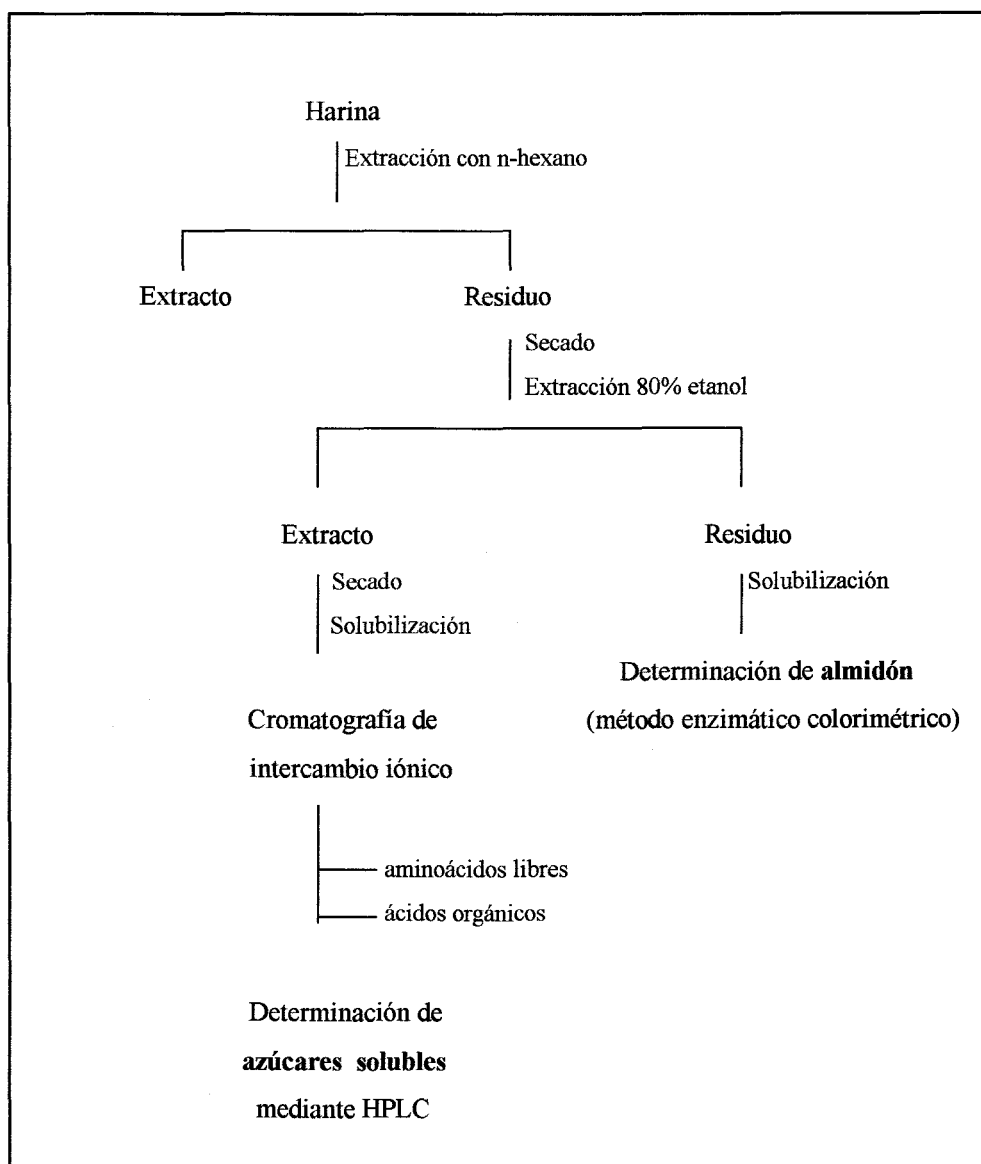
**3) Análisis de azúcares mediante cromatografía líquida.** El eluato se liofilizó, disolviéndose en 0.5 ml de agua bidestilada. Todas las muestras se filtraron a través de membranas de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (casa comercial). La determinación y cuantificación de los distintos azúcares presentes en la semilla de garbanzo se llevó a cabo mediante un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), equipado con un refractómetro Waters Millipore R-400. Las separaciones se realizaron en una columna Supercosil LC-NH<sub>2</sub> 250 x 4.6 D.I, 5  $\mu\text{m}$  (Supelco Inc., PA), utilizando un sistema isocrático acetonitrilo:agua (85:15) con un flujo de 1ml/min. La temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C mediante un controlador de temperatura (Water Associates, Milford, MA). La identificación de los distintos azúcares se realizó por comparación de los tiempos de retención de patrones. La cuantificación de los distintos azúcares se llevó a cabo mediante el análisis de áreas en comparación a curvas de calibrado realizadas para cada uno de ellos, obteniéndose linealidad en la respuesta para valores dentro del intervalo 10-80  $\mu\text{g}$  azúcar.

### 2.2.7 Determinación de fibra total.

El contenido en fibra total fue analizado de acuerdo al método enzimático-gravimétrico de Lee *et al.* (1992). 1 gr de muestra se dispersó en 40 ml de 50 mM Mes, 50 mM Tris, pH 8.2, sometiéndose a digestiones sucesivas con 50  $\mu\text{l}$  de una solución de  $\alpha$ -amilasa termoestable (15 min a 95 °C), 100  $\mu\text{l}$  de una solución de proteasa con una concentración de 50 mg/ml (30 min a 60 °C), y 300  $\mu\text{l}$  de una solución de amiloglucosidasa (30 min a 60 °C). Tras la digestión, las muestras fueron filtradas a través de filtros con tamaño de poro 40-60 $\mu\text{m}$ , siendo a continuación el residuo insoluble secado y pesado. Posteriormente, se determinó los contenidos de ceniza y proteína del residuo. De esta forma, el porcentaje de fibra total fue calculado utilizándose la siguiente fórmula:

$$\text{Fibra total (\%)} = \{ \text{residuo insoluble (g)} - \text{proteína (g)} - \text{ceniza (g)} \} / \text{muestra (g)} \times 100$$

Figura 2.1. Esquema del proceso analítico de almidón y azúcares solubles



### 2.2.8 Determinación de grasa, ceniza y humedad.

El contenido en grasa, ceniza y humedad se determinó de acuerdo a los métodos aprobados de la AOAC (1990).

### 2.2.9 Análisis de polifenoles

Se extrajeron 5 gramos de muestra durante 8 horas con 100 ml de 80% etanol en un sistema soxhlet. Tras la extracción, el volumen de etanol se redujo a 25 ml mediante

concentración en vacío a 40 °C. Las muestras se filtraron a través de papel Whatman n°1, utilizándose alícuotas para medir la absorbancia de las mismas a 324 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 64 (Fullerton, CA). Las cantidades de compuestos fenólicos se estimaron como equivalentes de ácido clorogénico (Moore *et al.*, 1948) (Anexo 1, Figura 3).

## 2.3 RESULTADOS Y DISCUSION

La composición química de la harina de garbanzo se muestra en la tabla 2.3, siendo el almidón y la fracción proteica sus constituyentes principales. La determinación del contenido de almidón de la semilla de garbanzo estuvo influida por su baja disponibilidad enzimática, ya que muestras sometidas a extracción etanólica a 60 °C mostraron contenidos de almidón superiores (40.2%) respecto a los observados en muestras extraídas a temperatura ambiente (34.1%). Tovar *et al.* (1990) en judía y, Sherma y Seghal (1991) en haba, obtuvieron resultados similares tras el cocinado de las semillas. Estudios posteriores parecen demostrar que esta baja disponibilidad puede ser debida a la propia estructura tisular del cotiledón y a la presencia de paredes celulares gruesas en las semillas de leguminosas, las cuales representan una barrera física para la digestión del almidón tanto *in vitro* (Tovar *et al.*, 1991) como *in vivo* (Tovar *et al.*, 1992), e incluso tras el proceso de cocinado (Asp y Björk, 1992).

El contenido proteico de la semilla de garbanzo var. Athenas (18.9%) se encuentra dentro del rango de valores observado en otras variedades. El contenido proteico de la semilla de garbanzo hace atractiva su utilización en alimentación humana y animal, bien por consumo directo bien tras la elaboración de productos proteicos elaborados, tales como aislados e hidrolizados proteicos.

La variedad Athenas mostró niveles elevados de fibra (10.4%) respecto a otras variedades estudiadas (Singh y Jambunathan, 1980), siendo este hecho destacable debido al papel hipocolesterolémico que parecen tener estos compuestos. Por otro lado, los niveles de

materia grasa observados en estas semillas se encuentran dentro de los valores mostrados en otras variedades y son superiores a los observados en leguminosas de grano tales como lentejas, judía, guisantes y habas. Dado que estos lípidos pueden interaccionar con las proteínas, reduciendo, por tanto, el valor biológico de las mismas, es recomendable el desengrasado de la harina en situaciones de almacenamiento o elaboración de productos proteicos.

**Tabla 2.3.** Composición química<sup>1</sup> de la harina de garbanzo var. Athenas.

Componentes	Contenido
<b>Almidón</b>	40.3±0.76
<b>Proteína</b>	18.8±0.27
<b>Fibra</b>	10.4±0.18
<b>Humedad</b>	8.1±0.04
<b>Azúcares solubles</b>	4.3±0.02
<b>Grasa</b>	4.1±0.03
<b>Ceniza</b>	3.4±0.02
<b>Polifenoles</b>	0.2±0.01
<b>Nitrógeno no proteico</b>	0.15±0.01

Cada valor es la media ±desviación estándar de tres determinaciones independientes. <sup>1</sup>Los resultados son expresados como gramos por 100 gramos de harina de garbanzo.

El contenido de azúcares solubles totales, expresado como cantidad de glucosa, de la semilla de garbanzo var. Athenas (5.3%), es similar al observado en otras variedades. En este sentido, Rao y Belavady (1978) obtuvieron valores cercanos al 5.0% en algunas variedades de garbanzo; sin embargo, Schweizer *et al* (1978) y, Saini y Knights (1984),

hallaron contenidos muy superiores, 6.7-8.4% y 10.4-13.2%, respectivamente. La gran variabilidad observada en el contenido de azúcares solubles de la semilla de garbanzo puede ser debido a diferencias entre variedades así como a la metodología de análisis y cuantificación utilizada, ya que parámetros tales como el tiempo y temperatura de extracción de azúcares, número de extracciones y medio de extracción parecen afectar al proceso (Saini, 1988; Nack *et al.*, 1992).

El contenido de azúcares solubles totales obtenido mediante el método del fenol-sulfúrico, aunque ligeramente superior, está en concordancia con la suma de las cantidades de los distintos azúcares analizados mediante cromatografía líquida (HPLC), e incluye a monosacáridos, principalmente glucosa y fructosa, sacarosa y los oligosacáridos rafinosa, estaquiosa y verbascosa; este último, aunque detectado, no fue cuantificado, al no disponerse comercialmente (Tabla 2.4). Los  $\alpha$ -galactósidos de sacarosa, reponsables del fenómeno de flatulencia, constituyeron el 59% de los azúcares solubles totales de la semilla, siendo estaquiosa el oligosacárido más abundante, al igual que ocurre en otras leguminosas, tales como soja, lenteja y judía (Abdel-Gawad, 1993). Respecto a otras variedades de garbanzo, la variedad Athenas mostró bajos niveles de oligosacáridos, siendo este hecho destacable por la importancia que presenta el fenómeno de la flatulencia en la aceptación de las semillas por parte del consumidor (Saini y Knights, 1984; Attia *et al.*, 1994).

**Tabla 2.4** Contenido<sup>a</sup> de azúcares solubles de la semilla de garbanzo

Azúcares solubles	Contenido (%)
<b>Glucosa</b>	0.02±10 <sup>-3</sup>
<b>Fructosa</b>	0.04±2x10 <sup>-3</sup>
<b>Sacarosa</b>	1.92±0.01
<b>Rafinosa</b>	0.61±0.03
<b>Estaquiosa</b>	2.23±0.11

<sup>a</sup>Contenido de azúcares, expresado como % en peso seco

Los datos son la media ± DS de tres determinaciones independientes.

El contenido de compuestos polifenólicos de la semilla de garbanzo (0.2%) es inferior al observado en otras leguminosas (Jood *et al.*, 1987). Estos compuestos, que pueden formar complejos con las proteínas, disminuye la digestibilidad de las mismas y dificulta la biodisponibilidad de los minerales presentes en los alimentos (Bressani y Elias, 1980). Por lo tanto, puede ser nutricionalmente efectiva su eliminación durante los procesos de obtención de aislados e hidrolizados proteicos.

## 2.4 BIBLIOGRAFÍA

Aman, P. 1979. Carbohydrates in raw and germinated seeds from mung bean and chickpea. *J Sci Food Agric* 30: 869-875.

Asp, N.G., Björk, I. 1992. Resistant starch. *Trends Food Sci Tech* 3: 111-113.

Attia, R.S.; El-Tabey Shehata, A.M.; Aman, M.E.; Hamza, M.A. 1994. Effect of cooking and decortication on the physical properties, the chemical composition and the nutritive value of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Food Chem* 50: 125-131.

Bansal, K.K.; Dhindsa, K.S.; Batra, V.I.P. 1988. Trypsin inhibitor and hemagglutinin activities in chickpea (*Cicer arietinum* L.): effects of heat and germination. *J Food Sci Technol* 25:46-48.

Chandra, S.; Arora, S.K. 1968. An estimation on protein, ascorbic acid and mineral matter content in some indigenous and exotic varieties of gram (*Cicer arietinum* L.). *Curr Sci* 37: 237-240

Chavan, J.K.; Hejgaard, J. 1981. Detection and partial characterization of subtilisin inhibitors in legume seeds by isoelectric focusing. *J Sci Food Agric* 32: 857-860.

Chavan, J.K.; Kadam, S.S.; Salunke, D.K. 1986. Biochemistry and technology of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 25: 107-158.

Cheeke, P.R. 1976. Nutritional and physiological properties of saponins. *Nutr Rep Int* 13: 315-324.

---

Cowan, J.W.; Esfahani, M.; Salji, J.P.; Nahapetian, A. 1967. Nutritive value of middle eastern foods. III. Physiological availability of iron in selected foods common to the middle east. *J Sci Food Agric* 18: 227-231.

Desphande, S.S.; Cheryan, M. 1984. Effects of phytic acid, divalent cations and their interactions on  $\alpha$ -amylase activity. *J Food Sci* 49: 516-521.

Duhan, A.; Chauchan, B.M.; Punia, D.; Kapoor, A.C. 1989. Phytic acid content of chickpea (*Cicer arietinum*) and black gram (*Vigna mungo*): varietal differences and effect of domestic processing and cooking methods. *J Sci Food Agric* 49: 449-455.

FAO 1986. FAO Yearbook production 1986. FAO, Roma, Italia.

Geervani, P.; Theophilus, F. 1981. *J Sci Food Agric* 32: 71-75.

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

Gueguen, J. 1983. Legume seed protein extraction, processing and end product characteristics. *Qual Plant Plant Foods Hum Nutr* 32: 267-303.

Hincks, H.J.; Stanley, D.W. 1986. *Food Technol* 21: 731-740.

Hulse, J. 1992. International Food Legume Research Conference II.

Iyengar, A.K.; Kulkarni, P.R. 1977. Oligosaccharide levels of processed legumes. *J Food Sci Technol* X: 222-223.

Jambunathan, R.; Singh, U. 1979. Studies on desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. Proc Int Workshop on chickpea. ICRISAT, Hyderabad, India, p61.

Jaya, T.V.; Naik, H.S.; Venkataraman, L.V. 1979. Effect of germinated legumes on the rate of in vitro gas production by *Clostridium perfringens*. *Nutr Rep Int* 20: 393-401.



- 
- Jood, S.; Chauchan, B.M.; Kapoor, A.C. 1986. Saponin content of chickpea and blackgram: varietal differences and effects of processing and cooking methods. *J Sci Food Agric* 37: 1121-1124.
- Jood, S.; Chauchan, B.M.; Kapoor, A.C. 1987. Polyphenols of chickpea and blackgram as affected by domestic processing and cooking methods. *J Sci Food Agric* 39: 145-149.
- Khan, M.A.; Jacobsen, I.; Eggum, B.O. 1979. Nutritive value of some improved varieties of legumes. *J Sci Food Agric* 30: 395-400.
- Laskowski, M.; Kato, I. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Ann Rev Biochem* 49: 593-599.
- Liener, I.E. 1976. A review: Legume toxins in relation to protein digestibilities. *J Food Sci* 41: 1076-1081.
- Liener, I.E. 1979. Protease inhibitors and lectins, en *Biochemistry of Nutrition*, Neuberger, A. y Jukes, T.H. Eds., University Park Press, Baltimore.
- Ling, L.Y.; Robinson, R.J. 1976. Extracting and fractionating lipids from chickpea. *Cer Food Chem* 21: 424-431.
- Murthy, K.S.; Urs, M.K. 1985. Effect of Bengal gram (*Cicer arietinum*) proteins and lipids on serum and liver cholesterol levels in rats. *J Food Sci Technol*. 22: 54-58.
- Naczki, M.; Myhara, R.M.; Shahidi, F. 1992. Effects of processing on the oligosaccharides of oilseed and legume protein meals. *Food Chem* 45: 193-197.
- Nolan, K.B.; Duffin, P.A. 1987. Effect of phytate on mineral bioavailability. *In vitro* studies on  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  solubilities in the presence of phytate. *J Sci Food Agric* 40: 79-83.
- Oakenfull, D.G.; Fenwick, D.E.; Hood, R.L.; Topping, D.L.; Illman, R.J.; Storer, G.B. Effect of saponins on bile acids and plasma lipids in the rat. *Br J Nutr* 42: 209-216.
- Ponz, R.; de la Rosa, L.; Varela, F. 1992. Evaluación de germoplasma de garbanzos. *Monografías INIA*, nº 83.

---

Rackis, J.J. 1975. Oligosaccharides of food legumes: alpha-galactosidase activity and the flatus problem. En "Physiological effects of food carbohydrates", de. Jeanes, A. y Hodge, J., p 207. Am Chem Soc., Washington, D.C.

Rao, P.S. 1976. Nature of carbohydrates in pulses. J Agric Food Chem 24: 958-961.

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

Reddy, N.R.; Salunkhe, D.K.; Sharma, R.P. 1980. Flatulence in rats following ingestion of cooked and germinated black gram and a fermented product of black gram and rice blend. J Food Sci 45: 1161-1165.

Redgwell, R.J. 1980. Fractionation of plant extracts using ion-exchange Sephadex. Anal. Biochem 107: 44-50.

Richardson, M. 1977. The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. Phytochem 16: 159-169.

Richardson, M. 1991. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. Methods Plant Biochem 5: 259-305.

Roy, S.N.; Mukherjee, S. 1979. Influence of food tannins on certain aspects of iron metabolism. Part III. Heme synthesis and hematopoiesis in normal and anaemic rats. Indian J. Biochem Biophys 16:151-159.

Saini, H.S.; Knights, E.J. 1984. Chemical constitution of starch and oligosaccharide components of desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum*) seed types. J Agric Food Chem 32: 940-944.

Saini, H.S. 1988. Extractability and evaluation of  $\alpha$ -galactosides of sucrose in leguminous seeds. Food Chem 28: 149-157.

Serraino, M.R.; Thompson, L.U.; Savoie, L.; Parent, G. 1985. Effect of phytic acid on the *in vitro* rate of digestibility of rape seed protein amino acids. J Food Sci 50: 1689-1692.

Singh, U.; Jambunathan, R. 1980. Evaluation of rapid methods for the estimation of protein in chickpea (*Cicer arietinum* L.) J Sci Food Agric 31: 247-254.

Singh, U.; Jambunathan, R. 1981. Studies on desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars: levels of protease inhibitors, levels of polyphenolic compounds and *in vitro* protein digestibility. J Food Sci 46: 1364-1367.

Singh, U.; Kherdekar, M.S.; Jambunathan, R. 1982. 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 47: 510-512.

Singh, U.; George, M.; Soni, G.L. 1983. Role of dietary fiber from pulses as hypocholesterolemic agent. J Food Sci Technol, 20, 228-232.

Singh, U. 1984. The inhibition of digestive enzymes by polyphenols of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). Nutr Rep Int 29: 191-199.

Singh, 1985. Nutritional quality of chickpea (*cicer arietinum* L.): current status and future research need. Qual Plant Plant Foods Hum Nutr 35: 339-351.

Singh, D.K.; Rao, A.S.; Singh, R.; Jambunathan, R. 1988. Amino acid composition of storage protein of a promising chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivar. J Sci Food Agric 43: 373-379.

Shohana Sangwan, P.S.; Nainawatee, H.S.; Lal, B.M. 1976. Chemical composition of some improved varieties of pulses. J Food Sci Technol 13: 49-51.

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

Smirnoff, P.; Khalef, S.; Birk, Y.; Appebaum, S.V. 1976. Trypsin and chymotrypsin inhibitor from chickpeas (*Cicer arietinum* L.). Biochem J. 157: 745-751.

Sotelo, A.; Flores, F.; Hernández, M. 1987. Chemical composition and nutritional value of mexican varieties of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Foods Hum Nutr 37:299-306.

---

Srisuma, N.; Hammerschmidt, R.; Ubersax, M.A.; Ruengskulrach, S.; Bennink, M.R.; Hostfield, L. 1989. J Food Sci 50:311-314, 318.

Thompson, L.U.; Yoon, J.H. 1984. Starch digestibility as affect by polyphenols and phytic acid. J Food Sci 49: 1228-1229.

Tovar, J.; Björk, I.; Asp, N.G. Analytical and nutritional implications of limited enzymic availability of starch in cooked red kidney beans. J Agric Food Chem 38: 488-493.

Tovar, J.; de Francisco, A.; Björk, I; Asp, N.G. 1991. Relationship between microstructure and *in vitro* digestibility of starch in precooked leguminous seed flours. Food Struct 10: 19-26.

Tovar, J.; Granfeldt, Y.; Björk, I. 1992. Effect of processing on blood glucose and insulin responses to starch in legumes. J Agric Food Chem 40: 1846-1851.

Viroben, G.; Bertrand, D. 1985. En Proteines Vegetales. Editor B. Godon. Techniques et Documentation Parías, p 523.

Yoon, J.H.; Thompson, D.U.; Kenkins, J.D. 1983. The effect of phytic acid on in vitro rate of starch digestion and blood glucose response. Am J Clin Nutr 38: 835-842.

### **CAPITULO 3**

### 3. CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE GARBANZO

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

La demanda de productos proteicos vegetales por parte de la industria alimentaria ha experimentado un gran aumento en los últimos años, debido fundamentalmente a su rentabilidad económica y calidad nutricional, constituyendo una alternativa importante a las proteínas de origen animal. Aunque la fuente tradicional de proteínas vegetales ha sido la soja, otras fuentes, tales como habas, colza, girasol y guisantes han sido utilizadas con gran éxito a escala industrial (Uzzan, 1989). Por ello, desde 1978 la Comunidad Económica Europea (CEE) ha tratado de desarrollar sus propios cultivos con el objeto de disminuir su dependencia comercial en materia de disponibilidad proteica (Chominot, 1992). En 1989, gracias a una política de incentivación económica, la UE produjo aproximadamente el 36 % de su consumo proteico total (5.4 millones de Tm), constituyendo las leguminosas de grano el 19% de esa cantidad (1 millón de Tm).

