

## EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y TÉRMICA DE AISLADOS DE PROTEÍNA DE HABA (*Vicia faba*)

Hernández-García J.I.<sup>a</sup>, Orozco-Villafuerte J.<sup>a</sup>, Cuenca-Mendoza F.<sup>a</sup>, Pérez-Alonso C.<sup>a</sup>, Carrillo-Navas H.<sup>a,b</sup>, Guadarrama-Lezama A.Y.<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Química, Paseo Colón esq. Paseo Tollocan s/n, Col. Residencial Colón, C.P. 50120, Toluca, Estado de México, México. \* ayguadarramal@uaemex.mx.

<sup>b</sup> Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, C.P. 09340, México, D.F., México.

### RESUMEN:

Se extrajo la proteína de haba con una disolución alcalina y precipitación ácida de una solución 10% (p/v) harina de haba: sulfito de sodio, el aislado de proteína se recuperó a pH 4.0 (punto isoeléctrico de las proteína), y el precipitado se liofilizó para obtener un producto seco. La caracterización física de la proteína liofilizada consistió en determinar las isotermas de adsorción a 25 y 35°C, mientras que en la caracterización térmica se obtuvo la temperatura de desnaturalización de la proteína mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB). Los resultados mostraron que el rendimiento obtenido en el proceso de extracción-liofilización fue del 92%, las isotermas de adsorción fueron ajustadas al modelo de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB). La temperatura donde se encontraron cambios estructurales en el aislado de proteína fue a 72.80°C, la entalpía de desnaturalización calculada fue de 133.5 J/g. La caracterización física y térmica del aislado de proteína de haba permite considerarla como un material alternativo en la adición en productos alimenticios para proporcionar viscosidad, así como su aplicación en procesos térmicos con temperatura controlada para evitar cambios químicos y estructurales del aislado de proteína.

### ABSTRACT:

Faba bean protein was extracted with an alkaline dissolution and acid precipitation of a solution 10% (w/v) Faba bean flour: sodium sulfite, protein isolate was recovered at pH 4.0 (isoelectric point of the protein) and the precipitated solid was lyophilized in order to obtain a solid product. The physical characterization of lyophilized isolate protein was evaluated by determination of adsorption isotherms at 25 and 35°C, while that with thermal characterization was determine the protein denaturation temperature by Differential Scanning Calorimetry (DSC). The results showed that the yield obtained in in extraction-liophylization process was 92%, sorption isotherms were adjusted at Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) model. The temperature where structural changes was presented in isolate protein was 72.80°C, denaturation enthalpy was 133.5 J/g. Physical and thermal characterization of isolated faba bean protein allows to be consider as an alternative material on addition in food products, to provide viscosity and its application in thermal processes with controlled temperature to avoid chemical and structural changes of the isolate protein.

### Palabras clave:

Extracción, Haba (*Vicia faba*), adsorción

### Keyword:

Extraction, Haba (*Vicia faba*), sorption

**Área:** Cereales, Leguminosas y Oleaginosas

### INTRODUCCIÓN

Con excepción de la soya y el gluten, algunas proteínas derivadas de plantas y leguminosas han sido poco estudiadas. La extracción y caracterización de proteínas de leguminosas podría

representar una fuente alternativa de aditivos para la industria alimentaria, en lugar de la aplicación de proteínas provenientes de animales. Las leguminosas no sólo representan una fuente importante de componentes básicos para la nutrición humana, sino que son fuente de componentes menores, que están siendo estudiados por promover efectos benéficos a la salud (Vioque *et al.*, 2012). Las proteínas de semillas presentan buena capacidad emulsionante una de estas es la proteína de haba (Karaca *et al.*, 2011). Esta proteína está constituida por dos fracciones principales: albúminas y globulinas. Las primeras son ricas en aminoácidos azufrados y lisina, constituyen entre el 10-20% de las proteínas en las semillas de las leguminosas; mientras que las globulinas contienen convicilina, vicilina y legumina, estas son solubles en soluciones salinas acuosas y representan alrededor del 70% de las proteínas que se encuentran en las semillas de las leguminosas como la haba (Pasqualini *et al.*, 1991; Roy *et al.*, 2010). La relación entre el contenido de globulinas, albuminas y vicilinas en aislados de proteína de haba, puede presentar diferencias en sus propiedades funcionales, físicas y térmicas, debido al método utilizado en la extracción de la misma. Entre las diversas características de interés en el estudio de las propiedades de las proteínas se encuentran las de retención y adsorción de agua, además de sus propiedades térmicas, debido a que de ello dependerá su aplicabilidad, funcionalidad y estabilidad al ser incorporadas en los sistemas alimenticios. En el fenómeno de adsorción, los gases y el vapor de agua generado experimentalmente en microambientes se adsorben sobre la superficie de sólidos porosos. La adsorción depende de algunos factores como la temperatura y la afinidad e interacción del adsorbato con el adsorbente, mientras que el tiempo de adsorción depende a su vez de las características superficiales del sólido, la energía de adsorción, etc. (Hans-Jürgen *et al.*, 2011). El estado físico de las bio-moléculas depende de los cambios en su estructura las cuales se presentan por diversos factores, entre ellos cuando se induce sobre estas un flujo de calor. Los cambios en los materiales por inducción de una rampa de calentamiento inician con un incremento en su movilidad molecular hasta alcanzar la temperatura en que los materiales presentan modificaciones en su estructura física y molecular, en el caso de las proteínas la modificación más común es la desnaturalización de las mismas. La desnaturalización involucra la disociación de enlaces intramoleculares (no covalentes y en algunos casos disulfuro) y por lo tanto es un proceso endotérmico. La caracterización térmica de las proteínas por Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) permite explorar la asociación de la proteína de haba con otros biomateriales (Fitzsimons *et al.*, 2007).