Las proteínas de leguminosas se caracterizan por un elevado contenido proteico, superior dos o tres veces al de cereales, y a su alta proporción en lisina (Gueguen, 1983; Kilara *et al.*, 1885). Dentro de las leguminosas grano, el garbanzo constituye una fuente de proteínas de excelente calidad, comparable a la de soja (Newman *et al.*, 1987; Friedman, 1996), siendo utilizada como alternativa a fuentes proteicas tradicionales (leche, huevos o carnes), tanto en consumo directo como en la preparación de numerosas formulaciones alimenticias (Chavan *et al.*, 1986; Ulloa *et al.*, 1988).

**3.1.1 Fraccionamiento y caracterización de las proteínas de garbanzo.** El contenido proteico de la semilla de garbanzo presenta una gran variabilidad (14.9-30.6 %), ya que se encuentra determinado genética y medioambientalmente (Singh *et al.*, 1982; Singh *et al.*, 1990). Aunque se han obtenido genotipos de alto contenido proteico en la región mediterránea, el gran aumento en el rendimiento de la producción proteica (cantidad de proteína por unidad de área) ha venido dado por la siembra de invierno, utilizándose para ello variedades resistentes a *Ascochyta blight* y tolerantes al frío. En estas variedades se

---

han obtenido incrementos medios de producción elevados (50-100%), no observándose cambios significativos en el contenido proteico de la semilla (Singh *et al.*, 1993).

Desde hace varias décadas, la búsqueda de métodos de fraccionamiento de proteínas vegetales ha suscitado gran interés en la comunidad científica debido a sus posibles aplicaciones, tanto nutricionales como tecnológicas (Osborne, 1924; Siddiqui, 1983; Singh *et al.*, 1988). Osborne (1924) estableció un método, considerado clásico, de separación de las distintas fracciones proteicas vegetales atendiendo a la solubilidad de las mismas, mediante procedimientos de extracción selectiva, obteniéndose las fracciones de globulinas, albúminas, prolaminas y glutelinas. Sin embargo, la utilización de este método ha resultado ineficaz en el fraccionamiento proteico de leguminosas, ya que se han hallado contaminaciones cruzadas de las fracciones de globulinas y albúminas. Murray y Vairinhos (1982) obtuvieron la fracción de albúminas de guisante contaminada con la globulina vicilín mientras que, Gueguen y Barbot (1988) también observaron la presencia de diversas globulinas en dicha fracción. Por otro lado, Desphande y Nielsen (1987a) así como Sánchez-Vioque (1998) han demostrado lo inapropiado del método de Osborne para el fraccionamiento de proteínas de garbanzo, sugiriendo estos autores que las globulinas obtenidas pueden ser parcialmente solubilizadas en agua, formando así parte de la fracción de albúminas. En este sentido, Singh *et al.* (1988) fraccionaron las proteínas de garbanzo mediante diálisis, obteniendo las fracciones de globulinas y albúminas mínimamente contaminadas.

Las globulinas constituyen las proteínas de reserva de los cotiledones y son sintetizadas durante el período de formación de la semilla para ser utilizadas como fuente de nitrógeno a lo largo del proceso de germinación. Son los principales constituyentes proteicos de las leguminosas (65-80%), siendo insolubles en un rango de pH (3.7-5.2) situada en torno a su punto isoelectrico (pH 4.2-4.6), aunque pueden solubilizarse progresivamente a esos mismos pHs por aumento de la fuerza iónica. Las globulinas de leguminosas están constituidas principalmente por proteínas de coeficiente de sedimentación 7S y 11S, denominadas vicilín y legumín respectivamente, en el caso de guisantes, garbanzos y habas. La razón existente entre las globulinas 7S y 11S difiere de una especie a

otra. En soja y altramuza, la relación 7S:11S es 1.6:1 (Thank y Shibasaki, 1976) y 1.3:1 (Duranti et al., 1981), respectivamente, mientras que en habas y guisantes, legumín es la proteína mayoritaria, con una relación 7S:11S de 1:2 (Gueguen, 1983). Aunque las globulinas han sido purificadas y caracterizadas en diferentes leguminosas, existe poca información acerca de las globulinas de garbanzo (Singh, 1985).

Las albúminas, aunque cuantitativamente menos importantes que las globulinas (15-25% del total de proteínas), juegan un papel biológico destacado en la semillas de leguminosas, ya que están constituidas fundamentalmente por enzimas y factores antinutricionales, tales como lectinas e inhibidores de las enzimas digestivas tripsina y quimotripsina. Además, el descenso en el contenido de algunos de sus componentes durante la germinación y crecimiento temprano de la planta sugiere que también puedan cumplir la función de proteínas de reserva (Schroeder, 1984).

Como en otras leguminosas, la composición aminoacídica de las proteínas del garbanzo se caracteriza por una baja concentración de aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y contenidos relativamente altos de lisina. Respecto a la composición aminoacídica de las principales fracciones proteicas del garbanzo, las globulinas se caracterizan por su elevado contenido en aminoácidos ácidos y arginina mientras que, las albúminas, destacan por su alto contenido en aminoácidos azufrados y lisina, superior al que presentan otras leguminosas de grano, tales como lentejas, habas o guisantes (Bhatty, 1982; Murray y McC Roxburgh, 1984). Este hecho hace de las albúminas de garbanzo una fracción proteica de gran interés desde el punto de vista nutricional.

## 1.2 Digestibilidad proteica *in vitro*.

La digestibilidad proteica de las leguminosas ha sido objeto de estudio por parte de numerosos investigadores, ya que el bajo contenido en aminoácidos azufrados que presentan sus proteínas, hace necesaria una elevada biodisponibilidad de los mismos. Sin embargo, uno de los factores que limitan el consumo de las leguminosas es, precisamente, su reducida digestibilidad proteica. Este hecho ha sido atribuido a la resistencia proteolítica



---

causada por la propia la estructura de las globulinas (Khokhar y Chauchan, 1986; Desphande y Damodaran, 1989), así como a la presencia de factores antinutricionales, tales como polifenoles e inhibidores de proteasas (Tan *et al.*, 1984; Liener, 1989).

En los últimos años, se han intensificado los estudios referentes a la digestibilidad de las proteínas de leguminosas con el objeto de desarrollar variedades con elevada digestibilidad proteica (De Lumen, 1990). Sin embargo, a pesar de su importancia, son escasas las investigaciones relacionadas con el papel que juegan las principales fracciones proteicas, globulinas y albúminas, en la digestibilidad de la semilla. Sathe *et al* (1978) observaron que las albúminas de *Phaseolus vulgaris* mostraban una menor digestibilidad respecto a las globulinas debido, fundamentalmente, a su estructura primaria y conformación nativa, así como a la presencia de inhibidores proteicos termoestables (Genovese y Lajolo, 1996a). Bhatta (1988) estudió la digestibilidad de fracciones proteicas aisladas de lentejas, habas y guisantes. Sus globulinas presentaron una mayor susceptibilidad a ser hidrolizadas por pepsina que las albúminas; sin embargo, en tratamientos con tripsina se observó el efecto contrario. Por otro lado, se ha observado que el tratamiento térmico afecta a la digestibilidad de las distintas fracciones proteicas. En estudios de digestibilidad *in vitro* llevados a cabo en judía, la globulina G1 sometida a tratamiento térmico es rápidamente hidrolizada por enzimas proteolíticos (Lanfer Márquez y Lajolo, 1981; Bradbear y Boulter, 1984). También, la globulina G2 tras calentamiento muestra mayor digestibilidad respecto a su forma nativa, pudiendo ser debido, parcialmente, al proceso de desnaturalización de las proteínas (Salunke y Kadam, 1989). Sin embargo, la fracción de albúminas exhibió la conducta opuesta tras ser sometida a tratamiento térmico. El calentamiento causó la formación de agregados proteicos de pesos moleculares elevados, que fueron hidrolizados mucho más lentamente por los enzimas proteolíticos (Lanfer Marquez y Lajolo, 1981; Desphande y Nielsen, 1987b).

La presencia de compuestos polifenólicos en las semillas de leguminosas ha sido objeto de numerosas investigaciones, ya que inhiben inespecíficamente varias enzimas digestivas, disminuyendo la susceptibilidad de los sustratos proteicos a ser atacados por los enzimas proteolíticos (Elias *et al.*, 1979; Singh, 1984). Price *et al* (1980) estudiaron el

---

contenido de polifenoles en la semilla de garbanzo. Éstos se encuentran localizados fundamentalmente en la cubierta seminal, con niveles superiores al 90% respecto del total. Attia *et al.* (1994) observaron que la eliminación de la cubierta seminal del garbanzo mejoró la digestibilidad proteica *in vitro* de la semilla y redujo drásticamente el contenido de polifenoles. La presencia de complejos proteína-fenol ha sido estudiada en distintas leguminosas. En *Phaseolus vulgaris*, la presencia de estos complejos condujo a un descenso importante de la digestibilidad proteica de la proteína faseolín, incluso en presencia de exceso de proteasas, dando lugar a estructuras resistentes a proteólisis de alto peso molecular (20 KDa) (Genovese y Lajolo, 1996b).

**1.3 Inhibidores de proteasas.** El interés creciente por el uso de proteínas de leguminosas, tanto para el consumo humano como animal, ha aumentado el número de investigaciones relacionadas con la presencia de inhibidores de proteasas y su papel como factor antinutricional, decreciendo la calidad proteica de las semillas. Los inhibidores de proteasas son moléculas proteicas que tienen la capacidad de formar complejos proteína-proteína con las enzimas digestivas inhibiendo, de forma competitiva, su actividad catalítica. La literatura disponible sobre la presencia, función fisiológica, mecanismo de acción y caracterización de los inhibidores de proteasas en las semillas de leguminosas es muy copiosa, aunque los estudios referentes a la semilla de garbanzo son escasos ( Liener, 1976; Laskowski y Kato, 1980; Richardson, 1981; Richardson, 1991).

Los inhibidores de proteasas que han sido aislados en soja y otras leguminosas se encuentran agrupados en dos categorías: una, donde presentan pesos moleculares de 20-25 KDa, con pocos puentes disulfuro y especificidad por la tripsina; otra, con pesos moleculares de 6-10 KDa, con una alta proporción de residuos de cistina, capaces de inhibir a las proteasas tripsina y quimotripsina en sitios activos diferentes. Los representantes más característicos y estudiados de cada una de las categorías son los inhibidores de Kunitz y de Bowman-Birk, respectivamente. El inhibidor de Kunitz presenta 181 residuos aminoacídicos, localizándose el centro activo en los residuos Arg63 e Ile64. La relación estequiométrica enzima:inhibidor es 1:1. En cambio, el inhibidor de Bowman-Birk presenta

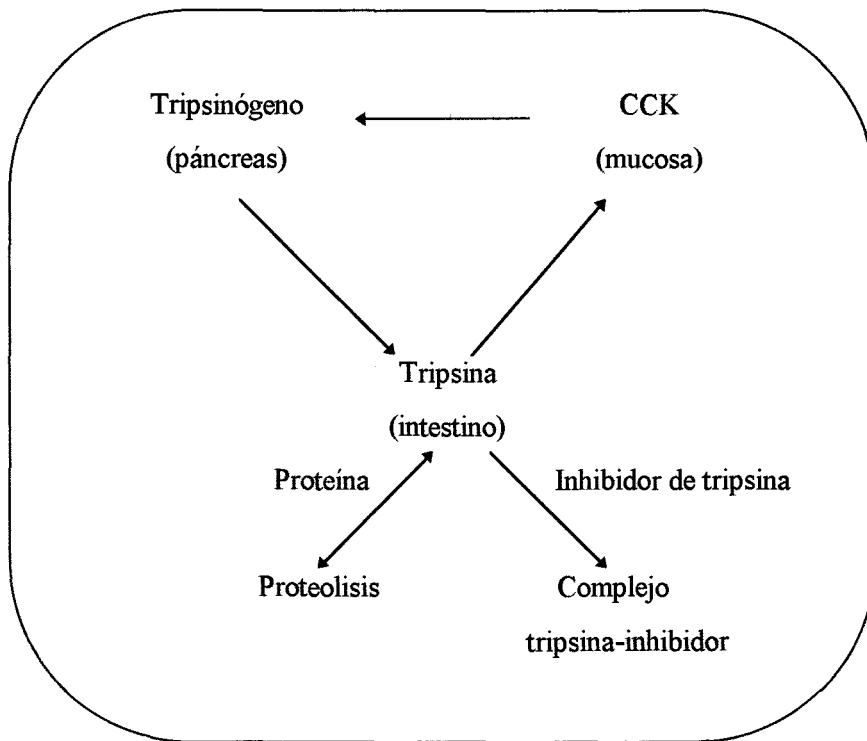
dos centros activo: uno para tripsina (Lys16-Ser17) y otro para quimotripsina (Leu44-Ser45).

Los inhibidores de proteasas de soja purificados, inhiben la actividad de las enzimas digestivas tripsina y quimotripsina humana *in vitro* afectando, por tanto, la digestibilidad proteica de las semillas y su calidad nutricional (Krogdahl y Holm; 1979). En experiencias realizadas *in vivo*, parecen ser causantes no sólo del retardo en el crecimiento animal, sino además causantes de hipertrofia e hiperplasia pancreática, aunque su modo de acción no está totalmente elucidado (Liener y Kakade, 1980; Ge y Morgan, 1993). La secreción pancreática está controlada mediante un mecanismo de feed-back que depende del nivel de tripsina presente en el intestino delgado. Cuando decrece el nivel de tripsina por debajo de un cierto nivel crítico, el páncreas es inducido a producir más enzima. Este mecanismo de retroalimentación se puede suprimir mediante la formación de complejos enzima-inhibidor. Se cree que el agente mediador entre la enzima y el páncreas es la hormona colicistoquinina (CCK) que es liberada desde la mucosa intestinal cuando el nivel de tripsina cae por debajo del nivel crítico (Anderson et al., 1979) (Figura 3.1).

La presencia de los inhibidores de proteasas estimulan la secreción de proteasas pancreáticas, ricas en aminoácidos azufrados, produciéndose un incremento en la demanda de estos aminoácidos por parte del organismo (Kakade, 1974; Liener, 1979). Sin embargo, a pesar de su innegable papel como factor antinutricional, se han realizado estudios que demuestran, tanto *in vivo* como *in vitro*, que protegen e inhiben el desarrollo de procesos cancerígenos de mama, colon y páncreas (Birk, 1996).

Aunque se conoce poco acerca del papel fisiológico de los inhibidores de proteasas en legumbres, se han sugerido varias hipótesis al respecto. La hipótesis más aceptada es la protección de la semilla contra los ataques de insectos y microorganismos. El hecho de que los inhibidores de proteasas puedan ser utilizados por la semilla como mecanismo de defensa podría tener importantes aplicaciones relacionadas con el almacenamiento de las semillas y selección de variedades resistentes al ataque de insectos (Birk y Smirnoff, 1992). Además, se han propuesto otras funciones fisiológicas tales como las de regulador endógeno enzimático de la propia semilla (Matsushita y Uritani, 1976) y/o reservorio de

aminoácido azufrados ya que, a menudo, presentan 7 u 8 enlaces disulfuro en cada cadena polipeptídica (Pusztai, 1972; Smirnof *et al.*, 1979).



**Figura 3.1.** Modo de acción del inhibidor de tripsina sobre el páncreas

Dado que los inhibidores de tripsina son moléculas biológicamente activas, se han investigado distintos métodos, principalmente térmicos, con el objeto de modificar su conformación nativa y, con ello, su función biológica. En los diferentes estudios realizados se ha observado que, inhibidores de tripsina obtenidos a partir de distintas fuentes vegetales, varían considerablemente su estabilidad térmica, dependiendo fundamentalmente de la temperatura y duración del calentamiento (Liener, 1983; Griffiths, 1984). Sin embargo, una característica común existente en los inhibidores de tripsina presentes en las semillas de leguminosas es su sorprendente resistencia a la desnaturalización térmica, hecho que le otorga una significación especial desde el punto de vista nutricional (Ghorpade *et al.* 1986). En algunos casos, es necesario un tratamiento térmico excesivo, tanto en temperatura como

en duración del mismo, con el objeto de eliminar la actividad inhibidora, pudiendo conducir a una reducción del valor biológico de las proteínas. Esta resistencia al calor ha sido relacionada con su conformación nativa debido a la presencia de numerosos puentes disulfuro (Richardson, 1981). Asimismo, estos inhibidores resultan ser estables en condiciones ácidas (pH 2-3) y sólo unos pocos son fácilmente destruidos en su paso a través del tracto gastrointestinal (Richardson, 1977).

La actividad inhibidora de tripsina ha sido estudiada en diferentes variedades de garbanzo, observándose grandes variaciones en sus niveles de inhibidores (Singh y Jambunathan, 1981). Por otra parte, se ha observado que la semilla de garbanzo presenta menor presencia de inhibidores de proteasas respecto a otras leguminosas de grano. Bajo idénticas condiciones de ensayo, Gallardo *et al* (1974) observaron la presencia de inhibidores de tripsina, con actividades en orden decreciente para soja, haba, judía, guisante, lenteja y garbanzo. En garbanzo, se ha obtenido inhibidores de tripsina, de peso molecular 8-9 KDa., siendo la razón estequiométrica inhibidor:tripsina 1.8:1. Éstos presentaban dos centros activos para tripsina, aunque otros presentaban un centro para tripsina y otro para quimotripsina (Sastry y Murray, 1987).

**3.1.4 Objetivo.** En el presente capítulo se pretende caracterizar las proteínas del garbanzo y sus principales fracciones proteicas, albúminas y globulinas, con el objeto de proporcionarnos información básica para la realización de estudios posteriores. Para ello, se describen los patrones cromatográficos y electroforéticos, así como la composición de aminoácidos de las distintas fracciones. Por otro lado, dada la importancia que presenta la digestibilidad proteica en la evaluación de la calidad de la semilla, se pretende investigar qué factores la determinan. Para ello, se estudiarán las distintas fracciones proteicas, así como la presencia de polifenoles e inhibidores proteicos relacionados con la digestibilidad proteica de la semilla de garbanzo. Además, se pretenden realizar diversos experimentos de tratamiento térmico con el objeto de observar el grado de inactivación que presentan tras los mismos así como la identificación de bandas electroforéticas que presenten resistencia a tripsina.

## 3.2 MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.2.1 Obtención de extracto proteico.

La harina desengrasada de garbanzo se extrajo con tampón fosfato 0.02M, NaCl 0.5M pH 7.0 en una relación (1:20) a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 10000xg durante 20 minutos, considerándose el sobrenadante como extracto crudo proteico.

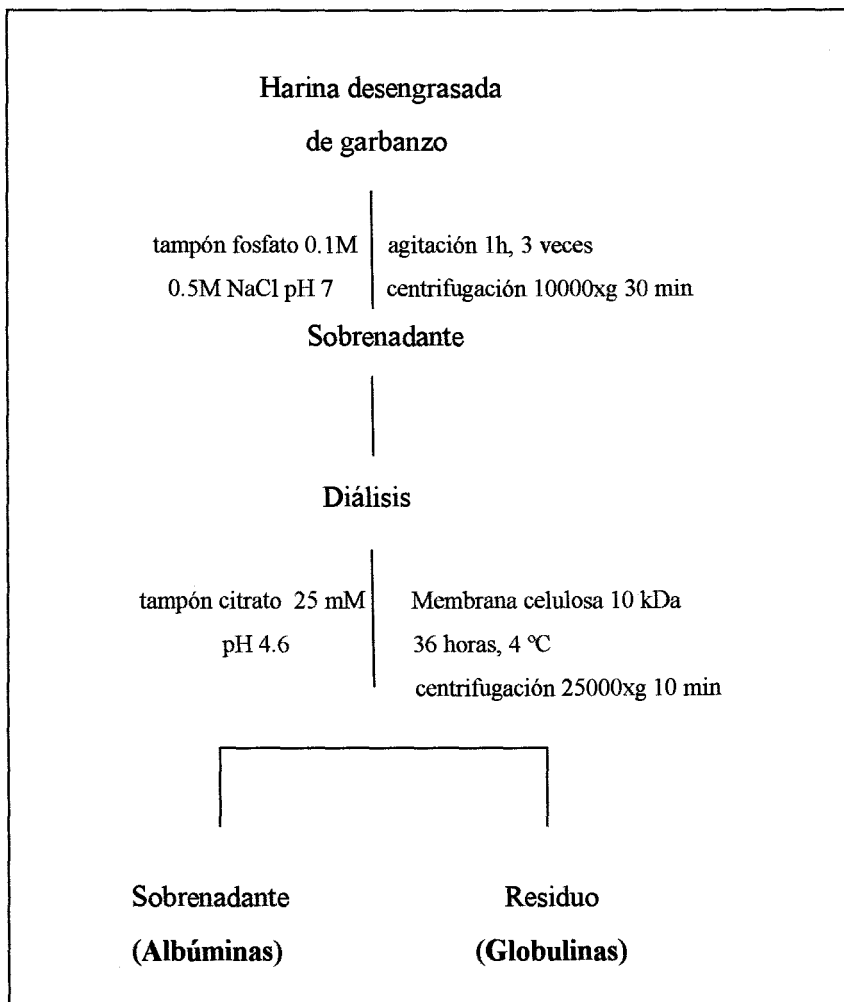
### 3.2.2 Fraccionamiento de proteínas.

La extracción y fraccionamiento de las proteínas de garbanzo se realizó de acuerdo al método de Singh *et al.* (1988) (Figura 3.2). Para ello, se extrajeron 50 g de harina de garbanzo desengrasada en 500 ml de tampón fosfato 0.1 M, 0.5 M NaCl, pH 7.0, mediante agitación a 37 °C durante 1 hora. La mezcla se centrifugó a 10000xg durante 30 minutos, siendo el residuo extraído tres veces con 200 ml del mismo tampón. Los cuatro sobrenadantes se reunieron, dializándose en una membrana de celulosa 5 KDa (Sigma, St Louis, MO) frente a 25 mM de tampón citrato sódico pH 4.6 durante 36 horas a 4 °C. Posteriormente, se centrifugó a 25000xg durante 10 minutos. El sobrenadante y el residuo obtenido fueron las fracciones de albúminas y de globulinas, respectivamente. Éstas se liofilizaron y se almacenaron hasta su uso.

### 3.2.3 Electroforesis de poliacrilamida (PAGE-SDS).

Esta técnica ha sido llevada a cabo mediante el método de Laemmli (1970), en una célula de electroforesis vertical (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) sobre geles de 0.75 mm de grosor. Las concentraciones de acrilamida de los geles de empaquetamiento y corrido fueron 4 y 15 %, respectivamente. La electroforesis se llevó a cabo a 20 mA y los geles se tiñeron con un asolución de Coomassie Brilliant Blue G-250. Las muestras se disolvieron en 10 ml de tampón fosfato 0.02 M, 0.5 M NaCl pH 7.0 y se eluyeron con el mismo tampón en una columna Sephadex G-25, con el objeto de eliminar los componentes

no proteicos. Los extractos purificados se diluyeron a concentraciones de 2 mg/ml y se mezclaron (1:1 v/v) con tampón de solubilización Tris-HCl 80 mM, 0.57% EDTA, 0.26% DTT, 3.3% SDS, 0.008 % Blue Bromophenol, 20% sacarosa pH 6.8 y reducido con  $\beta$ -mercaptoetanol en agua hirviendo durante 3 minutos. Las masas moleculares se determinaron mediante marcadores de bajo peso molecular (Pharmacia Biotechnology, Sweden): fosforilasa b (94.4 kDa), BSA (67 kDa), ovalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina de soja (20.1 kDa) y  $\alpha$ -lactalbúmina (14.4 kDa).



**Figura 3.2** Fraccionamiento de las principales fracciones proteicas de la harina de garbanzo: globulinas y albúminas.

### 3.2.4 Cromatografía de filtración en gel.

La cromatografía de filtración en gel se llevó a cabo en un sistema de FPLC equipado con una columna Superose 12 HR 10/30 de Pharmacia Biotechnology. El eluyente fue 0.02 M fosfato sódico, 0.5 M cloruro sódico pH 7.0, siendo el flujo analítico de 0.4 ml/min. La elución fue monitorizada a 280 nm. Las masas moleculares de las muestras fueron determinadas utilizándose los siguientes patrones: blue dextran (2000 KDa), catalasa (240 KDa),  $\gamma$ -globulina (158 KDa), BSA (67 KDa), ovalbúmina (43 KDa) y anhidrasa carbónica (29KDa), obteniéndose una recta que relacionaba los volúmenes de elución con el logaritmo del peso molecular (Anexo 1, Figura 4):

$$V_e/V_o = -0.932 \log PM + 6.78, \text{ siendo } V_e = \text{volumen de elución}$$

$$V_o = \text{volumen de exclusión (5.77)}$$

Las muestras liofilizadas (1 g) se disolvieron en 10 ml del eluyente cromatográfico, se purificaron en una columna Sephadex G-25 y prefiltraron en un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore, MA, USA), previo análisis.

### 3.2.5 Análisis de aminoácidos.

Las muestras (2 mg de proteína) se sometieron a hidrólisis ácida con 4 ml de HCl 6N. Las soluciones se sellaron en tubos de hidrólisis bajo nitrógeno y fueron incubadas en un horno a 110 °C durante 24 h. El contenido de los diferentes aminoácidos presentes en las muestras se determinaron, previa derivatización con diethymethylenemalonato, por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) mediante el método de Alaiz *et al.* (1992), utilizándose el ácido D,L- $\alpha$ -aminobutírico como patrón interno. Las pérdidas de los aminoácidos, sensibles a la hidrólisis ácida, especialmente metionina y cisteína, se consideraron para su correcta cuantificación. El sistema de HPLC estaba constituido por un modelo multisistema 600E con un detector UV/Vis 484 (Waters, Milford, MA). Las separaciones se realizaron mediante una columna de fase reversa 300 x 3.9 D.I. (Nova-Pack C<sub>18</sub>, 4 $\mu$ , Waters) utilizándose un sistema de gradiente binario. El solvente utilizado fue



(A) 25 mM acetato sódico pH 6.0, 0.02% de azida sódica y (B) acetonitrilo. La tasa de flujo fue 0.9 ml/min, siendo la tabla de gradiente como sigue: Tiempo 0.0-3.0 min, gradiente lineal desde A:B (91:9) a A:B (86:14); 3.0-13.0 min, elución isocrática con A:B (86:14); 13.0-30.0 min, gradiente lineal de A:B (86:14) a A:B (69:31); 30.0-35.0, elución con A:B (69:31). El análisis de aminoácidos se llevó a cabo a 18 °C, mediante un controlador de temperatura (Julabo F10).

### 3.2.6 Digestibilidad proteica *in vitro*.

La digestibilidad proteica *in vitro* de las muestras se determinó mediante el método de Hsu (1977). Las soluciones proteicas, 6.25 mg/ml en agua destilada, se ajustaron a pH 8.0 con 0.1 NaOH 0.1N en agitación durante 2 horas a 37 ° C en un baño de agua. La mezcla enzimática (1.6 mg tripsina; 3.1 mg quimotripsina y 1.3 mg exopeptidasa/ml) se mantuvo en hielo, siendo ajustada a pH 8.0 con NaOH 0.1 N. Se añadió la solución multienzima a la solución proteica en una relación 1:10 (v/v), registrándose el descenso de pH a los 10 min de la adición. El porcentaje de digestibilidad (Y) se calculó según la ecuación  $Y=210.47 -18.10X$ , siendo X el valor de pH tras un periodo de 10 min (Hsu *et al.*, 1977).

### 3.2.7 Tratamiento térmico de las fracciones proteicas.

Las fracciones proteicas de globulinas y albúminas (20 mg proteína/ ml agua bidestilada) se depositaron en viales sellados con nitrógeno y se calentaron en un baño de agua hirviendo durante 50 minutos. A continuación se enfriaron, procediéndose a los análisis de aminoácidos y digestibilidad proteica *in vitro* de dichas fracciones.

### 3.2.8 Actividad del inhibidor de tripsina.

La actividad del inhibidor de tripsina se determinó mediante ensayos de actividad de tripsina en presencia y ausencia de extracto inhibidor, utilizando caseína como sustrato para la tripsina. Previo contacto de la enzima con el sustrato, se realizó una preincubación

durante 30 minutos a 37 °C de la tripsina con el extracto inhibidor con el objeto de alcanzar el mayor grado de inhibición posible (Richardson, 1991). La mezcla de reacción estaba compuesta por 3 ml de tampón fosfato 0.1 M pH 7.6, 0.25 ml tripsina (1 mg/ml 0.001N HCl), 0.5 ml HCl 0.001 N, 2 ml de caseína (2 % en tampón fosfato 0.1 M pH 7.6) y 1 ml de extracto inhibidor (15 mg proteína/ml). La reacción tiene lugar durante 30 minutos a 37 °C y es parada mediante la adición de 5 ml de ácido tricloroacético al 5%. El blanco se preparó añadiendo el ácido tricloroacético previo a la solución de tripsina y, la muestra control, en ausencia de extracto inhibidor. Tras las incubaciones, las muestras fueron filtradas a través de papel Whatman nº1, realizándose el análisis del proceso digestivo mediante el método del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS), cuantificándose a partir de una curva de calibrado previamente obtenida (Anexo 1; Figura 5). Para ello, se utilizaron alícuotas (100 µl) a las que se añadió 10 µl de SDS 10% y 15µl de agua bidestilada, siendo la mezcla calentada a 75 °C durante 15 minutos. A continuación, se le añadió 1 ml de tampón borato 1 M pH 8.5 y 1 ml de TNBS 0.025% en agua. La reacción se llevó a cabo en oscuridad durante 1 hora a 50 °C. Posteriormente, se añadió 2 ml de HCl 0.1 N, manteniéndose la muestra en oscuridad durante 30 minutos. La lectura espectrofotométrica se realizó a 420 nm. El porcentaje de inhibición (% I) se determinó de la siguiente forma:

$$\%I = 1 - M/C$$

siendo M y C el número de µmoles de leucina liberados en presencia y ausencia de extracto inhibidor, respectivamente.

### 3.2.9 Identificación electroforética de los inhibidores de tripsina

Tras el desarrollo electroforético en gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturizantes (Ver 2.2.6), se realizaron incubaciones de 30 y 90 minutos de duración, en un baño a 37 °C que contenía 10 ml de tripsina (1 mg/ ml 0.001 N HCl) y 100 ml de tampón fosfato 0.1M pH 7.6. Tras el periodo de incubación, los geles se lavaron con agua bidestilada, se tiñeron con Coomassie brilliant blue (Serva) y destiñeron. La presencia de inhibidores de tripsina, no sometidos a la acción de la tripsina, se detectó mediante bandas

azules individuales. En el caso de PAGE, los geles se sometieron a incubaciones de 30, 60, 90 y 120 minutos en las condiciones descritas anteriormente para PAGE-SDS.

### 3. 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.3.1 Contenido proteico.

El contenido proteico de la semilla de garbanzo var. Athenas (18.9 %) se encuentra dentro del rango de valores observados en otras variedades. Mediante el proceso de fraccionamiento de proteínas de Singh *et al.* (1988), se obtuvieron globulinas y albúminas. La fracción de globulinas representó el 64.2 % de las proteínas totales, mientras que la fracción de albúminas constituyó el 16 % (Tabla 3.1). La relación albúminas/globulinas observada (1/4) es similar a la obtenida para otras leguminosas (Grant *et al.*, 1976; Padhye y Salunke, 1979). Sin embargo, Murray y McC Roxburgh (1984) observaron un elevado contenido de albúminas en la semilla de garbanzo (35-38 %), pudiendo estas variaciones ser atribuidas a factores genéticos y medioambientales así como a la utilización de diferentes procesos de extracción de proteínas (Singh, 1985; Singh *et al.*, 1988).

#### 3.3.2 Composición proteica.

La fracción de globulinas reflejó un patrón electroforético típico de globulinas de leguminosas. En la Figura 3.2 se observan tres subunidades ácidas ( $\alpha$ ) (45.2, 41.1 y 39.2 KDa) y una básica ( $\beta$ ) (19.9 KDa), procedentes de la disociación de la globulina legumín. La presencia de bandas electroforéticas de peso molecular en torno a 60-65 KDa podría ser debido a la reducción incompleta de dicha proteína. Los resultados están en concordancia con los pesos moleculares de las distintas subunidades obtenidas en haba y guisante (Croy *et al.*, 1979; Crévieu *et al.*, 1996), y en altramuza (Cerletti *et al.*, 1978; Duranti *et al.*, 1981). Esta heterogeneidad en las subunidades del legumín está apoyada por estudios recientes que describen diversos genes que codifican a las diferentes subunidades de legumín (Gueguen, 1991). Además, en la fracción de globulinas de garbanzo aparecen bandas correspondientes

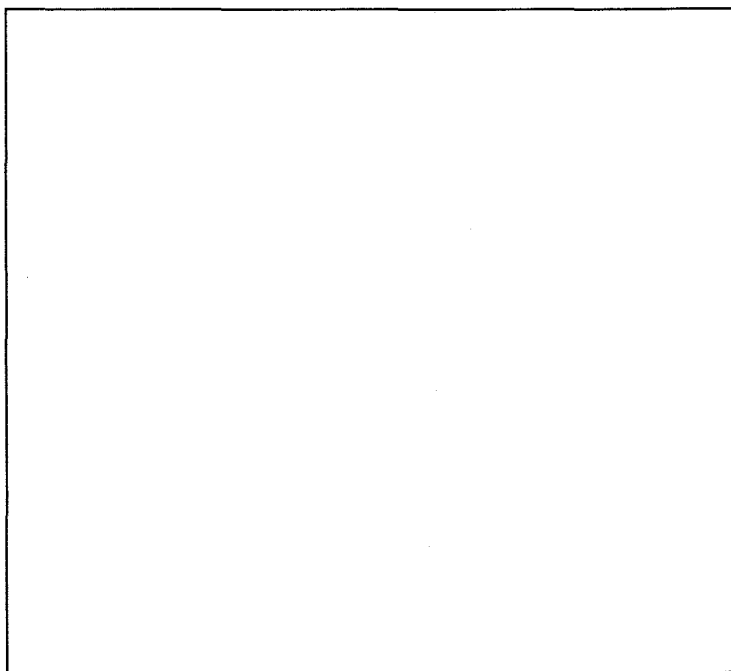
a vicilín (50 KDa) y convicilín (73.5 KDa), similares a las descritas por otros investigadores en guisantes y habas (Casey y Sanger, 1980; Gueguen *et al.*, 1984; Newbiggin *et al.*, 1990).

**Tabla 3.1.** Fraccionamiento<sup>1</sup> proteico de la harina de garbanzo var. Athenas.

Fracciones proteicas	% N total	% proteína	Datos bibliográficos
Albúminas	15.8	16.0	
Globulinas	63.6	64.2	
Insoluble	19.6	19.8	
NNP <sup>2</sup>	1.0		

<sup>1</sup>Fraccionamiento proteico según el método de Singh *et al.* (1988).

<sup>2</sup>Nitrógeno no proteico.



**Figura 3.2.** Análisis de proteínas de garbanzo de la var. Athenas mediante PAGE-SDS. Las muestras están dispuestas de la siguiente forma: 1: marcadores de bajo peso molecular (94-14.4 kDa); 2: extracto proteico total; 3: globulinas; 4: legumín; 5: albúminas; 6: PA2.

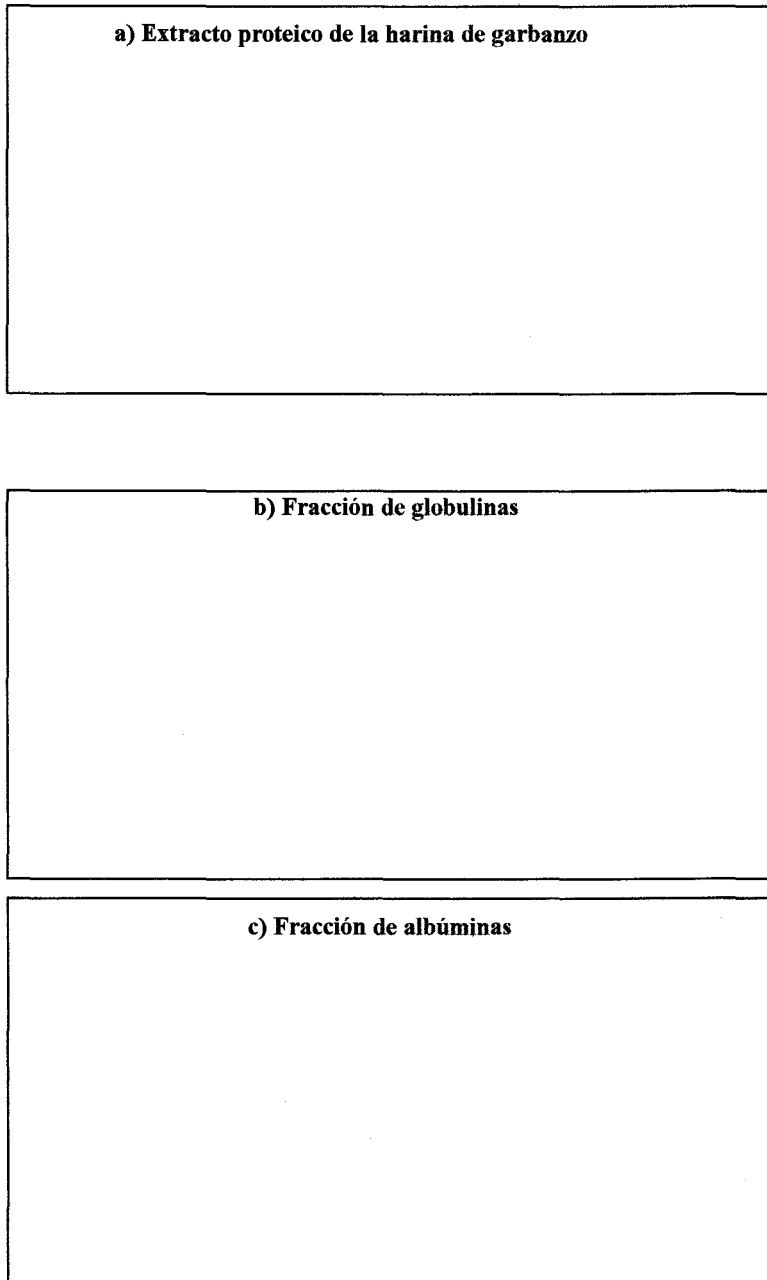
La fracción de albúminas constituyó una mezcla heterogénea de proteínas de pesos moleculares situados entre 8 y 93 KDa, mostrando bandas características de albúminas de leguminosas: lipoxigenasa (93 KDa), PA2 (PM 28 KDa), así como las albúminas 2S (17-8 KDa) que incluyen a inhibidores de proteasas, la subunidad  $\beta$  de lectinas y a la albúmina PA1 (Figura 3.2) Esta última se encontró en baja cantidad, debido a su pérdida parcial a través de la membrana de diálisis. La tasa de retención de esta proteína debería aumentar mediante la utilización de membranas de diámetro de poro menores. Por otro lado, se realizó una sobrecarga de muestra de albúminas en PAGE-SDS, confirmando la ausencia de contaminación cruzada entre las fracciones de globulinas y albúminas (datos no mostrados).

Mediante cromatografía de filtración en gel se obtuvieron los perfiles del extracto proteico total de la harina de garbanzo así como de las fracciones de globulinas y albúminas (Fig X). El extracto proteico de la harina de garbanzo mostró 7 fracciones definidas con pesos moleculares aparentes de 400 kDa, 271 kDa, 162 kDa, 110 kDa, 43 kDa, 21 kDa y 4 kDa. El perfil de globulinas estuvo definido por fracciones de muy diferente peso molecular, mientras que el perfil de albúminas presentó una única fracción, con peso moleculares que oscilan entre 90 y 2 kDa. El perfil cromatográfico de las albúminas corrobora la ausencia de globulinas en dicha fracción. El peso molecular aparente de legumín (390-410 kDa) está en concordancia con los pesos moleculares observados en otras leguminosas, tales como guisante (330-400 kDa) y habas (328-360 kDa). El peso molecular aparente del vicilín (160-170 kDa) también parece estar en concordancia con los valores obtenidos en dichas leguminosas (Gueguen, 1991).

### 3.3.3 Composición aminoacídica.

En la tabla 3.2 se muestra la composición de aminoácidos de las proteínas del garbanzo en comparación a los patrones de referencia de aminoácidos esenciales declaradas por FAO/WHO (1985). Los niveles de metionina (1.75 g/100g proteína) y cisteína (1.54 g/100g proteína) obtenidos no fueron limitantes, siendo superiores a los observados en otras variedades (Singh *et al.*, 1981). Las proteínas de garbanzo mostraron un elevado nivel de lisina (8.28 g/100g proteína), constatando los resultados aportados por otros investigadores

(Chavan *et al.*, 1986; Singh *et al.*, 1988), y que hacen a las proteínas de garbanzo un material muy interesante como suplemento de proteínas deficitarias en lisina, tales como las provenientes de cereales. Además, se observó un alto contenido de los aminoácidos arginina, aspártico y glutámico, sumando 44.2 g/100 g proteína.



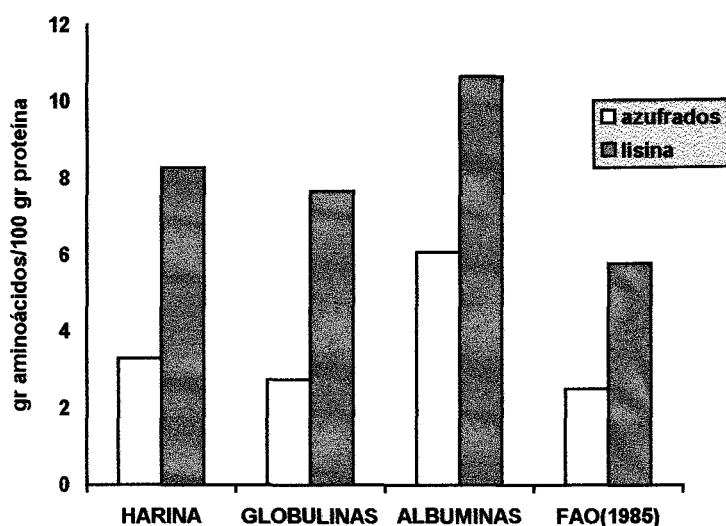
**Figura 3.2** Perfiles cromatográficos de filtración en gel mediante FPLC en a) extracto proteico total de harina de garbanzo, b) fracción de globulinas, c) fracción de albúminas, mediante la columna Superose 12.

Respecto a las principales fracciones proteicas del garbanzo, las albúminas mostraron niveles significativamente superiores de aminoácidos azufrados (6.08g /100 g proteína) y lisina (10.78 g/100 g proteína) en relación a las globulinas (2.73 y 7.67 g/100 g proteína, respectivamente). Además, las albúminas presentaron contenidos superiores de tirosina y treonina, pero inferiores en leucina y arginina. En relación a otras leguminosas, las albúminas de garbanzo mostraron un mayor contenido de aminoácidos esenciales, principalmente azufrados y lisina (Figura 3.3).

**Tabla 3.2.** Composición<sup>1</sup> de aminoácidos de la harina de garbanzo y sus principales fracciones proteica, globulinas y albúminas.

Aminoácido	Harina	Globulinas	Albúminas	FAO <sup>2</sup>
Acido aspártico	12.92±0.31	12.86±0.23	12.98±0.10	
Acido glutámico	18.10±0.27	19.82±0.17	16.91±0.14	
Serina	6.60±0.23	5.24±0.12	4.74±0.10	
Histidina	2.94±0.12	2.91±0.07	2.75±0.14	
Glicina	4.40±0.08	4.21±0.14	5.43±0.12	
Treonina	4.51±0.11	3.47±0.09	6.04±0.08	3.4
Arginina	13.20±0.29	13.86±0.21	8.24±0.12	
Alanina	4.30±0.07	4.21±0.14	4.86±0.10	
Tirosina	3.30±0.11	2.99±0.03	3.74±0.07	
Valina	4.83±0.14	5.54±0.14	5.22±0.10	3.5
Metionina	1.75±0.05	1.72±0.07	3.24±0.11	2.5 <sup>3</sup>
½ Cistina	1.54±0.09	1.01±0.08	2.84±0.14	
Isoleucina	5.04±0.08	5.73±0.14	5.34±0.10	2.8
Leucina	9.32±0.14	9.42±0.26	7.47±0.12	6.6
Fenilalanina	6.34±0.10	6.67±0.11	4.93±0.10	6.3 <sup>4</sup>
Lisina	8.28±0.14	7.67±0.09	10.78±0.06	5.8

Cada valor es la media ± desviación standard de tres determinaciones independientes. <sup>1</sup>Gramos de aminoácido por 100 gramos de proteína. <sup>2</sup>FAO (1985). <sup>3</sup>Metionina + Cisteína. <sup>4</sup>Tirosina + Fenilalanina.



**Figura 3.3.** Contenido de aminoácidos azufrados(□) y lisina (■) de la harina de garbanzo y de las fracciones globulinas y albúminas, comparados a los valores limitantes de FAO (1985).

### 3.3.4 Digestibilidad proteica *in vitro*.

El aprovechamiento biológico de una proteína depende, en primer lugar, de su susceptibilidad a ser degradadas por las enzimas proteolíticas. En el caso de las leguminosas, la digestibilidad proteica también va a depender del tratamiento, generalmente térmico, al que se ven sometidas durante el procesado. Los experimentos llevados a cabo en este trabajo se han realizado mediante procedimientos enzimáticos *in vitro*, utilizando para ello las enzimas tripsina, quimotripsina y peptidasa. En comparación con los métodos *in vivo* son más reproducibles, rápidos, simples y podrían ser utilizados por la industria alimentaria para monitorizar análisis de calidad proteica (Swaisgood y Catignani, 1991).

Las fracciones proteicas de globulinas y albúminas se analizaron, con el objeto de profundizar en el estudio de los factores que afectan a la digestibilidad proteica de la semilla de garbanzo. Además, estas fracciones se sometieron a calentamiento, con temperaturas y tiempo de tratamiento similares a los que concurren en el procesado doméstico. Los resultados de la Figura 3.4 indican que la caseína presentó una digestibilidad proteica *in vitro* superior a la obtenida por las proteínas de garbanzo. Sin embargo, tanto en estudios *in*



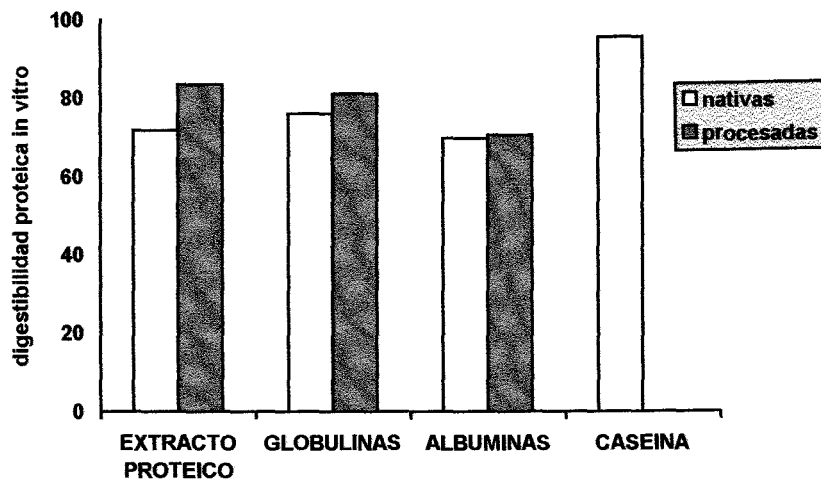
---

*vivo* como *in vitro*, las proteínas de garbanzo parecen mostrar una digestibilidad proteica superior a las del resto de leguminosas ( Chavan et al., 1986; Carbonaro et al., 1997 ). La digestibilidad proteica *in vitro* de la fracción de globulinas (76.1 %) fue superior a la observada en el extracto proteico total (71.8 %). Este hecho sugiere que la estructura proteica no es el único factor que afecta a la digestibilidad proteica de la semilla. Por otro lado, el tratamiento térmico de las globulinas mejoró de manera significativa su digestibilidad proteica (81.1 %), debido al desplegamiento de sus moléculas, que hacen a las globulinas más susceptibles a la proteólisis.

La baja digestibilidad proteica *in vitro* de la fracción de albúminas (69.7 %) puede ser debida a la presencia de inhibidores de tripsina y quimotripsina. Otro factor que puede afectar al hecho de que las globulinas presenten una digestibilidad proteica superior a la observada en la fracción de albúminas es la presencia de un mayor número de restos aminoacídicos susceptibles de ser hidrolizados por tripsina (Lys + Arg) y quimotripsina (Phe + Tyr) en la fracción de globulinas respecto a la de albúminas (Tabla 3.2).

El tratamiento térmico no mejoró de manera significativa la digestibilidad de las albúminas (70.6%), pudiendo ser debido a la termoestabilidad de los inhibidores de tripsina. Por ello, la mejora de digestibilidad proteica *in vitro* observada en el extracto proteico total (83.5%) es debido principalmente a la desnaturalización térmica de las globulinas, que dio lugar a una mejor accesibilidad de las enzimas proteolíticas.

Singh y Jambunathan (1981) obtuvieron una correlación negativa altamente significativa entre digestibilidad proteica *in vitro* y el contenido de compuestos polifenólicos de la semilla de garbanzo, ya que estos compuestos reaccionan con las proteínas formando complejos proteína-fenol, mantenido por interacciones hidrofóbicas, provocando una inhibición enzimática y, consecuentemente, una reducción de la digestibilidad proteica (Jood *et al.*, 1987). Sin embargo, los bajos niveles de compuestos polifenólicos así como los valores de digestibilidad proteica obtenidos en las fracciones de globulinas y albúminas de garbanzo, parecen poner de manifiesto la escasa incidencia de los mismos en la digestibilidad proteica de la semilla.



**Figura 3.4.** Digestibilidad proteica *in vitro* de las proteínas de garbanzo y sus principales fracciones, globulinas y albúminas, nativas y sometidas a tratamiento térmico.

### 3.3.6 Inhibidores de tripsina

La adición de un extracto crudo de proteínas de garbanzo var. Athenas en un medio de reacción que contenía caseína y tripsina dio lugar a una baja inhibición de la enzima digestiva tripsina (13.2%). Sin embargo, con el objeto de observar el mayor grado de inhibición de las muestras, se procedió a realizar una preincubación de la enzima digestiva junto a las distintas soluciones proteicas objeto de estudio, durante un periodo de 30 minutos, tras el cual se añadió el sustrato proteico (Richardson, 1991). Los valores observados de inhibición para el extracto crudo fueron muy superiores (56.6%), aunque inferior al observado para otras leguminosas, tales como soja, habas o guisantes (Gallardo *et al.*, 1974). Análogamente, se analizó la presencia de inhibidores de tripsina en las fracciones proteicas de globulinas y albúminas. La fracción de globulinas no presentó inhibidores de tripsina. Sin embargo, la fracción de albúminas presentó un elevado grado de inhibición de tripsina, incluso superior al observado en el extracto crudo (71%) (Tabla 3.3). Sin embargo, Sastry y Murray (1984) observaron que el 15% de la actividad del

inhibidor de tripsina se encontraba en la fracción de globulinas. Estos datos contradictorios pueden ser debidos a la presencia de contaminación cruzada en las fracciones de globulinas y albúminas de estos autores, ya que no existen otras referencias al respecto.

**Tabla 3.3** Actividad<sup>a</sup> del inhibidor de tripsina en las fracciones de globulinas y albúminas de garbanzo.

Fracción proteica	% IT
Extracto total	56.6±2.1
Globulinas	ND <sup>b</sup>
Albúminas	71.0±1.3

<sup>a</sup>Porcentaje de inhibición de la actividad de tripsina

<sup>b</sup>No detectada

Los experimentos de tratamiento térmico se realizaron en fracciones proteicas aisladas, debido a la dificultad que presenta el análisis de inhibidores de tripsina en muestras cocinadas a causa del pronunciado descenso de solubilidad proteica (Singh y Jambunathan, 1981). La fracción de albúminas se sometió a tratamiento térmico en un rango de temperaturas y periodos de tiempo. Tras el tratamiento se analizó la presencia de actividad del inhibidor de tripsina. Los inhibidores de tripsina presentes en la fracción de albúminas fueron estables a temperaturas inferiores a 80 °C, no afectando a su capacidad de inhibir a la tripsina. Resultados similares han sido encontrados en los inhibidores de tripsina de guisantes y habas (Griffiths, 1984). La mayor pérdida de actividad del inhibidor de tripsina se observó cuando las albúminas fueron sometidas a 100 °C durante un periodo de 30 minutos, manteniendo más del 50 % de su actividad original, confirmando estos datos la termorresistencia de los inhibidores de tripsina de leguminosas reportada por numerosos investigadores (Tabla 3.4). Por lo tanto, el descenso de actividad del inhibidor de tripsina parece depender tanto de la temperatura aplicada como de la duración del tratamiento (Ziena *et al.*, 1991).

En los últimos años, se han utilizado procedimientos electroforéticos para la identificación de cadenas polipeptídicas resistentes a la acción de enzimas proteolíticas (Kleiner y Stetler-Stevenson, 1994; Hummel *et al.*, 1996). Dado que mediante esta técnica es posible visualizar los inhibidores de tripsina, incluso en muestras tan complejas como extractos o fracciones proteicas, se procedió a su desarrollo, con el objeto de reforzar las determinaciones cuantitativas de actividad inhibidora de tripsina realizadas previamente en la fracción de albúminas.

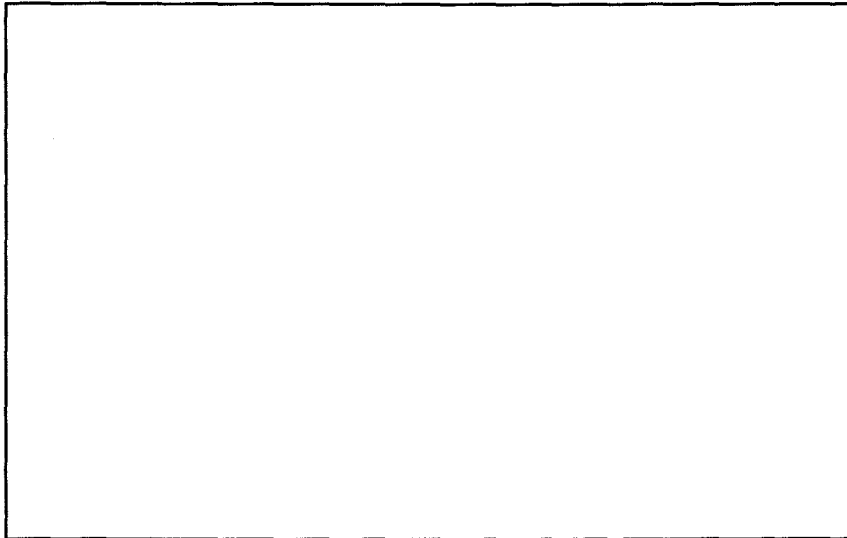
**Tabla 3.4.** Efecto del tratamiento térmico sobre la pérdida de actividad del inhibidor de tripsina en la fracción de albúminas de garbanzo.

Tratamiento térmico	% IT <sup>a</sup>
Sin tratamiento	71.0±1.3
60 °C 15 min	69.9±2.1
60 °C 30 min	69.7±1.4
80 °C 15 min	69.3±1.3
80 °C 30 min	59.6±1.4
100 °C 15 min	41.3±2.3
100 °C 30 min	39.7±3.1

Los datos son la media ±DS de tres muestras independientes

Mediante PAGE de la fracción de albúminas, sometida a incubaciones con tripsina, durante 30, 60, 90 y 120 minutos, se observó que los inhibidores de tripsina pueden identificarse entre una mezcla de proteínas quedando, a medida que transcurre el tiempo de

incubación, más evidentes. Finalmente, quedaron únicamente las bandas correspondientes a los inhibidores de tripsina (Figura 3.5).

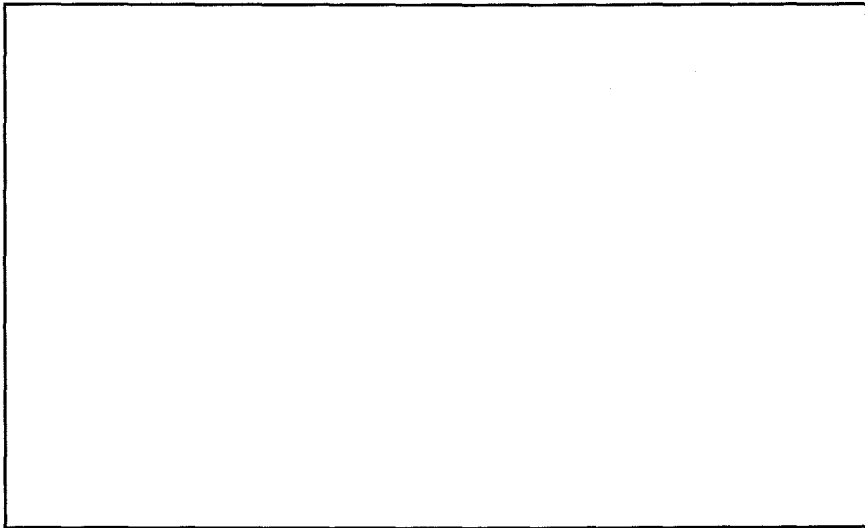


**Figura 3.5** Presencia de inhibidores de tripsina de garbanzo en electroforesis de poliacrilamida (PAGE) sometido a presencia de tripsina con diferentes tiempos de incubación.

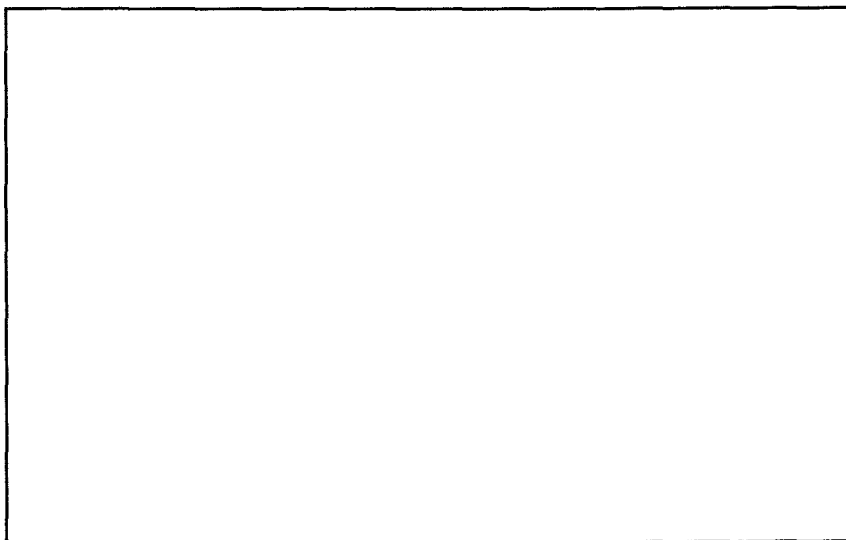
La estabilidad de los inhibidores de tripsina en condiciones desnaturalizantes ha sido descrita por diferentes investigadores (Kunitz, 1948; Baumgartner y Chrispeels, 1976). Por tanto, se realizó el mismo proceso de incubación descrito anteriormente para PAGE, en las condiciones desnaturalizantes descritas por Laemli (1970). Mediante PAGE-SDS se observaron bandas electroforéticas que mantenían su actividad biológica, pese a las condiciones severas de desnaturalización utilizadas, observándose la presencia de bandas proteicas resistentes a proteólisis, que presentaron pesos moleculares de KDa (Figura 3.6).

Con el objeto de estudiar si estos inhibidores mostraban sitios activos únicos para tripsina o bien presentaban sitios activos para ambos (tripsina y quimotripsina) se procedió a realizar, bajo las mismas condiciones, en baños separados, conteniendo las enzimas tripsina y quimotripsina como enzimas proteolíticas. Se observó que la incubación realizada con

quimotripsina presentaba bandas resistentes a proteólisis, coincidiendo las de peso molecular kDa con las observadas en las incubaciones realizadas con tripsina (Figura 3.7).



**Figura 3.6** Presencia de inhibidores de tripsina de garbanzo en electroforesis de poliacrilamida (PAGE-SDS) sometido a presencia de quimotripsina con diferentes tiempos de incubación.



**Figura 3.7** Presencia de inhibidores de quimotripsina de garbanzo en electroforesis de poliacrilamida (PAGE) sometido a presencia de tripsina con diferentes tiempos de incubación.

### 3.4 CONCLUSIONES

Se obtuvieron fracciones de globulinas y albúminas de garbanzo con contaminaciones cruzadas mínimas determinadas por sus perfiles cromatográficos y electroforéticos (Pasar a escala piloto dada la importancia nutricional de albúminas, aunque se deben inactivar inhibidores de proteasas).

Además, el incremento de la digestibilidad proteica *in vitro* de la semilla de garbanzo tras el procesado térmico parece no estar relacionado con la inactivación parcial del inhibidor de tripsina sino con un proceso de desnaturalización térmica, que provoca un aumento significativo en la digestibilidad de las globulinas. El contenido elevado de aminoácidos azufrados de los inhibidores de tripsina y su carácter termorresistente, podrían aumentar las deficiencias de dichos aminoácidos, disminuyendo, por tanto, la calidad nutricional de la semilla

### 5. BIBLIOGRAFÍA

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

Anderson, R.L.; Rackis, J.J.; Tallent, W.H. 1979. Biologically active substances in soy products. En: *Soy protein and human nutrition*. Ed Wilcke, H.L.; Hopkins, D.T.; Waggle, D.H. New York, Academic Press pp 209-233.

A.O.A.C. 1975. Biological evaluation of protein quality. En: "Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemist". Ed Horwitz, W. 12<sup>th</sup>. Washington DC.

Attia, R.S.; El-Tabey Shehata, A.M.; Aman, M.E.; Hamza, M.A. 1994. Effect of cooking and decortication on the physical properties, the chemical composition and the nutritive value of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Food Chemistry* 50: 125-131.

---

Bhatty, R.S. 1973. Extraction of non protein nitrogen from oil seed meal with different solvents. *Cereal Chem* 50: 329-336.

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

Bhatty, R.S. 1988. In vitro hydrolysis of pea, faba bean, and lentil meals and isolated protein fractions by pepsin and trypsin. *Can Inst Food Sci Technol J* 21: 66-73.

Birk, Y. 1996. Legume seed proteinase inhibitors-friends or foes?. Proc 2<sup>nd</sup> Conference of plant proteins from European crops. Nantes (Francia).

Birk, Y.; Smirnoff, P. 1992. Protein protease inhibitors from legume seeds and their significance in nutrition, pest control and medicine. Proc 1<sup>st</sup> Conference of plant proteins from European crops. Angers (Francia).

Bradbear, N.; Boulter, D. 1984. The use of enzymic hydrolysis *in vitro* to study the digestibility of some Phaseolus seed proteins. *Qual Plant-Plant Foods Hum Nutr* 34: 3-13.

Carbonaro, M.; Cappelloni, M.; Nicoli, S.; Lucarini, M.; Carnovale, E. 1997. Solubility-digestibility relationship of legume proteins. *J Agric Food Chem* 45: 3387-3394.

Casey, R.; Sanger, E. 1980. Purification and some properties of a 7S seed storage protein from Pisum (pea). *Biochem Soc Trans.* 8: 658.

Cerletti, F.; Fumagalli, A.; Venturin, D. 1978. Protein composition of seed of *Lupinus albus*. *J Food Sci* 43: 1409-1414.

Chavan, J.; Kadam, S.; Salunke, D. 1986. Biochemistry and technology of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 25: 107-158.

Chominot, A. 1992. Proc 1<sup>st</sup> European Conference on grain legumes, pp 529-538. Angers (Francia).



---

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

Croy, R.R.D.; Derbyshire, E.; Krishna, T.G.; Boulter, D. 1979. Legumin of *Pisum sativum* and *Vicia faba*. *New Phytol* 83: 29-35.

De Lumen, B.O. Molecular approaches to improve the nutritional and functional properties of plant seeds as food sources: developments and comments. *J Agric Food Chem* 38: 1779-1778.

Desphande, S.S.; Damodaran, S.D. 1989. Structure-digestibility relationship of legume 7S proteins. *J Food Sci* 54: 108-113.

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

Desphande, S.S.; Nielsen, S.S. 1987b. *In vitro* digestibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: the role of heat-stable protease inhibitors. *J Food Sci* 52: 1330-1334.

Duranti, M.; Restani, P.; Poniatowska, M.; Cerletti, P. 1981. The seed globulin of *Lupinus albus*. *Phytochem* 20: 2071-2075.

Elias, L.G.; De Fernández, D.G.; Bressani, R. 1979. Possible effects of seed coat polyphenolics on the nutritional quality of bean protein. *J Food Sci* 44: 524-527.

FAO/WHO/ONU. 1985. Energy and requirements. WHO, Geneva, Technical report series N° 724.

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

Gallardo, F.; Araya, H.; Tagle, M.A. 1974. Toxifactors in Chilean legumes. II. Trypsin inhibitor activities. *Arch Latin Nutr* 24: 183-189.

---

Ge, Y.C.; Morgan, R.G.H. 1993. The effect of trypsin inhibitor on the pancreas and small intestine of mice. *Brit J Nutr* 70: 333-345.

Genovese, M.I.; Lajolo, F.M. 1996a. Effect of protein-protein and protein-polyphenols interactions on bean proteins digestibility. 2<sup>nd</sup> Conference of plant proteins from European crops. Nantes (Francia).

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

Ghorpade, U.M.; Kadam, S.S.; Salunke, D.K. 1986. Thermal stability and changes in trypsin inhibitor during germination and cooking of horse gram. *J Food Sci Technol* 23: 164-168.

Grant, D.R.; Summer, A.K.; Johnson, J. 1976. An investigation of pea seed albumins. *Can Inst Food Sci Technol* 9: 84-91.

Godon, B.1996. *Proteines Végétales*. Ed Technique & Documentation. Lavoisier, París, France.

Griffiths, D.W. 1984. The trypsin and chymotrypsin inhibitor activities of various peas (*Pisum ssp.*) and field bean (*Vicia faba*) cultivars. *J Sci Food Agric* 35: 481-485.

Gueguen, J.1983. Legume seed protein extraction, processing and end product characteristics. *Qual Plant Plant Foods Hum Nutr* 32: 267-303.

Gueguen, J. 1991. Pea and fababean proteins. *Developments in Food Proteins*. Vol 7. pp 37-78.Ed. Hudson, B.J.F. Elsevier applied Science, London.

Gueguen, J.; Barbot, J. 1988. Quantitative and qualitative variability of pea (*pisum sativum* L.) protein composition. *J Sci Food Agric* 42: 209-224.

Gueguen, J.; Vu, A.T.; Shaeffer, F.1984. Large scale purification and characterization of pea globulins. *J Sci Food Agric*. 35: 1024-1033.

- 
- Hsu, H.W.; Vavak, D.L.; Satterlee, L.D.; Miller, G.A. 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J Food Sci* 42: 1269-1273.
- Hummel, K.M.; Penheither, A.R.; Gathman, A.C.; Lilly, W.W. 1996. *Anal Biochem* 233: 140-142.
- Jood, S.; Chauchan, B.M.; Kapoor, A.C. 1987. Polyphenols of chickpea and blackgram as affected by domestic processing and cooking methods. *J Sci Food Agric* 39: 145-149.
- Kakade, M.L. 1974. Biochemical basis for the differences in plant protein utilisation. *J Agric Food Chem* 22: 550-554.
- Kilara, J.E.; Damodaran, S.; German, B. 1985. Physicochemical and functional properties of oilseed proteins with emphasis on soy protein. En: "New Protein Foods", Vol 5, p 107. Ed. Altschul, A.M.; Wilcke, H. Academic Press. New York.
- Khokhar, S.; Chauchan, B.M. 1986. Effect of domestic processing and cooking on *in vitro* protein digestibility of moth bean. *J Food Sci* 51: 1083-1084.
- Kleiner, D.E.; Stetler-Stevenson, W.G. 1994. *Anal Biochem* 218: 325-329.
- Krogdahl, A.; Holm, H. 1979. Inhibition of human and rat pancreatic proteinases by crude and purified soybean proteinase inhibitors. *J Nutr* 109: 551-558.
- Laemli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*: 227: 680-685.
- Lanfer Márquez, U.M.; Lajolo, F.M. 1981. Composition and digestibility of albumin, globulin and glutelins from *Phaseolus vulgaris*. *J Agric Food Chem* 29: 1068-1074.
- Liener, I.E. 1976. A review: legume toxins in relation to protein digestibilities. *J Food Sci* 41: 1076-1081.

---

Liener, I.E. 1979. Significance for humans of biologically active factors in soybeans and other food legumes. *JAACS* 56: 121-128.

Liener, I.E. 1983. Removal by processing of naturally occurring toxicants and antinutrients. En: "Chemistry and world food supplies: the new frontiers". Ed Shemt, L.W. Pergamon Press, New York, USA pp 453-463.

Liener, I.E. 1989. Antinutritional factors in legume seeds: state of the art. En: Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds. Eds. Huisman, J.; Van der Poel, A.F.; Liener, I.E. Wageningen, The Netherlands; pp 6-13.

Liener, I.E.; Kakade, M.L. 1980. Protease inhibitors. En: Toxic constituents of plant foodstuffs. Ed Liener I.E.. Academic Press Inc New York, London pp 7-72.

Matsushita, K.; Uritani, I. 1976. Isolation and characterization of acid invertase inhibitor from sweet potato. *J Biochem* 79: 633-639.

Melito, C.; Tovar, J. 1995. Cell wall limit *in vitro* protein digestibility in processed legumes seeds. *Food Chem* 53: 305-307.

Moores, R.G.; Mc Dermott, D.L.; Wood, T.R. 1948. Determination of chlorogenic acid in coffee. *Anal Chem* 20: 620-624.

Murray, D.R.; Vairinhos, F. 1982. *Zeitschrift für Pflanzen-physiologie* 106: 465-468.

Murray, D.R.; Roxburgh, C. 1984. Amino acid composition of the seed albumins from chickpea. *J Sci Food Agric* 35: 893-897.

Newbigin, E.J.; DeLumen, B.O.; Chandler, P.M.; Gould, A.; Blagrove, R.J.; March, J.F.; Korth, A.A.; Higgins, T.S.V. 1990. Pea convicilin: structure and primary sequence of the protein and expression of a gene in seeds of transgenic tobacco. *Planta* 180: 461-470.

Newman, C.W.; Roth, N.R.; Newman, R.K.; Lockerman, R.H. 1987. Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Nutr Rep Int* 36: 1-5.

---

Osborne, T.B. 1924. The vegetable proteins. Ed. Longmans y Green. New York.

Padhye, V.W.; Salunke, D.K. 1979. Biochemical studies on blackgram (*Phaseolus mungo* L.) seeds. Amino acid composition and subunit constitution of fractions of the proteins. J Food Sci 44: 606-610.

Price, M.L.; Hagerman, A.E.; Butler, L.G. 1980. Tannin contents of cowpeas, chickpeas, pigeonpeas and mungbeans. J Agric Food Chem 28: 459-463.

Pusztai, A. 1972. Metabolism of trypsin-inhibitory proteins in the germinating seeds of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). Planta 107: 121-129.

Rao, P.U.; Belavady, B. 1980. Effect of different agronomic practices on the protein and vitamin content of Bengal gram (*Cicer arietinum* L.). Indian J Nutr Diet 17: 6-13.

Richardson, M. 1977. The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. Phytochem 16: 159-169.

Richardson, M. 1981. Protein inhibitors of enzymes. Food Chem 6: 235-253.

Richardson, M. 1991. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. Methods Plant Biochem 5: 259-305.

Salunke, D.K.; Kadam, S.S. 1989. CRC Handbook of World Food Legumes: Nutritional chemistry, processing technology and utilization. Vol I. CRC Press, Boca Ratón, FL.

Sastry, M.C.S.; Murray, D.R. 1987. The contribution of trypsin inhibitors to the nutritional value of chickpea seed protein. J Sci Food Agric 40: 253-261.

Sathe, S.K.; Iyer, V.; Salunkhe, D.K. 1981. Functional properties of the great northern bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins. Amino acid composition, in vitro protein digestibility, and application to cookies. J Food Sci 47: 8-12.

- 
- Schoeder, H.E. 1984. Major albumins of *Pisum cotyledons*. J Sci Food Agric 35:191-198.
- Siddiqui, S.H. 1983. A comparative study on albumins of chickpea and lentil cotyledons by chromatography on hydroxyapatite and electrophoresis in polyacrilamide gel. Pakisyan J Sci Ind Res 26(5): 294-299.
- Singh, K.B.; Bejiga, G.; Malhotra, R.S. 1993. Genotype-environment interactions from protein content in chickpea. J Sci Food Agric 63: 87-90.
- Singh, K.B.; Williams, P.C.; Nakkoul, H. 1990. Influence of growing season, location and planting time on some quality parameters of kabuli chickpea. J Sci Food Agric 53: 429-441.
- Singh, U. 1984. The inhibition of digestive enzymes by polyphenols of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). Nutr Rep Int 29: 745-753.
- Singh, U. 1985. Nutritional quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.): current status and future research needs. Qual Plant Plant Foods Hum Nutr 35: 339-351.
- Singh, U.; Jambunathan, R.D. 1981. Studies on desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars: levels of protease inhibitors, levels of polyphenolic compounds and *in vitro* protein digestibility. J Food Sci 46: 1364-1367.
- Singh, U.; Raju, S.M.; Jambunathan, R. 1981. Studies on desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. II. Seed protein fraction and amino acid composition. J Food Sci Technol 18: 86-88.
- Singh, U., Kumar, J.; Gowda, C.L. 1982. The protein content of chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by environment. Qual Plant Plant Food Hum Nutr 32: 179-184.
- Singh, D.K.; Rao, A.S.; Singh, R.; Jambunathan, R. 1988. Amino acid composition of storage protein of a promising chickpea (*Cicer arietinum*, L.). J Sci Food Agric 43: 373-379.
- Schroeder, H.E. 1984. Major albumins of *Pisum cotyledons*. J Sci Food Agric 35:191-198.

---

Smirnoff, P.; Khalef, S.; Birk, Y.; Applebaum, S.W. 1979. Trypsin and chymotrypsin inhibitor from chickpeas- selective chemical modifications of the inhibitor and isolation of two iso-inhibitors. *Int J Peptide Protein Res* 14: 186-192.

Swaisgood, H.E.; Catignani, G.L. 1991. Protein digestibility: *in vitro* methods of assessment. *Adv Food Nutr Res* 35: 185-236.

Tan, N.; Wong, K.; de Lumen, B.O. 1984. Relationship of tannin levels and trypsin inhibitor activity with the *in vitro* protein digestibility of raw and heat treated winged bean. *J Agric Food Chem* 32: 819-821.

Thank, U.H.; Shibasaki, K. 1976. Major protein of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization. *J Agric Food Chem* 24: 1117-1121.

Ulloa, J.A.; Valencia, M.E.; García, Z.H. 1988. 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* 43: 1396-1401.

Uzzan, A. 1989. Vegetable protein products from seeds: technology and uses in the food industry. pp. 73- 118. *Development Food Proteins*.

## **CAPITULO 4**



---

## CAPITULO 4: ALERGENICIDAD DE LAS PROTEÍNAS DE GARBANZO

### 4.1 INTRODUCCION

Se han realizado numerosos estudios referentes a alérgenos de una amplia variedad de fuentes, incluyendo a ácaros, insectos, polen, hongos y animales domésticos. Alrededor de 50 alérgenos han sido purificados de estas fuentes mediante técnicas bioquímicas (filtración en gel, cromatografía de intercambio aniónico e isoelectroenfoque) (Chapman, 1989). La mayoría corresponden a proteínas o glicoproteínas de bajo peso molecular (5 a 50 kDa). Aunque en los últimos años ha aumentado mucho el conocimiento de las regiones o zonas de unión a IgE (epítomos) incluyendo sus secuencias aminoacídicas, no se ha observado ningún patrón estructural que esté asociado a la formación de complejos antígeno-anticuerpo.

Hasta la fecha, se han realizado pocas investigaciones de alérgenos alimentarios, comparados a los de otras fuentes, que dan lugar a reacciones mediadas por IgE. Aas (1969) purificó un alérgeno de vainilla (Alérgeno M, *Gad c I*), utilizando este alérgeno purificado para realizar estudios con pacientes alérgicos. Se han descrito las proteínas ovalbumina (*Gad d II*) y ovotransferrina (*Gad d III*) de huevo de gallina como alérgenos alimentarios (Zangeland, 1982; Hoffman, 1983). Hoffman *et al.* (1981) describieron dos alérgenos en la gamba, antígenos I y II, con pesos moleculares de 21 y 38 kDa, respectivamente (Hoffman *et al.*, 1981). Recientemente, Nagpal *et al.* (1989) identificaron dos alérgenos termoestables de gamba, Sa I y Sa II, con pesos moleculares de 8.2 y 34 kDa, respectivamente.

En leguminosas, los estudios son muy escasos, siendo la especie más estudiada el cacahuete (*Arachys hipogaea*). Nordlee *et al* (1981) demostraron la presencia de alérgenos de cacahuete en diferentes productos, incluyendo entre éstos a la manteca y a la harina de cacahuete. Heiner y Neucere (1975) usaron la técnica RAST para demostrar la presencia de alérgenos en diferentes componetes de la semilla de cacahuete, incluyendo cotiledones y la envuelta seminal. Se han utilizado diferentes técnicas en la detección de alérgenos de cacahuete. Barnett *et al.* (1983) utilizaron CRIE para identificar 16 alérgenos. Mediante

electroforesis bidimensional han sido identificados 32 alérgenos de cacahuete. Mediante RAST y CRIE, el suero de 10 pacientes tuvieron reacción alérgica a arachin y conarachin I. Meier-Davis *et al.* (1987) identificaron 3 alérgenos principales, que tuvieron pesos moleculares de 15, 20 y 66 kDa. Mediante inhibición de RAST, Taylor *et al* (1982) demostraron que arachin y conarachin presentaban reacción alérgica. El resultados de todos estos estudios demuestran que hay diferentes alérgenos en cacahuete, siendo además una de las causas más comunes en las reacciones de hipersensibilidad inmediata alimentaria. Burks *et al* (1991) identificaron un componente alergénico principal de peso molecular 63.5 kDa y punto isoeléctrico de 4.55. Basado en la nomenclatura de la IUIS se denominó Ara h I.

El objetivo de este capítulo de determinar distintas fracciones proteicas con capacidad de anclaje a IgE así como estudiar los fenómenos de termorresistencia y reactividad cruzada existente en la familia de leguminosas. Por otro lado, mediante inmunoblotting determinar si la alergenidad cruzada existente entre lenteja, guisante y garbanzo es debida a proteínas diferentes.

## 4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.2.1 Pacientes alérgicos a garbanzo

Se analizaron muestras de ocho pacientes alérgicos a garbanzo, procedentes del Hospital Virgen de la Cinta (Huelva) y Hospital Policlínico (Sevilla), que mostraban test cutáneo positivo a diferentes leguminosas. Los pacientes mostraron sintomatología muy diversa, desde dermatitis y prúritos hasta procesos de anafilaxis. Se extrajeron 5 ml de sangre venosa, obteniéndose el suero mediante centrifugación.

### 4.2.2 Obtención de fracciones proteicas

Se han obtenido extractos proteicos crudos de garbanzo, guisante y lenteja según el apartado 3.2.1, así como las fracciones proteicas de globulinas y albúminas de garbanzo según el apartado 3.2.2.

### 4.2.3 Dot blotting

Este método se utilizó para la determinación de fracciones proteicas con capacidad de unión a IgE. Las muestras (2-5  $\mu$ l) se dispusieron en una membrana de nitrocelulosa de 0.45  $\mu$ m (Sigma Chemical Co.; San Louis, MO. USA). Tras el secado de las membranas, se bloquearon los centros activos restantes con 25 ml de 5% leche desengrasada en TBS (Bio-Rad Lab., Richmond, Calif.) durante 2 horas. Posteriormente, la membrana se lavó tres veces con TTBS (TBS con 0.05% de Tween 20), incubándose con suero humano (1: 1000-2000 vol/vol dilución) durante toda la noche a 4°C en una noria. Tras el periodo de incubación, la membrana se lavó tres veces con TTBS. La membranas se incubó con IgE antihumano conjugado con fosfatasa alcalina (1:1000 vol/vol TTBS), a temperatura ambiente en una noria durante dos horas. A continuación, se procedió a lavar la membrana dos veces con TTBS y una última con tampón borato 1M pH 8.3. La reacción de color se llevó a cabo con 50  $\mu$ l de nitro blue tetrazolium y 37,5  $\mu$ l de 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-fosfato en 10 ml de tampón borato 1 M pH 8.3, a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción se paró mediante un lavado con agua destilada durante un periodo de 15 minutos.

### 4.2.4 Electroforesis e inmunoblotting

El procedimiento electroforético se realizó según lo indicado en el apartado 3.2.3. Las proteínas se transfirieron del gel de poliacrilamida a una membrana de celulosa, utilizando un tampón de transferencia Tris-Glicina (25mM Tris, Glicina 192 mM, 20 % metanol, pH 8.3. El proceso de transferencia se realizó en una cubeta Mini Protean II system (Bio-Rad Lab.) durante 3 h a 400 mA. Para asegurarnos una transferencia efectiva se tiñó un blanco con Coomassie brilliant blue. A continuación se lavó la membrana con tampón TBS y se siguió el procedimiento citado en el apartado anterior para dot blotting.

### 4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificaron diferentes fracciones proteicas alergénicas de garbanzo, incluyendo las fracciones de albúminas y globulinas, mediante la técnica de dot blotting.

1	2	3	4
5	6	7	

**Figura 4.3.1** Detección de fracciones proteicas con capacidad de unión a Ig E, mediante la técnica de dot blotting: (1) extracto crudo; (2) globulinas, (3) albúminas, (4) legumin. 5 (PA2); 6(albúminas 2S); (7) control: BSA.

Se analizaron extractos proteicos de garbanzo procedentes de semillas sometidas a remojo y cocinado, observándose la termorresistencia que presentaban determinados alérgenos (Figura 4.3.2).

1	2
3	4

**Figura 4.3.2.** Detección de extractos proteicos procedentes de muestras procesadas con capacidad de unión a Ig E, mediante la técnica de dot blotting: (1) extracto proteico crudo, (2) procedente de semillas remojadas, (3) procedente de semillas cocinadas.

En un estudio realizado a 10 pacientes, la fracción correspondiente a PA2 a garbanzo y guisante presentaron reactividad cruzada, sin embargo la fracción 2S se mostró positiva únicamente a extractos procedentes de garbanzo (Tabla 4.1).

Paciente	PA2		Albuminas 2S	
	Garbanzo	Guisante	Garbanzo	Guisante

**Tabla 4.1.** Análisis mediante dot blotting de las fracciones PA2 y albúminas 2S procedente de garbanzo y guisante en 10 pacientes que presentaban test cutáneo positivo.

El inmunoblotting realizado con extractos crudos de garbanzo, guisante y lenteja mostró múltiples bandas con capacidad de unirse a IgE, mostrándose claramente la reacción cruzada que existe entre las tres leguminosas (Figura 4.1.3).

MPM	A			B		
	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)

**Figura X.** Análisis mediante PAGE-SDS de extractos crudos de garbanzo de garbanzo(1), guisante (2) y lenteja (3) teñidos con Coomasie brilliant blue (A) e inmunoblotting con IgE (B). MPM: marcadores de peso molecular.

#### 4.4 BIBLIOGRAFÍA

Aas, K. 1969. Antigen and allergens of fish. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 36: 152-155.

Barnett, D.; Baldo, B.A.; Howden, M.E.H. 1983. Multiplicity of allergens in peanuts. *J Allergy Clin Immunol* 72:61-68.

Burks, A.W.; Williams, L.W.; Helm, R.M.; Connaughton, C.; Cockrell, G.; O'Brien, T. 1991. Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *J Allergy Clin Immunol* 88: 172-179.

Chapman, M.D.; Purification of allergens. *Curr Opin Immunol* 1: 647-653.

Heiner, D.C.; Neucere, N.J.; RAST analyses of peanut allergens. *J Allergy Clin Immunol* 68: 376-382.

Hoffman, D. R. 1983. Immunochemical identification of the allergens in egg white. *J allergy Clin Immunol* 71: 481-486.

Hoffman, D.R.; Day, E.D.; Miller, J.S. 1981. *Ann Allergy* 47: 17-22.

Nagpal, S.; Rajappa, L.; Metcalfe, D.D.; Sabba Eao, P.V. 1989. Isolation and characterization of heat-stable allergens of shrimp. *Ann allergy* 83: 26-36.

Nordlee, J.A.; Taylor, S.L.; Jones, R.T.; Yunginger, J.W. Allergenicity of various peanut products as determined by RAST inhibition. *J Allergy Clin Immunol* 68: 376-382.

Zangeland, T.A. 1982. A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white. III. Allergen in hen's egg white studied by CRIE. *Allergy* 37: 521-524.

## **CAPITULO 5**



---

## CAPITULO 5: EFECTO DEL PROCESADO DOMESTICO SOBRE LA CALIDAD PROTEICA *IN VITRO* DE LA SEMILLA DE GARBANZO

### 5.1 INTRODUCCION

El efecto del procesado sobre la calidad proteica de las semillas de leguminosas ha sido estudiado por numerosos investigadores (Hashizume y Watanabe, 1979; Sheard *et al.*, 1986; Desphande y Damodaran, 1989; Carbonaro *et al.*, 1993). Sin embargo, la literatura disponible sobre los cambios producidos en la calidad proteica de la semilla de garbanzo es escasa, a pesar de estar afectada por los métodos de procesado (Singh, 1985). La semilla de garbanzo es procesada de muy diferentes formas, atendiendo a tradiciones culturales y culinarias de cada región. Los métodos de procesado utilizados (remojo, fermentación, cocción, decorticación, germinación, fritura, secado y tostado) reducen el contenido de factores antinutricionales e incrementan la digestibilidad proteica de la semilla de garbanzo mejorando, por tanto, su calidad nutricional (Attia *et al.*, 1994). Parámetros tales como temperatura, duración del tratamiento térmico y métodos de procesado parecen afectar a la calidad proteica de las semillas de leguminosas (Back *et al.*, 1979; Geervani y Theophilus, 1980) (Figura 5.1).

González *et al.* (1960) observaron, tras el cocinado de las semillas de garbanzo, un descenso en el contenido de aminoácidos esenciales, especialmente lisina, cistina y arginina. La utilización de autoclave (121 °C durante 1 hora) minimizó la pérdida de aminoácidos de las proteínas de garbanzo respecto al cocinado doméstico (Youseff, 1983). Por otro lado, la aplicación de elevadas temperaturas y una excesiva duración del tratamiento térmico provoca un descenso en la biodisponibilidad de lisina en las semillas de garbanzo (Rama Rao, 1974) y judías (Wu *et al.* 1994). Las reacciones de Maillard parecen ser las responsables de este descenso en los procesos de calentamiento de proteínas en presencia de grupos reductores.

El procesado térmico provoca la desnaturalización de las proteínas dando lugar a un proceso de agregación molecular y una disminución de la solubilidad proteica. Este efecto es mayor al aumentar la temperatura y el tiempo de aplicación del tratamiento. En el caso de proteínas oligoméricas, tales como las proteínas 11S y 7S de las leguminosas, el tratamiento

térmico provoca inicialmente una disociación de las distintas subunidades, teniendo lugar a continuación un proceso de reasociación de moléculas parcialmente desnaturalizadas, formándose complejos estables solubles e insolubles (Kinsella *et al.*, 1985).

El tratamiento térmico excesivo puede dar lugar a cambios moleculares con repercusiones importantes desde el punto de vista nutricional, tales como la formación de nuevos enlaces peptídicos entre las funciones reactivas puestas al descubierto por el desplegamiento de las moléculas proteicas y las procedentes de la ruptura de enlaces peptídicos preexistentes. De esta forma, pueden formarse enlaces entre el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina y el grupo carboxilo de los ácidos aspártico y glutámico, que dan lugar a isopéptidos no hidrolizables en el tracto gastrointestinal. Por otro lado, la destrucción de puentes disulfuro promueve la aparición de grupos carbonilo que pueden reaccionar con los grupos  $\epsilon$ -amino de la lisina mediante reacciones de Maillard, disminuyendo su biodisponibilidad (Gómez y de la Torre, 1989).

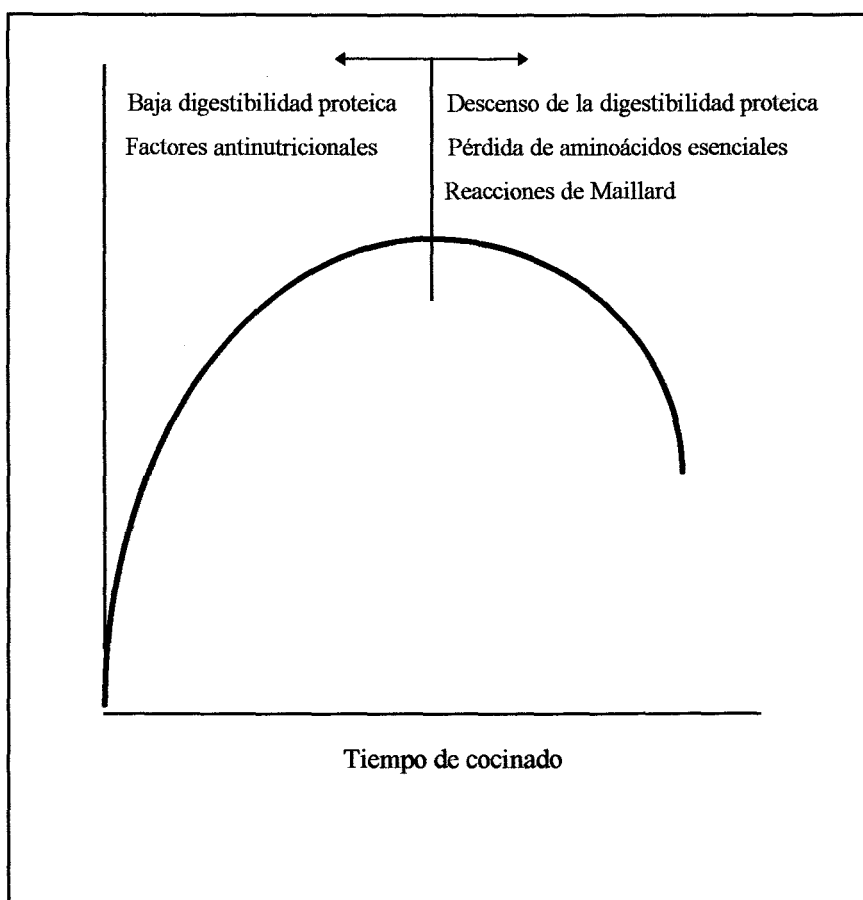


Figura X. Efecto del tiempo de cocinado sobre la calidad proteica

En la región mediterránea, el procesado del garbanzo consta de dos etapas: el remojo durante la noche y cocción posterior de las semillas, con el objeto de mejorar sus propiedades organolépticas y conseguir de esta forma un producto apto para el consumo directo. El objetivo de este capítulo es evaluar el efecto del procesado sobre el valor nutricional de las proteínas de garbanzo, incluyendo análisis de composición aminoacídica, digestibilidad proteica *in vitro* y solubilidad proteica. Éstos complementan a los aportados en el capítulo anterior referidos a tratamiento térmico, tales como los de termorresistencia de inhibidores de proteasas y digestibilidad proteica *in vitro* de las fracciones de albúminas y globulinas.

## 5.2 MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.2.1 Procesado de las muestras

Las semillas de garbanzo (20g) se sometieron a remojo en agua destilada (150 ml) durante un periodo de 12 horas, desechándose posteriormente el agua de remojo. Las semillas se cocinaron en agua destilada a 120 °C bajo presión, mediante un sistema digestor (1009 Digester Tecator, Hånågas, Sweden), utilizando una relación peso/volumen de 1/25. El procesado de las muestras se repitió tres veces con el objeto de asegurarnos la reproducibilidad de los datos.

### 5.2.2 Solubilidad proteica

Con el objeto de determinar la solubilidad proteica de las muestras originales y procesadas, se utilizó una relación harina: tampón fosfato pH 7.0, NaCl 0.5M de 1:20. La harina se agitó durante 5 horas a 25 °C, centrifugándose las muestras a 8000xg durante 15 minutos. Posteriormente, se analizó el contenido en nitrógeno del sobrenadante mediante el método Kjeldahl, calculándose la solubilidad proteica de las muestras respecto al nitrógeno proteico total de la semilla.

### 5.2.3 Metodología analítica.

La determinación del contenido de polifenoles, análisis de aminoácidos y digestibilidad proteica *in vitro* se determinó en la forma descrita en los apartados 2.2.9, 3.2.6 y 3.2.7, respectivamente. El tratamiento térmico de las fracciones de globulinas y albúminas según el apartado 3.2.8, mientras que la cromatografía de filtración en gel es descrita en el apartado 3.2.5.

### 5.2.4 Análisis estadístico

Los datos se sometieron a análisis de varianza, calculándose el valor LSD (0.05 de significación) para identificar medias significativamente diferentes mediante el test de Tuckey.

## 5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.3.1 Contenido proteico

El remojo de las semillas no provocó pérdidas en el contenido proteico de las mismas. Sin embargo, el cocinado causó una reducción significativa del contenido proteico, principalmente en la fase final del mismo (3.4%) (Tabla 5.1). La presencia de proteínas en el agua de cocinado podría ser debido a la rotura parcial de la semilla y posterior solubilización de las mismas en el medio. Attia *et al.* (1994) obtuvieron valores similares tras el cocinado de las semillas (1.3-4.1%).

### 5.3.2 Composición de aminoácidos

El tratamiento térmico de las semillas de garbanzo causó un descenso en los contenidos de los aminoácidos metionina, cisteína, lisina, arginina, tirosina y leucina, siendo más pronunciado en cisteína (15.0 %) y lisina (13.2 %). Youssef (1983) observó pérdidas similares en lisina, pudiendo ser debido a las reacciones de Maillard que se producen entre los grupos

$\epsilon$ -amino libres y grupos carbonilo presentes en la semilla. El primer compuesto relativamente estable formado en la reacción de Maillard parece ser el 1-deoxy-2-cetosa (lisina-frutosa), que no es hidrolizado por las enzimas digestivas disminuyendo, por tanto, la biodisponibilidad de la lisina (Hodge, 1953; Finot, 1973). El tratamiento térmico aplicado a las semillas de leguminosas pueden causar pérdidas importantes en los aminoácidos metionina y cisteína (Shemer y Perkins, 1975; Youseff *et al.*, 1986). Geervani y Theophilus (1980) reportaron pérdidas superiores en aminoácidos azufrados (22-26 %) respecto a las observadas en este estudio, pudiendo ser debido al excesivo calentamiento de las muestras.

**Tabla 5.1.** Pérdidas en el contenido proteico (%) de la semilla de garbanzo a lo largo del proceso de cocinado.

Tiempo de cocinado (min)	Dureza sensorial	Pérdidas en el contenido proteico
10	Muy dura	ND <sup>1</sup>
20	Dura	ND <sup>1</sup>
30	Parcialmente blanda	0.6±0.1
40	Blanda	2.8±0.2
50	Cocinada	3.4±0.4

Los datos están referidos al 100% proteico de las semillas crudas. Cada valor es la media  $\pm$  DS de tres determinaciones independientes. <sup>1</sup>No detectado.

Las pérdidas de lisina (13.2 %) tras el cocinado de las semillas fueron significativamente superior a las observadas en las fracciones de albúminas (7.7%) y globulinas (6.0%) tras someterlas a tratamiento térmico. Este hecho puede ser atribuido a las reacciones de Maillard producidas entre los grupos  $\epsilon$ -amino y los compuestos reductores presentes en la semilla de garbanzo.

Con objeto de reducir la pérdida de aminoácidos esenciales, es necesario optimizar la temperatura y tiempo de duración del procesado, ya que el cocinado prolongado de las leguminosas puede dar lugar a la destrucción y racemización de tales aminoácidos (Salunke *et al.*, 1985). Además, el excesivo calentamiento puede conducir a la formación de enlaces amida entre las cadenas de aminoácidos, reduciendo la calidad nutricional de las semillas (Shemer y Perkins, 1975).

Durante el proceso de remojo y cocinado se observó un importante descenso ( %) en el contenido de polifenoles de la semilla, pudiendo ser debido a su salida hacia el agua de cocinado a favor del gradiente de concentración o bien a su interacción con otros componentes de la semilla que dificultan su extracción (Jood *et al.*, 1987; Lanfer Marquez y Lajolo, 1990)(Tabla 5.3). Esta disminución es similar a la reportada por Attia *et al.* (1984), siendo superior a la obtenida en otras leguminosas (Ologhobo y Fetuga, 1984; Tan *et al.*, 1984). El aumento de digestibilidad proteica *in vitro* observada podría deberse, parcialmente, al descenso en el contenido de polifenoles de la semilla durante el procesado, ya que existe una correlación negativa altamente significativa entre dicho contenido y la digestibilidad proteica *in vitro* (Singh y Jambunathan, 1981).

El cocinado de las semillas redujo muy significativamente la solubilidad de las proteínas de garbanzo (91%) (Tabla 5.5). Como consecuencia del tratamiento térmico, tiene lugar un proceso de desnaturalización que conlleva a la formación de agregados proteicos. Carbonaro *et al.* (1993) observaron que la estabilización de estos complejos era debido a la interacción electrostática de residuos de aminoácidos con cargas opuestas: lisina/arginina y aspártico/glutámico. La formación de estos agregados hacen que a pH 12 únicamente el 45%

de las proteínas de garbanzo sean solubles, mientras que en judías el nivel de proteínas solubles sea superior al 80% (Carbonaro *et al.*, 1997). Estos autores sugieren que la desprotonación de arginina (pKa=12.5) juega un papel crítico en la solubilización de las proteínas de garbanzo tras el proceso de agregación que se produce tras el calentamiento de las semillas. Además, el elevado contenido de este aminoácido en las proteínas del garbanzo parece apoyar la tesis del papel que juega en los fenómenos de asociación-disociación de los agregados proteicos.

**Tabla 5.2.** Composición aminoacídica<sup>1</sup> de semillas de garbanzo procesadas (remojo y cocinado).

Aminoácidos	Semilla cruda	Semilla remojada	Semilla cocinada	FAO <sup>2</sup>
Ácido aspártico	12.92±0.31	12.85±0.19	12.81±0.26	
Ácido glutámico	18.10±0.27	18.20±0.32	18.03±0.31	
Serina	6.60±0.23	6.61±0.14	6.60±0.15	
Histidina	2.94±0.12	2.89±0.19	2.81±0.10	
Glicina	4.40±0.08	4.37±0.10	4.33±0.07	
Treonina	4.51±0.11	4.50±0.07	4.34±0.13	3.4
Arginina	13.20±0.29	13.10±0.21	12.43±0.26 <sup>a</sup>	
Alanina	4.30±0.07	4.26±0.04	4.21±0.10	
Tirosina	3.30±0.11	3.28±0.07	3.12±0.14	
Valina	4.83±0.14	4.73±0.10	4.54±0.12	3.5
Metionina	1.75±0.05	1.68±0.03	1.62±0.04	2.5 <sup>3</sup>
½ Cistina	1.54±0.09	1.50±0.05	1.31±0.06 <sup>a</sup>	
Isoleucina	5.04±0.08	4.99±0.07	4.87±0.10	2.8
Leucina	9.32±0.14	9.18±0.10	8.98±0.16 <sup>a</sup>	6.6
Fenilalanina	6.34±0.10	6.27±0.07	5.91±0.11 <sup>a</sup>	6.3 <sup>4</sup>
Lisina	8.28±0.14	8.21±0.11	7.19±0.19 <sup>a</sup>	5.8

Cada valor es la media ± DS de tres determinaciones independientes. <sup>1</sup>Gramos de aminoácido por 100 gramos de proteína. <sup>2</sup>FAO (1985). <sup>3</sup>Met+ Cys. <sup>4</sup>Tyr+Phe. <sup>a</sup>Significativamente diferentes (P<0.05) respecto a su control.

**Tabla 5.3.** Composición<sup>1</sup> de aminoácidos esenciales de las fracciones de globulinas y albúminas en su estado nativo y sometidas a tratamiento térmico.

Aminoácidos	Globulina nativa	Globulina calentada	Albúmina nativa	Albúmina calentada	FAO <sup>2</sup>
Treonina	3.47±0.09	3.42±0.06	6.04±0.08	5.73±0.08	3.4
Tirosina	2.99±0.03	2.91±0.05	3.74±0.07	3.73±0.07	
Valina	5.54±0.14	5.52±0.09	5.22±0.10	5.15±0.08	3.5
Metionina	1.72±0.07	1.61±0.10	3.24±0.11	3.14±0.09	2.5 <sup>3</sup>
½ cistina	1.01±0.08	0.72±0.11 <sup>a</sup>	2.84±0.14	2.63±0.10 <sup>a</sup>	
Isoleucina	5.73±0.14	5.61±0.07	5.34±0.10	4.93±0.06 <sup>a</sup>	2.8
Leucina	9.42±0.26	9.21±0.14	7.47±0.12	6.84±0.08 <sup>a</sup>	6.6
Fenilalanina	6.67±0.11	6.54±0.11	4.93±0.10	4.45±0.07 <sup>a</sup>	6.3 <sup>4</sup>
Lisina	7.67±0.09	7.21±0.07 <sup>a</sup>	10.78±0.06	9.95±0.05 <sup>a</sup>	5.8

Cada valor es la media ± DS de tres determinaciones independientes. <sup>1</sup>Gramos de aminoácido por 100 gramos de proteína. <sup>2</sup>FAO (1985). <sup>3</sup>Met+ Cys. <sup>4</sup>Tyr+Phe. <sup>a</sup>Significativamente diferentes (P<0.05) respecto a su control.

Los análisis mediante FPLC de las proteínas solubles de semillas crudas y cocinadas revelaron que las principales fracciones proteicas solubles tras el cocinado tuvieron pesos moleculares de 71 kDa y 42 kDa, indicando que los agregados proteicos formados tras el cocinado presentan una solubilidad baja (Figura 5.2). Además, los resultados sugieren que la fracción soluble de las semillas cocinadas presentan pesos moleculares inferiores respecto a los de las semillas crudas, estando ausentes las proteínas 7S y 11S pertenecientes a la fracción de globulinas. Por otro lado, la formación de macrocomplejos proteicos de naturaleza insoluble parece no afectar la accesibilidad a sitios susceptibles de sufrir proteolisis por parte de los enzimas digestivos debido al aumento observado en la digestibilidad proteica *in vitro* de las semillas cocinadas.



**Tabla 5.4.** Descenso en el contenido de polifenoles ( $\text{gr kg}^{-1}$  de garbanzo) durante el procesado de la semilla de garbanzo.

Tiempo de cocinado (min)	Dureza sensorial	Contenido de polifenoles	Pérdidas <sup>1</sup> (%)
0	Muy dura	2.14±0.12	-
10	Muy dura	1.91±0.01	10.8
20	Dura	1.77±0.02	17.2
30	Parcialmente blanda	1.48±0.05	30.6
40	Blanda	1.16±0.03	45.8
50	Cocinada	1.06±0.03	50.2

Cada valor representa la media  $\pm$  DS de tres determinaciones independientes. <sup>1</sup>Referido al contenido total de polifenoles de la semilla de garbanzo.

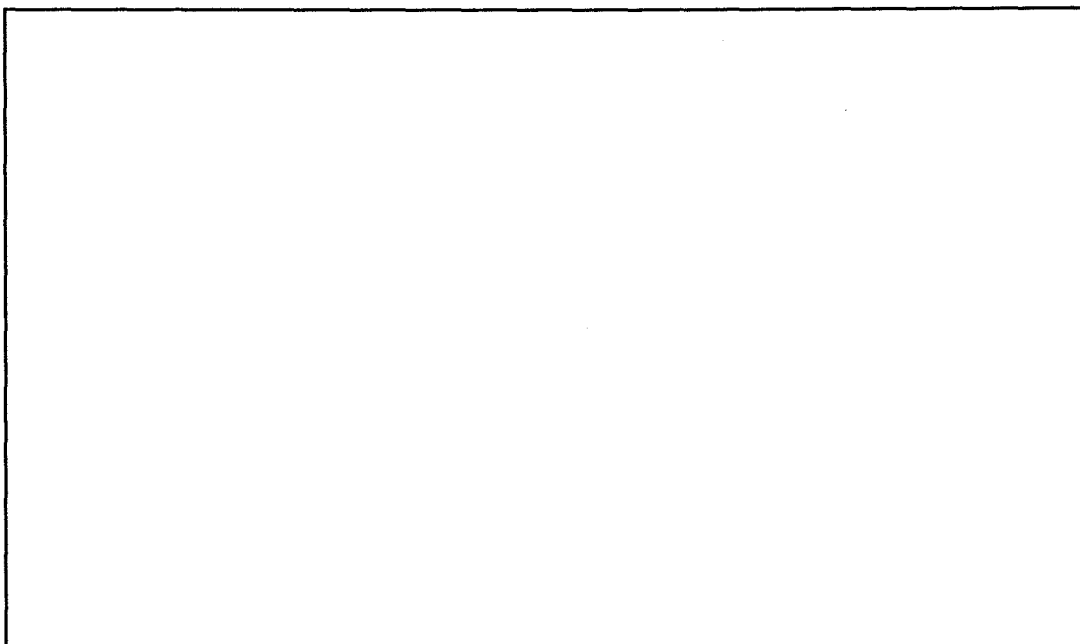
En resumen, el cocinado de las semillas de garbanzo a 120 °C, previo remojo de las mismas, no causó cambios importantes en su calidad proteica *in vitro*. Sin embargo, el descenso en el contenido de aminoácidos esenciales, principalmente azufrados y lisina, deben ser tenidos en cuenta con el objeto de optimizar, en la medida de lo posible, las condiciones de procesado. La determinación de los cambios estructurales producidos en las proteínas durante el procesado de la semilla de garbanzo junto con las interacciones que ocurren entre éstas y los distintos componentes de la semilla debe ser acometido en próximas investigaciones

**Tabla 5.5.** Efecto del procesado sobre la digestibilidad proteica *in vitro* y solubilidad de las proteínas de garbanzo.

	<b>Semilla cruda</b>	<b>Semilla remojada</b>	<b>Semilla cocinada</b>
<b>Digestibilidad</b>	71.8±1.0	73.2±0.9	83.5±1.3 <sup>a</sup> (+14.1)
<b>Solubilidad</b>	43.0±3.0	45.8±0.3	3.9±0.2 <sup>a</sup> (-91.0)

Cada valor es la media ± DS de tres determinaciones independientes. En paréntesis se muestra el aumento (+) o descenso (-) respecto a la semilla no procesada. <sup>a</sup>Significativamente diferente (P<0.05) respecto a la semilla no procesada.

**Figura 5.2.** Análisis mediante FPLC de las fracciones proteicas solubles extraídas con en semillas crudas y cocinadas



---

## 5.4 BIBLIOGRAFÍA

Attia, R.S.; El-Tabey-Shehata, M.A.; Aman, M.E.; Hamza, M.A. 1994. Effect of cooking and decortication on the physical properties, the chemical composition and the nutritive value of chickpea (*C. arietinum* L.). *Food Chem* 50: 125-131.

Back, J.F.; Oakenfull, D.; Smith, M.B. 1979. Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and poyols. *Biochem* 18: 5191-5196.

Carbonaro, M.; Vecchini, P.; Carnovale, E. 1993. Protein solubility of raw and cooked beans (*Phaseolus vulgaris*): role of the basic residues. *J Agric Food Chem* 41: 1169-1175.

Carbonaro, M.; Cappelloni, M.; Nicoli, S.; Lucarini, M.; Carnovale, E. 1997. Solubility-digestibility relationship of legume protein. *J Agric Food Chem* 45: 3387-3394.

Desphande, S.S.; Damodaran, S. 1989. Heat-induced conformational changes in phaseolin and its relation to proteolysis. *Biochim Biophys acta* 998: 179-188.

FAO/WHO/ONU. 1985. Energy and requirements. WHO, Genova. Technical report series nº 724.

Finot, P.A. Non-enzymic browning. En: *Proteins in human nutrition*. Eds. Porter, J.W.; Rolls, J.W. Academic Press. London. UK pp 501-514.

Geervani, P.; Theophilus, F. 1980. Effect of home processing on the protein quality of selected legumes. *J Food Sci* 45: 707-710.

Gómez, J.M., de la Torre, M.C. 1989. Influencia de la tecnología en el valor nutritivo de los alimentos. I. Proteínas. *Alimentaria*: 15-21.

González, A.; Wilda, H.; Martínez, W.H.; Frampton, U.L. 1960. Effect of autoclaving on the basic amino acids and proteins of chickpea. *J Agric Food Chem* 8: 331-334.

- 
- Hashizume, K.; Watanabe, T. 1979. Influence of heating on conformational changes of soybean proteins. *Agric Biol Chem* 43: 683-690.
- Hodge, J.E. 1953. The chemistry of browning reactions. *J Agric Food Chem* 1: 928-943.
- Jood, S.; Chauchan, B.M.; Kapoor, A.C. 1987. Polyphenols of chickpea and blackgram as affected by domestic processing and cooking methods. *J Sci Food Agric* 39: 145-149.
- Kinsella, J.E.; Damodaran, S.; German, B. 1985. Physicochemical and functional properties of oilseed proteins with emphasis on soy proteins. En: *New Protein Foods*. Eds. Altschul, A.M.; Wilcke, H.L. academic Press. New York. pp 107-179.
- Lanfer Marquez, U.M.; Lajolo, F.M. 1990. Nutritional value of cooked beans (*Phaseolus vulgaris*) and their isolated major protein fractions. *J Sci Food Agric* 53: 235-242.
- Rama Rao, G. 1974. Effect of heat on the proteins of groundnut and bengal gram. *Ind J Nutr Diet* 11: 268-272.
- Salunke, D.K.; Kadam, S.S.; Chavan, J.K. 1985. *Postharvest biotechnology of food legumes*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Sheard, P.R.; Fellows, A.; Ledward, D.A.; Mitchell, J.R. 1986. Macromolecular changes associated with the heat treatment of soya isolate. *J Food Technol* 21: 55-60.
- Shemer, M.; Perkins, E.G. 1975. Degradation of methionine in heated soybean protein and the formation of  $\beta$ -methyl mercaptopropionaldehyde. *J Agric Food Chem* 23: 201-205.
- Singh, U. 1985. Nutritional quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.): current status and future research needs. *Qual Plant Plant Foods Hum Nutr* 35: 339-351.
- Singh, U., Jambunathan, R.D. 1981. Studies on desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars: levels of protease inhibitors, levels of polyphenolic compounds and *in vitro* protein digestibility. *J Food Sci* 46: 1364-1367.

---

Tan, N.; Wong, K.; de Lumen, B.O. 1984. Relationship of tannin levels and trypsin inhibitor activity with the *in vitro* protein digestibility of raw and heat treated winged bean. *J Agric Food Chem* 32: 819- .

Van der Poel, A.F.B. 1990. Effect of processing on antinutritional and protein nutritional value of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). A review. *Animal Feed Sci Tech* 29: 179-208.

Wu, W.; Williams, M.E.; Kunkel, M.E.; Acton, J.C.; Warlaw, F.B.; Huang, Y.; Grimes, L.W. 1994. Thermal effects on *in vitro* protein quality of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Food Sci* 59: 1187-1191.

Youseff, A.R. 1983. Effect of cooking on tryptophan, basic amino acids, protein digestibility and retention of some vitamins in two varieties of chickpea. *Food Chem* 11: 139-143.

Yousseff, M.M.; Hamza, M.A.; Abd El-Aal, M.H.; Shekib, L.A.; El-Banna, A.A. 1986. Amino acid composition and *in vitro* digestibility of some egyptian foods made from faba bean (*Vicia faba* L.). *Food Chem* 22: 225-233.

Ziena, H.M.; Yousseff, M.M.; El-Mahdy, A.R. Amino acid composition and some antinutritional factors of cooked faba beans (Medammis): effects of cooking temperature and time.

## **CAPITULO 6**

## 6. CARACTERIZACIÓN DEL AISLADO PROTEICO DE GARBANZO

### 6.1 INTRODUCCIÓN

Los aislados proteicos vegetales son ingredientes alimenticios, utilizados por la industria alimentaria desde la década de los 70, de gran calidad y elevado contenido proteico, superior al 90 %. Para su obtención, se han aplicado diferentes métodos, aunque todos ellos encaminados a la eliminación de componentes no proteicos, fundamentalmente fibra, carbohidratos y polifenoles. El procedimiento más ampliamente utilizado en la preparación de aislados proteicos de leguminosas es la precipitación isoelectrica (Figura 6.1). Ésta consta de varias fases: en primer lugar, la grasa es eliminada mediante extracción con hexano; a continuación, las proteínas y carbohidratos son extraídos mediante una solución básica (pH 8-11), eliminándose el material insoluble por centrifugación. Posteriormente, las proteínas son precipitadas por adición de ácido hasta alcanzar el punto isoelectrico (pI) y son lavadas con objeto de eliminar los carbohidratos solubles residuales, sales, polifenoles y otros compuestos minoritarios.

Otro procedimiento utilizado, aunque en menor medida, para la obtención de aislados proteicos, es la micelación de proteínas. La adición a un extracto proteico, de agua fría (4 °C) a pH 7 provoca la precipitación de las proteínas, disponiéndose éstas en una estructura de tipo micelar, previo a su secado. En este proceso de micelación, la asociación proteína-proteína se encuentra favorecida por la reducción de la fuerza iónica de las muestras, pudiendo ser las interacciones hidrofóbicas muy importantes en la estabilización de estos aislados (Murray et al., 1981; Paredes-Lopez et al., 1991).

#### 6.1.1 Valor nutricional de los aislados proteicos vegetales

Desde la década de los 70, la industria alimentaria ha utilizado aislados proteicos vegetales como fuente de proteínas en formulaciones infantiles para intolerantes lácticos. Tradicionalmente, a estas formulaciones infantiles se les ha adicionado metionina con el objeto de aumentar su contenido en aminoácidos azufrados y así alcanzar los requerimientos

de la FAO (1985). En este sentido, Fomon *et al.* (1979) demostraron que las formulaciones infantiles que contienen aislados de soja enriquecidos con metionina presentaban resultados similares a los obtenidos mediante la ingesta de leche de vaca, desde el punto de vista de balance de nitrógeno. Estudios posteriores llevados a cabo por estos investigadores ( Fomon *et al.*, 1984) mostraron que, debido a la apropiada composición de aminoácidos del aislado de soja, el enriquecimiento mediante metionina era innecesario utilizando niveles de proteína superiores a 1.8 g / 70 Kcal. Otros estudios realizados en población adulta muestran que el aislado proteico de soja satisface los requerimientos en aminoácidos esenciales (FAO, 1985) bien utilizándose como única fuente de proteínas o combinada con otras fuentes proteicas de alta calidad, tales como el garbanzo u otras leguminosas (Wayler *et al.*, 1983; Young *et al.*, 1984).

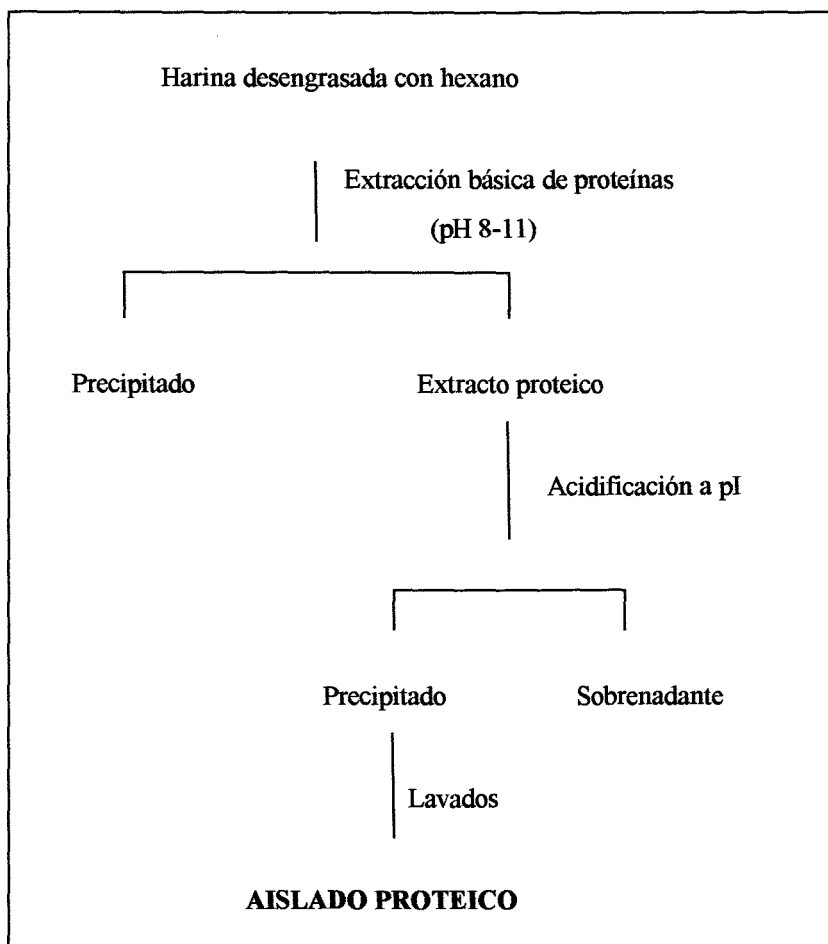


Figura 6.1. Proceso de obtención de aislados proteicos mediante precipitación isoeléctrica.



### 6.1.2 Propiedades funcionales de los aislados proteicos vegetales

Las propiedades funcionales de los aislados proteicos son consecuencia de las interacciones de las proteínas con otros componentes (proteína-proteína, proteína-lípidos y proteína-agua, principalmente), determinando su utilización como ingrediente proteico en un sistema de alimentos. El tipo de interacción va a depender en gran medida de la estructura de las proteínas que componen el aislado: secuencia y disposición de aminoácidos, tamaño molecular, forma, conformación y flexibilidad, carga superficial neta e hidrofobicidad (Kinsella, 1981).

Tras remover una suspensión acuosa de proteínas mediante agitación o burbujeo, quedan atrapadas en ésta burbujas de aire, las cuales quedan rodeadas por una capa líquida. Debido a la presencia de proteínas, la tensión interfacial entre agua y aire disminuye. La buena capacidad espumante de los aislados proteicos parece depender de la afinidad de las proteínas por la interfase líquido-aire y de su capacidad de desnaturalizarse y formar capas de suficiente viscosidad y fuerza mecánica como para prevenir la coalescencia y ruptura de las burbujas (Mc Watters y Cherry, 1981). Además, las proteínas son buenos agentes emulsionantes debido a la ya mencionada reducción de la tensión interfacial, la formación de films rígidos interfaciales y la presencia de grupos cargados. (Waniska *et al.*, 1981; Lee y López, 1984)

### 6.1.3 Aplicaciones de los aislados proteicos

En la actualidad, los aislados proteicos vegetales son utilizados de forma muy diversa en el campo de la industria alimentaria debido a que ofrecen numerosas ventajas, de tipo económico, nutricional y/o funcional, manteniendo las cualidades sensoriales necesarias para ser aceptadas por el consumidor. El aislado vegetal más utilizado es el procedente de la soja, encontrándose en forma de polvo, fibra o gránulo, atendiendo a las características apropiadas de cada aplicación. Así, los aislados proteicos pueden ser utilizados para la elaboración de productos cárnicos tales como salchichas, bacon, etc., siendo su presencia beneficiosa para personas con elevado contenido de colesterol y triglicéridos en sangre

debido a su efecto hipolipidémico *per se*. En otras ocasiones, los aislados proteicos reemplazan a la caseína en la elaboración de quesos, bebidas y productos panaderos. Además, su utilización también puede ir dirigida a la mejora nutricional de un determinado producto, tal como ocurre en el caso de su aplicación en fórmulas infantiles, productos dietéticos, equilibrados o de alto contenido proteico. En el caso de pacientes alérgicos infantiles los aislados pueden ser utilizados como sustitutos de la leche de vaca. Otras aplicaciones están encaminadas a la mejora de propiedades funcionales; en este sentido, los aislados proteicos están siendo utilizados para clarear el color y mejorar la textura de carne de aves y salsas, mejorar la estabilidad emulsionante y/o espumante de muy diferentes productos, incrementar la capacidad de hidratación de productos panaderos, etc. (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Aplicaciones del aislado proteico de soja en la industria alimentaria.

Tipo de producto	Valor nutricional	Valor funcional	Valor económico
Bacon		x	x
Patés de hígado	x	x	x
Postres congelados	x	x	
Sopas y salsas		x	x
Fórmulas infantiles	x	x	x
Productos dietéticos	x	x	x
Leche de soja	x		x
Panadería		x	
Productos cárnicos	x	x	x
Volatería	x	x	x
Bebidas energéticas	x		x
Productos del mar	x	x	x

## 6.2 MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.2.1 Preparación del aislado proteico

La harina de garbanzo se desengrasó durante 9 h en un sistema soxhlet con hexano. Se extrajeron 1000 gramos de harina de garbanzo desengrasada durante 1 h en 10 litros de 0.25% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> pH 10.5 con el objeto de evitar el oscurecimiento del producto final. Tras su centrifugación a 8000xg durante 15 minutos, se realizaron dos extracciones adicionales llevadas a cabo con la mitad del volumen. Los sobrenadantes se reunieron, analizándose el nitrógeno presente. El pH de la fracción soluble se ajustó a su punto isoeléctrico (pI 4.3) y el precipitado formado, tras su decantación durante 12 horas, fue centrifugado y lavado sucesivamente con agua destilada a pH 4.3, etanol y acetona, y secado posteriormente a temperatura ambiente.

### 6.2.2 Análisis de las propiedades funcionales: solubilidad, absorción de agua, absorción de grasa y capacidad emulsionante.

La solubilidad proteica de las muestras de harina y aislado de garbanzo se midieron en una solución 0.1 M NaCl pH 7.0, utilizándose una relación harina:tampón de 1:20 (Morr *et al.*, 1985). La solución se agitó durante 5 h a 25°C y, posteriormente, se centrifugó a 8000xg durante 15 min. El contenido en nitrógeno del sobrenadante se analizó mediante el método microKjeldahl (1975).

La absorción de agua se determinó siguiendo el método de Sosulski (1962). Las muestras (3 g) se mezclaron con 25 ml de agua destilada y se sometieron a seis agitaciones de 1 min, en intervalos de espera de 10 min entre ellas. La mezcla obtenida se centrifugó a 1000xg durante 25 min, el sobrenadante se desechó, y el precipitado se calentó en un horno a 50 °C durante 25 min para eliminar el resto de agua no absorbida. La absorción de agua se definió como gramos de agua absorbida por 100 gramos de muestra.

La determinación de absorción de grasa y capacidad emulsionante se realizó mediante el método de Lin *et al.* (1974). Las muestras (0.5 g) se mezclaron con 6 ml de

aceite de soja, dejándose un período de reposo de 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 1600xg durante 25 minutos, y se pesó el precipitado. La absorción de grasa se definió como gramos de grasa absorbida en 100 gramos de muestra.

Se utilizaron 2.5 g de aislado proteico para la determinación de la capacidad emulsionante, a los que se añadieron 45 ml de agua bidestilada. Tras agitar la solución durante 15 minutos, se adicionó 1.5 g de NaCl y 25 g de aceite de soja. La mezcla resultante se agitó durante 1 hora y se calentó durante 15 minutos a 85 °C. Tras enfriar la muestra, ésta se centrifugó a 1500g durante 15 minutos, midiéndose el volumen de aceite separado. Los resultados se expresaron como porcentaje en peso de aceite emulsionado.

### 6.2.3 Punto isoelectrico (pI)

Para la determinación del punto isoelectrico, se extrajeron dos veces la harina y el aislado proteico de garbanzo (20 gramos) con 200 ml de NaOH 1N mediante agitación durante 2 horas a temperatura ambiente, y las muestras fueron posteriormente centrifugadas a 4000xg durante 20 min. Se tomaron alícuotas del sobrenadante (40 ml) para la precipitación de las proteínas a diferentes pHs, de 2.0 a 7.0 en intervalos de 0.5 unidades de pH, ajustándose el mismo con HCl 0.5M durante 1 h mediante agitación a temperatura ambiente. Las alícuotas se centrifugaron a 4000xg durante 30 min midiéndose el contenido en nitrógeno de los distintos sobrenadantes. Para la determinación del punto isoelectrico, se calcularon los porcentajes de nitrógeno en los sobrenadantes en relación al nitrógeno total extraído.

## 6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.3.1 Composición química

En la tabla 6.2 se presentan, a modo comparativo, los datos referentes a la composición química de la harina y del aislado proteico del garbanzo, el cuál ha sido utilizado como material de partida en los distintos procesos hidrolíticos llevados a cabo en

este estudio. A pesar de la extracción con hexano de la harina de garbanzo, el aislado proteico presenta ciertos niveles de lípidos (1%), principalmente de naturaleza polar (Sánchez-Vioque *et al.*, 1997), que pueden interactuar con las proteínas (Kikugawa *et al.*, 1981). Sin embargo, el hecho de que el aislado proteico de garbanzo, al igual que el de otras legumbres, presente bajos niveles de grasas y ausencia de colesterol, hace que sea un material muy interesante para la formulación de alimentos procesados de bajo contenido en grasas y colesterol, hipocalóricos y reducida presencia de proteína animal (Waggle *et al.*, 1989).

En el aislado proteico de garbanzo, los niveles de azúcares solubles (0.2%) son muy bajos, no habiéndose detectado  $\alpha$ -galactósidos de la familia rafinosa, como resultado del proceso de obtención del mismo. Por lo tanto, cabe esperar que el fenómeno de flatulencia, asociado a estos oligosacáridos, no esté presente tras su ingesta. Por otra parte, resulta interesante resaltar el bajo contenido en polifenoles del aislado proteico, inferior al 0.1%, ya que estos compuestos reaccionan con las proteínas, disminuyendo la biodisponibilidad de los distintos aminoácidos presentes en el aislado.

**Tabla 6.2.** Composición química de la harina de garbanzo y del aislado proteico.

Componentes	HG <sup>a</sup>	APG <sup>b</sup>
<b>Proteína (Nx6.25)</b>	18.8±0.27	90.5±2.6
<b>Grasa</b>	4.1±0.03	1.0±0.2
<b>Ceniza</b>	3.4±0.02	4.2±0.2
<b>Fibra</b>	10.4±0.18	2.1±0.1
<b>Carbohidratos</b>	37.8±0.81	2.0±0.3
<b>Azúcares solubles</b>	3.2±0.02	0.2±0.01
<b>Polifenoles</b>	0.21±0.01	<0.1

Los datos son la media  $\pm$  desviación estándar de tres determinaciones independientes. <sup>a</sup>HG: harina de garbanzo. <sup>b</sup>APG : aislado proteico de garbanzo.

### 6.3.2 Propiedades funcionales

Dado que en la mayoría de los casos, el aislado proteico estará deshidratado, la absorción de agua es una propiedad funcional de gran importancia. Los resultados obtenidos de absorción de agua en el aislado proteico de garbanzo (1.99) han sido superiores a los obtenidos en la harina de garbanzo (1.78). Como consecuencia de los cambios conformacionales producidos en las moléculas proteicas durante el proceso de obtención del aislado, se produce una mayor exposición de grupos iónicos, favoreciendo la interacción con el agua circundante mediante puentes de hidrógeno. Por otro lado, la absorción de agua del aislado proteico de garbanzo puede catalogarse como baja, respecto a otros aislados vegetales, ya que los proteicos de soja pueden llegar a formar geles y absorber agua hasta llegar incluso a una relación de 12:1 ( Waggle *et al.*, 1989) (Tabla 6.3).

Tabla 6.3. Propiedades funcionales de la harina de garbanzo y del aislado proteico

Propiedades funcionales	HG <sup>a</sup>	APG <sup>b</sup>
Solubilidad <sup>c</sup>	31.8±1.1	46.3±3.2
Absorción de agua <sup>d</sup>	178.8±2.4	199.5±4.9
Absorción de grasa <sup>e</sup>	135.8±6.1	125.7±11.2
Capacidad de emulsión <sup>f</sup>	94.7±0.7	76.9±2.2

Los datos son la media ± desviación típica de tres determinaciones independientes.

<sup>a</sup>HG: harina de garbanzo. <sup>b</sup>APG: aislado proteico de garbanzo. <sup>c</sup>Porcentaje de nitrógeno soluble en 0.1M NaCl a pH 7.0. <sup>d</sup>Gramos de agua absorbida por 100 gramos de muestra. <sup>e</sup>Gramos de grasa absorbida por 100 gramos de muestra. <sup>f</sup>Porcentaje (peso) de grasa emulsificada.

Aunque las medidas de solubilidad son generalmente tomadas a pH 7, la solubilidad del aislado proteico es altamente dependiente de pH, siendo este hecho tradicionalmente utilizado para la obtención de aislados proteicos. En los análisis efectuados al respecto, el aislado proteico muestra menor solubilidad que las proteínas de la harina de garbanzo en el

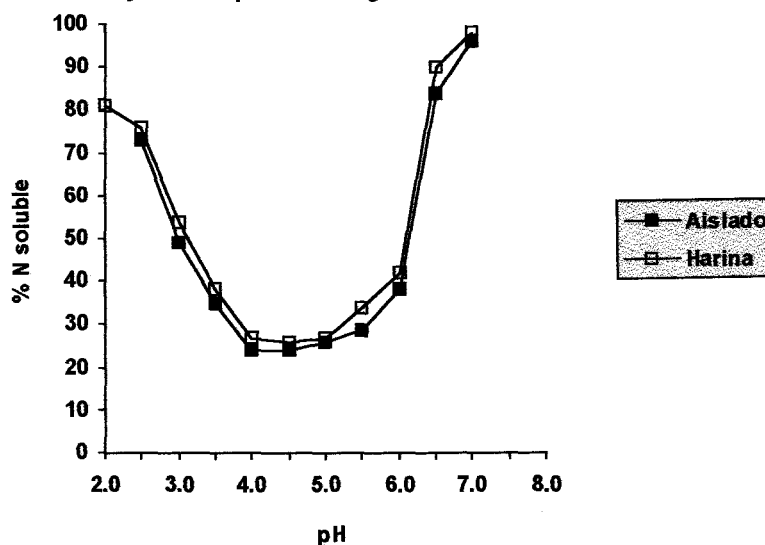
rango de pH 3.0-5.0. La baja solubilidad de la harina y del aislado proteico de garbanzo en la región del pI y los perfiles de solubilidad obtenidos son consistentes con los hallados en otras leguminosas, tales como soja, lenteja y haba (Carbonaro et al., 1997; Olson, 1978; Shen 1976). La solubilidad del aislado proteico es mínima a pH 4.3 (23%) y alcanza valores máximos (superiores al 75%) para valores de pH inferiores a 2.5 y superiores a 6.5 (Figura 6.2).

La absorción de grasa de la harina y del aislado de garbanzo son similares, mientras que la capacidad emulsionante es significativamente menor ( $P < 0.05$ ) en el aislado proteico respecto a la obtenida con la harina de garbanzo. Este hecho podría ser debido a la menor solubilidad que presentan las proteínas del aislado proteico respecto a la harina, ya que para contribuir a la emulsificación las proteínas tienen que disolverse y migrar a la interfase, para que actúen sus propiedades superficiales (Yamayatsu et al., 1972; Cheftel *et al.*, 1989). Los datos obtenidos de capacidad emulsionante de la harina y del aislado de garbanzo son difícilmente comparables con los obtenidos para otras leguminosas, ya que pequeñas variaciones en las condiciones experimentales influyen notablemente en su determinación (Paredes-López y Ordorica-Falomir, 1986; Wang y Kinsella, 1976).

#### 4.3.3 Composición proteica

Las proteínas del aislado proteico han sido fraccionadas en 4 componentes principales con masas moleculares de 270, 102, 70 y 26 KDa mediante cromatografía de filtración en gel (fracciones A, B, C y D, respectivamente) (Figura 6.3), no observándose la formación de agregados. La fracción A (270 KDa) corresponde a la proteína 11S de garbanzo, estando de acuerdo con el PM obtenido para esta proteína por Kumar y Venkataraman (1980). El pico mayoritario corresponde a la fracción C (70KDa), perteneciente a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la proteína 11S. Esto indica que se ha producido una rotura parcial de las proteínas 11S como consecuencia del proceso de obtención del aislado proteico, pudiéndose explicar en parte las diferencias encontradas en las propiedades funcionales del aislado proteico respecto a las de la harina de garbanzo.

Figura X. Efecto del pH sobre la solubilidad de nitrógeno en la harina y aislado proteico de garbanzo



El análisis mediante PAGE-SDS del aislado proteico de garbanzo indica rangos de distribución de pesos moleculares de a kDa, con bandas prominentes de , y kDa.

El aislado proteico de garbanzo obtenido satisface los requerimientos de la FAO (FAO, 1985) en aminoácidos esenciales, constituyendo, por tanto, una completa y adecuada fuente de proteínas para la nutrición humana y por tanto, sustituto de otras fuentes proteicas de gran calidad (Tabla 6.4). El aislado proteico presenta elevadas cantidades de arginina, aspártico y glutámico, sumando todos ellos 44.5 g/ 100 g proteína. Respecto a la harina de garbanzo, en el aislado proteico se observa una reducción del contenido de aminoácidos azufrados, siendo debido a la disminución de los componentes de la fracción de albúminas, los cuáles son ricos en los aminoácidos metionina y cisteína .

El aislado de garbanzo presenta una elevada digestibilidad proteica (96.1%), comparables a los obtenidos por Young *et al.* (1984) para aislados de soja (Tabla 6.4). Este hecho puede ser debido a dos causas principales: 1) la alta reducción de inhibidores de tripsina y quimotripsina en el aislado proteico, que en el caso del aislado de soja supone una



reducción del 70% (Waggle *et al.*, 1989), y 2) la desnaturalización de las proteínas como consecuencia del proceso de obtención del aislado, haciéndolo más accesible a las enzimas digestivas, mejorando, por tanto, el proceso hidrolítico (Lynch *et al.*, 1977).

**Tabla X. Composición en aminoácidos<sup>1</sup>, contenido proteico y digestibilidad proteica *in vitro*<sup>2</sup> del aislado proteico de garbanzo.**

Aminoácido	Aislado proteico	Patrón FAO <sup>3</sup>
Acido aspártico	13.3±0.3	
Acido glutámico	19.1±0.3	
Serina	6.5±0.2	
Histidina	2.9±0.1	
Glicina	3.6±0.1	
Treonina	3.7±0.1	3.4
Arginina	12.1±0.3	
Alanina	3.5±0.2	
Tirosina	2.8±0.1	
Valina	3.7±0.2	3.5
Metionina	1.5±0.1	2.5 <sup>4</sup>
Cisteína	1.2±0.1	
Isoleucina	4.0±0.1	2.8
Leucina	8.2±0.3	6.6
Fenilalanina	6.9±0.2	6.3 <sup>5</sup>
Lisina	6.6±0.3	5.8
Contenido proteico (Nx6.25)	90.5±4.1	
Digestibilidad proteica	96.1±3.2	

Cada valor es la media ± desviación estándar de 3 determinaciones independientes.

<sup>1</sup>Gramos de aminoácido por 100 gramos de proteína. <sup>2</sup>Proteína hidrolizada respecto al total (%). <sup>3</sup>FAO (1985). <sup>4</sup>Metionina + Cisteína. <sup>5</sup>Tirosina + Fenilalanina.

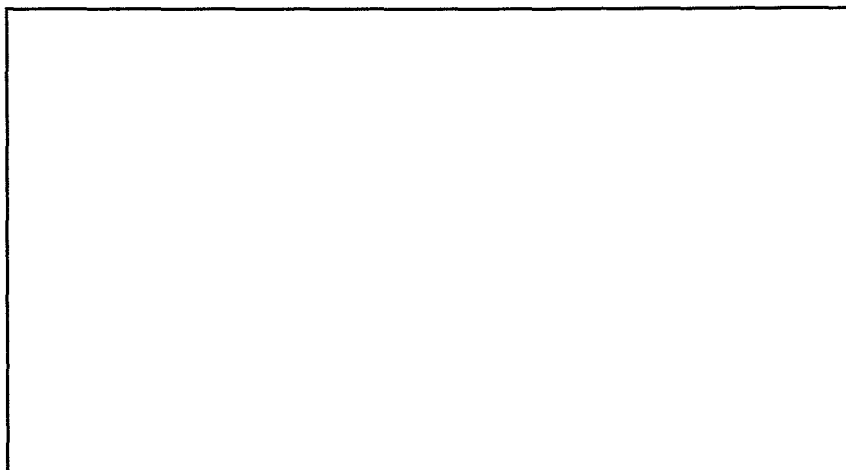


Figura 6.4. Cromatografía de filtración en gel del aislado proteico de garbanzo.

#### 6.4 BIBLIOGRAFÍA

Alaiz, M.; Navarro, J.L.; Girón, J.; Vioque, E. 1992. Amino acid analysis by high performance liquid chromatography after derivatization with diethylethoxymethylenemalonate. *J Chrom* 591: 181-187.

AOAC. 1990. *Official methods of analysis*, 15<sup>th</sup> ed; association of official analytical chemist, Arlington.

Bhatty, R.S. 1973. Extraction of non protein nitrogen from oil seed meal with different solvents. *Cereal Chem* 50: 329-336.

Carbonaro, M.; Cappelloni, M.; Nicoli, S.; Lucarini, M.; Carnovale, E. 1997. Solubility-digestibility relationship of legume proteins. *J Agric Food Chem* 45: 3387-3394.

Cheftel, J.C.; Cuq, J.L.; Lorient, D. 1989. Capítulo 4: Propiedades funcionales de las proteínas. En: *Proteínas alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas*. De. Acribia, S.A. Zaragoza.

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

FAO/WHO/ONU. 1985. Energy and protein requirements. Report of a joint meeting. WHO, Génova. Technical report series n° 724.

Fomon, S.; Ziegler, E.E.; Filer, L.J.; Nelson, S.E.; Edwards, B.B. 1979. Methionine fortification of a soy protein formula fed to infants. *Am J Clin Nutr* 32: 2460-2464.

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

Kikugawa, K.; Ido, Y.; Mikami, A. 1981. Studies on peroxidized lipids. VI. Fluorescent products derived from the reaction of primary amines, malonaldehyde and monofunctional aldehydes. *JAOCS* 61: 1574-1581.

Kinsella, J.E. 1981. Functional properties of proteins: possible relationships between structure and function in foams. *Food Chem* 7: 273-288.

Kumar, K.G.; Venkataraman, L.V. 1980. Chickpea seed proteins: isolation and characterization of 10.3 S protein. *J Agric Food Chem* 28: 524-527.

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

Lee, J.W.; López, A. 1984. Modification of plant proteins. *Crit Rev Food Sci Nutr* 21: 289-322.

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

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

- Lynch, C.,J.; Rha, C.K.; Catsimpoolas, N. 1977. Tryptic hydrolysis of glycinin and its subunits. *J Sci Food Agric* 28: 971-975.
- Mc Watters, K.H.; Cherry, J.P. 1981. Emulsification: vegetable proteins. En: *Protein functionality in foods*. Ed. Cherry, J.P. American Chemical Society, Washington DC pp 217-242.
- Moores, R.G.; Mc Dermott, D.L.; Wood, T.R. 1948. Determination of chlorogenic acid in coffee. *Anal Chem* 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. 1985. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *J Food Sci* 50: 1715-1718.
- Murray, E.D.; Myers, C.D.;Barker, L.D. 1981. Functional attributes of protein. A monovalent approach to processing and utilizing plant proteins. En: *Utilization of protein resources*. Stanley D.W., Murray E.D., Lees D.W. (Ed), p158 Food and Nutrition Press, Inc., Westport, CT.
- Olson, H.S. 1978. Continuous pilot plant production of bean protein by extraction, centrifugation, ultrafiltration and spray drying. *Lebensm.-Wiss U-Technol* 11: 57-61.
- Paredes-López, O.; Ordorica-Falomir, C. 1986. Functional properties of safflower protein isolates: water absorption, whipping and emulsifying characteristics. *J Sci Food Agric* 37: 1104-1108.
- Paredes-López, O.; Ordorica-Falomir, C.; Olivares-Vázquez, M.R. 1991. Chickpea protein isolates: physicochemical, functional and nutritional characterization. *J Food Sci* 56: 726-729.
- Sánchez-Vioque, R.; Clemente, A.; Vioque, J.; Bautista, J.; Millán, F. 1997. Polar lipids of defatted chickpea (*Cicer arietinum* L.) flour and protein isolates. *Food Chem* (En prensa).
- Shen, J.L. 1976. Solubility profile, intrinsic viscosity and optical rotation of acid precipitated soy protein and of commercial soy isolate. *J Agric Food Chem* 24: 784-789.

- Sosulski, F.W. 1962. The centrifuge method for determining flour absorption in hard red spring wheats. *Cereal Chem* 39: 344-350.
- Waggle, D.H.; Steinke, F.H.; Shen, J.L. 1989. Isolated soy proteins. En: *Legumes. Chemistry, Technology and Human Nutrition*. Matthews, R.H. Ed. New York.
- Wang, J.C.; Kinsella, J.E. Functional properties of novel proteins: alfalfa leaf protein. *J Food Sci* 41: 286-292.
- Waniska, R.D.; Shetty, J.K.; Kinsella, J.E. 1981. Protein-stabilized emulsions: effect of modification on the emulsifying activity of bovine serum albumin in a model system. *J Agric Food Chem* 29: 826-831.
- Wayler, A.; Queiroz, E.; Scrimshaw, N.S.; Steinke, F.H.; Rand, W.M.; Young, V.R. 1983. Nitrogen balance studies in young men to assess the protein quality of an isolated soy protein in relation to meat proteins. *J Nutr* 113: 2485-2489.
- Yamayatsu, K. Sawada, K.; Moritaka, S.; Misaki, M.; Toda, J.; Wada, T.; Ishii, K. 1972. Whipping and emulsifying properties of soybean products. *Agric Biol Chem* 36: 719-723.
- Young, V.R.; Puig, M.; Quiroz, E.; Scrimshaw, N.S. Raud, W.M. 1984. Evaluation of the protein quality of an isolated soy protein in young men relative to nitrogen requirements and effect of methionine supplementation. *Am J Clin Nutr* 39: 16-20.

## **CAPITULO 7**

---

## CARACTERIZACION BIOQUÍMICA DE HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS OBTENIDOS A PARTIR DE AISLADOS PROTEICOS DE GARBANZO EN UN SISTEMA DISCONTINUO

### 7.1 INTRODUCCIÓN

La calidad proteica de la semilla de garbanzo, similar a la de soja, la convierte en un componente adecuado para la obtención de hidrolizados proteicos apartir de semillas no aptas para el consumo directo. La utilización de otros productos proteicos, tales como aislados y concentrados proteicos se encuentra limitado a causa de su baja solubilidad y su carácter potencialmente alergénico. Estas razones, unidas a la demanda de nuevos productos, ha generado el desarrollo de procesos que permiten la modificación de las proteínas del garbanzo.

La modificación puede realizarse mediante métodos físicos, químicos o enzimáticos. El tratamiento por calor bajo condiciones ácidas o básicas puede producir la desnaturalización parcial de las proteínas y la pérdida de calidad nutritiva. En cambio, la modificación enzimática realizada en condiciones moderadas de pH y temperatura (pH 5-9; temperaturas entre 40-60 °C), permite la obtención de compuestos en los cuales el valor nutritivo de las proteínas originales se mantiene.

El empleo de las enzimas incluye además otras ventajas respecto a los métodos físico y químicos, especialmente en cuanto a la rapidez con que transcurren las reacciones y la alta especificidad de las enzimas. Esto se traduce en la reducción de costos energéticos y en el incremento de la eficacia del proceso. Por esta razón, los métodos enzimáticos resultan más atractivos para aplicaciones en la industria alimentaria (Godfrey y Reichelt, 1983).

Mediante la hidrólisis enzimática de las proteínas se pueden obtener compuestos con características fisicoquímicas y nutricionales variadas, según la aplicación que se vaya a hacer del producto final (Feeney y Whitaker, 1985). Estas características están determinadas por el grado de hidrólisis alcanzado durante la reacción, el cual a su vez dependerá de la

especificidad de la enzima, de las condiciones de hidrólisis, la cinética de la reacción y el método de hidrólisis utilizado (Adler-Nissen, 1986).

Con el objeto de incrementar su aplicación en la industria alimentaria, las proteínas vegetales son tratadas enzimáticamente. Ello implica la hidrólisis de la proteína, especialmente con proteasas (Flemming, 1989). Las proteasas hidrolizan enlaces peptídicos específicos, dando lugar a una mezcla de péptidos y aminoácidos conocida como hidrolizado de proteínas.

Los efectos de la hidrólisis se traducen en una reducción del tamaño molecular, cambios en la estructura y en la polaridad de las proteínas. En este último caso, el carácter hidrofílico se incrementa por el aumento de la exposición de grupos carboxílicos libres y el carácter hidrófobo por la exposición de restos de aminoácidos apolares. Como consecuencia, las propiedades funcionales de los hidrolizados experimentan cambios que dependen del grado de hidrólisis alcanzado en la reacción (Kinsella 1976; Chaplin y Andrew, 1989).

El grado de hidrólisis (GH) se define como la relación existente entre el número de enlaces peptídicos hidrolizados respecto al número total de enlaces peptídicos hidrolizables (Adler-Nissen, 1986). Éste se encuentra influenciado por la actividad específica de la proteasa, las características fisicoquímicas del sustrato y las condiciones de reacción tales como la concentración de sustrato, concentración de enzima, pH y temperatura (Fox et al., 1982; Adler-Nissen, 1986).

Los hidrolizados proteicos han sido clasificados en: hidrolizados de bajo grado de hidrólisis ( $GH < 10\%$ ) o de alto grado de hidrólisis ( $GH > 10\%$ ) (Adler-Nissen, 1986). En los primeros, mediante una hidrólisis limitada, se obtiene un aumento en la solubilidad, capacidad espumante y capacidad emulsificante de las proteínas, con aplicación directa en la industria alimentaria. En los segundos, la hidrólisis exhaustiva puede disminuir estas propiedades a la vez que da origen a compuestos de bajo peso molecular (Mc Nairey, 1984).



En esta memoria se presenta el estudio realizado con dos proteasas: alcalasa y Flavourzyme en la obtención de hidrolizados proteicos de carácter hipoalergénico a partir de aislados proteicos de garbanzo

## 6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.2.1 Aislado proteico de garbanzo

Éste fue obtenido según el apartado 6.2.1, con un contenido proteico superior al 90%.

### 7.2.2 Caracterización de las proteasas

Las enzimas utilizadas para la obtención de hidrolizados proteicos a partir de aislados proteicos de garbanzo fueron Flavourzyme® y Alcalasa® 2.4L, suministradas por la casa comercial Novo Industri A/S (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark). Ambas cumplen las especificaciones recomendadas por la FAO/OMS relativas a enzimas de uso alimentario.

Flavourzyme® es un complejo enzimático desarrollado para la hidrólisis de proteínas bajo condiciones neutras o ligeramente ácidas, que puede ser utilizado para la eliminación del amargor en hidrolizados con bajo grado de hidrólisis así como para la obtención de hidrolizados de alto grado de hidrólisis. Este complejo enzimático presenta actividad exopeptidasa y endoproteasa, siendo producido mediante fermentación a partir de cepas seleccionadas de *Aspergillus oryzae*.

Alcalasa® 2.4L es una endoproteasa que puede ser utilizada para la obtención de hidrolizados proteicos de muy diferentes grados de hidrólisis, ya que puede actuar de manera individual o bien en combinación con exoproteasas, dando lugar a hidrolizados de alto grado de hidrólisis (Tabla X).

Tabla X. Propiedades bioquímicas de las proteasas Flavourzyme® y Alcalasa® 2.4L

Características	FLAVOURZYME®	ALCALASA® 2.4L
Tipo de acción	exopeptidasa y endoproteasa	Endopeptidasa
Actividad enzimática	1 LAPU <sup>1</sup> /gr de enzima	2.4 AU <sup>2</sup> /gr de enzima
Peso molecular		27.300
Inhibidores enzimáticos		DFP <sup>3</sup> , PMSF <sup>4</sup>
pH óptimo de reacción	5.0-7.0	6.5-8.5
T <sup>a</sup> óptima de reacción	50-55 °C	50-60 °C
Inactivación enzimática	pH 7 85 °C 5 min	pH 8 85 °C 10 min

<sup>1</sup>LAPU (Leucine Aminopeptidase Unit): cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1  $\mu$ mol de L-leucina-p-nitroanilida por minuto, utilizando el método AF 298/1 (Novo Nordisk). <sup>2</sup>AU (Anson Unit): cantidad de enzima necesaria para digerir hemoglobina en condiciones standard produciendo una cantidad de productos solubles en ácido tricloroacético, que dan el mismo color con reactivo de Folin que un miliequivalente de tirosina (Anson, 1938). <sup>3</sup>DFP: fluorofosfato diisopropilo. <sup>4</sup>PMSF: fenilmetilsulfonilfluoruro.

### 7.2.3 Hidrólisis

El aislado proteico de garbanzo fue hidrolizado mediante el tratamiento de las proteasas Flavourzyme y Alcalasa. La reacción se realizó en un reactor de capacidad 1 litro, equipado con un agitador, termómetro, electrodo de pH, un conducto para la admisión de NaOH 1n y una bomba reguladora de pH. Las curvas de hidrólisis se realizaron mediante el cálculo del grado de hidrólisis de acuerdo al método de TNBS. Los parámetros utilizados para el proceso hidrolítico fueron: a) hidrólisis mediante flavourzyme: concentración de sustrato (5%), relación sustrato/enzima (E/S) = 100 LAPU/gr proteína, temperatura (T)= 50 °C, pH 7.0; b) hidrólisis mediante alcalasa: concentración de sustrato (S) = 5%, relación enzima/ sustrato (E/S)= 0.4 UA/gr proteína, temperatura (T)= 50°C, pH 8.0.

#### 7.2.4 Métodos analíticos

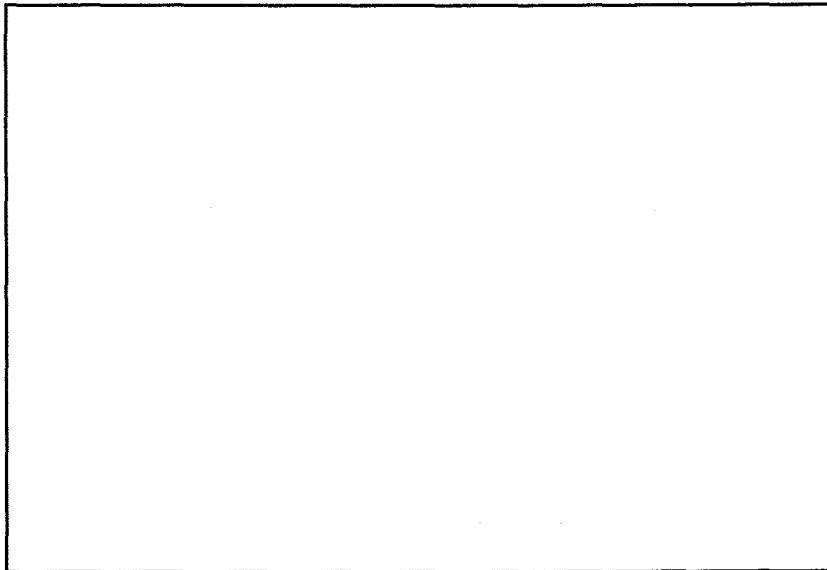
La metodología utilizada en este capítulo es similar a la empleada en capítulos precedentes.

### 7.3 RESULTADOS Y DISCUSION

#### 7.3.1 Determinación de las condiciones de hidrólisis

Las hidrólisis enzimáticas se realizaron bajo condiciones suaves con el objeto de mantener la calidad nutricional de las proteínas. Los parámetros necesarios para la determinación de las condiciones óptimas de hidrólisis son la concentración de sustrato, la relación enzima-sustrato, pH y temperatura (Adler-Nissen, 1982). Se escogieron como condiciones óptimas aquellas que ofrecían un mayor grado de hidrólisis tras 4 horas de reacción.

##### 7.3.1.1 Relación enzima/sustrato

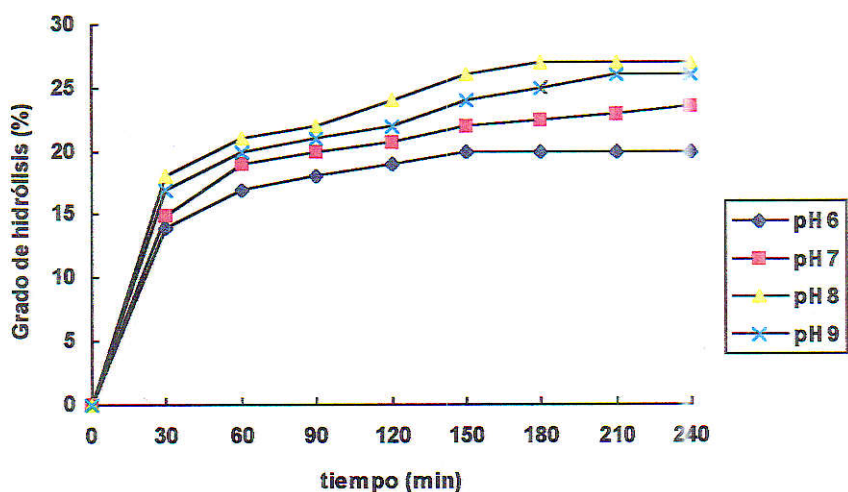


**Figura 7.1.** Efecto de la relación Enzima/sustrato sobre la hidrólisis del aislado proteico de garbanzo mediante alcalasa® 2.4L. Concentración de sustrato: 5%; temperatura: 50 °C

### 7.3.1.2 pH

La enzima Alcalasa 2.4L, como su propio nombre indica, es más activa a pH básico, mostrando actividad máxima en el intervalo de pH 7-9 (Figura 7.2). A pH la enzima presenta menor eficiencia respecto a pH 8 y pH 9. En el caso del complejo enzimático Flavourzyme, se han seguido las indicaciones de la casa comercial Novo Nordisk, que señalan una actividad exopeptidasa máxima a pH 7.

Figura 7.2. Efecto del pH sobre la hidrólisis del aislado proteico de garbanzo mediante alcalasa® 2.4L. Concentración de sustrato: 5%; temperatura: 50 °C; relación E/S: 0.4 AU/gr aislado proteico.



### 7.3.1.3 Temperatura

La temperatura es un parámetro que influye considerablemente en el proceso de hidrólisis enzimática. La relación existente entre eficiencia enzimática y temperatura es compleja ya que está basada en fenómenos de activación e inactivación enzimática. Ésta última supone un descenso en la tasa E/S, aumentando el tiempo de reacción para alcanzar

grados de hidrólisis similares. La reacción enzimática llevada a cabo a 60 °C presenta una tasa inicial de hidrólisis superior respecto a la observada a 50 °C. Sin embargo, el grado de hidrólisis final alcanzado es inferior, pudiendo ser debido a fenómenos de inactivación enzimática. En reacciones de hidrólisis de aislados de soja se ha observado una inactivación significativa de la enzima alcalasa a 60 °C, que provoca una reducción en la eficiencia enzimática (Adler-Nissen, 1989).

### 7.3.2 Caracterización química de los hidrolizados

Los hidrolizados proteicos obtenidos destacan por su elevado contenido proteico, superior al 80% en todos los casos, siendo el segundo componente principal las cenizas, fundamentalmente iones Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> procedentes del control de pH (Tabla 7.1).

**Tabla 7.1. Composición química de la harina de garbanzo y los diferentes productos proteicos obtenidos.**

	Proteína	Carbohidratos	Polifenoles	Cenizas
<b>Harina</b>	18.8±0.27	58.6±1.2	0.2±0.01	3.4±0.02
<b>Aislado proteico</b>	90.5±2.6	4.7±1.3	<0.1	4.2±0.2
<b>HPF<sup>1</sup></b>	84.7±2.7	<0.1	<0.1	6.7±0.2
<b>HPA<sup>2</sup></b>	85.3±2.3	<0.1	<0.1	5.1±0.2
<b>HPFA<sup>3</sup></b>	84.7±2.7	<0.1	<0.1	6.1±0.3

<sup>1</sup>Hidrolizado obtenido mediante flavourzyme (GH =27.4 %); <sup>2</sup>Hidrolizado obtenido mediante alcalasa (GH= 26.9). <sup>3</sup>Hidrolizado obtenido mediante flavourzyme y alcalasa (GH= 52.9).

## BIBLIOGRAFÍA

Adler-Nissen, J. 1982. Limited enzymic degradation of proteins: a new approach in the industrial application of hydrolases. *J Chem Technol Biotechnol* 34: 215-222.

Adler-Nissen, J. 1986. Some fundamentals aspects of food proteins hydrolysis. En: "Enzymic hydrolysis of food proteins". Capítulo 2: 9-24. Edit Elsevier, New York.

Anson, M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathesin with hemoglobin. *J Gen Physiol* 22: 79-89

Chaplin, L.C.; Andrew, A.T. 1989. Functional properties of peptides derived from casein proteolysis. *J Dairy Res* 56: 544-552.

Feeney, R.E.; Whitaker, J.R. 1985. Chemical and enzymatic modification of plant proteins. En: "New Protein Foods" (vol 5): 181-219. Academic Press, New York.

Flemming, M.C. 1989. Enzyme technology versus engineering technology in the food industry. *Biotechnol. And Appl. Biochem.* 11: 249-265.

Fox, P.F.; Morrissey, P.A.; Mulvihill, D.M. 1982. Chemical and enzymatic modification of food proteins. En: "Developments in Food Proteins". Capítulo 2. Edit Appl Sci Publ. Londres.

Godfrey, T.; Reichlt, J.R. 1983. Introduction to industrial enzimology. En " Application of enzymes in industry. *Industrial enzimology*". Edit. Stockton Press, New York.

Kinsella, J.E. 1976. Functional properties of protein in foods: a survey. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 17: 219-289.

McNairey, J. 1984. Modification of a novel protein product. *J Chem Tech Biotechnol* 34: 206-212.

Alfonso Clemente Gimeno  
"Estudio de la calidad proteica de la semilla de  
garbanzo (*Cicer arietinum* L) var. Athenas. Obtención de  
aislados e hidrolizados proteicos".

APTQ cum laude per  
unanimidad 26 Junio 98

~~Medrano~~

W. Torres

~~H. ...~~

~~M. ...~~

R. Guillén Sans

~~J. ...~~

X