### **MATERIALES**

La harina de haba se adquirió en un mercado local de Toluca, Estado de México. Los reactivos usados fueron grado reactivo y se utilizó agua bidestilada para todos los experimentos realizados. Las sales y los reactivos utilizados, para las isotermas y determinaciones analíticas fueron grado analítico. El pentóxido de fósforo se adquirió de Sigma Aldrich (Toluca, Estado de México).

### **MÉTODOS**

#### **Extracción de aislados de proteína de haba**

La harina de haba se tamizó en una malla con apertura de 0,2mm (Tayler, EUA), con la finalidad de separar las partículas de mayor tamaño. A 10 g de harina se adicionó una solución 0,25% de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, el pH se ajustó a 10,5 y se mantuvo la suspensión bajo agitación a 4 °C durante 24 horas continuas. Posteriormente, esta suspensión se centrifugó a 15,000 g durante 10 min, para

separar los residuos sólidos alcalinos. El extracto soluble alcalino se transfirió a un vaso de precipitados y se ajustó el pH hasta 4,0 (pH isoeléctrico de la proteína de haba). La solución resultante se centrifugó nuevamente a 15,000g durante 10 minutos. El aislado de proteína se lavó dos veces con agua destilada y se guardó para su posterior liofilización.

#### **Liofilización de aislados de proteína de haba**

La solución de proteína se ultra-congeló a  $-40^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, posteriormente se colocó al vacío en un liofilizador (FreeZone 2.5, Labconco, EUA) por 48 horas.

#### **Caracterización física de los aislados de proteína de haba**

La caracterización física de la proteína consistió en modelar su comportamiento de adsorción de agua, acondicionándola a diferentes actividades de agua (0.1-0.8).

#### **Isotermas de adsorción de los aislados de proteína de haba**

Una vez obtenida la proteína liofilizada, se colocaron 10 gramos de proteína en un desecador conteniendo pentóxido de fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ), con la finalidad de reducir al mínimo su contenido de humedad. Posteriormente se pesaron 0.5 g de proteína liofilizada en 27 charolas de plástico de 2.5 cm de diámetro y cada una se colocó en un desecador pequeño con diferentes soluciones salinas saturadas con actividades de agua de 0.1 a 0.8 ( $\text{LiCl}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOK}$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaBr}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ). Los desecadores se colocaron en tres estufas de convección forzada a 25, 35 y  $45^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se pesaron cada semana y se dejaron en almacenamiento hasta alcanzar el equilibrio (20 días). El contenido de humedad del sistema fue determinado por la diferencia de peso después de secar en una estufa al vacío (Felisa, Ciudad de México, México) a  $60^{\circ}\text{C}$  en presencia de perclorato de magnesio como desecante. La actividad de agua fue determinada con un medidor de actividad de agua (Aqualab modelo serie 3TE, Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA). Con los datos de humedad y actividad de agua se obtuvieron las isotermas de adsorción y se ajustaron al modelo de GAB, de acuerdo a la metodología propuesta por Guadarrama-Lezama *et al.* (2014).

#### **Caracterización térmica de los aislados de proteína de haba**

5mg de proteína liofilizada fue pesada en una charola pequeña de aluminio, posteriormente se selló y se introdujo en un calorímetro diferencial de barrido (modelo 2010, TA Instruments, New Castle, DE, USA). La muestra se enfrió rápidamente con nitrógeno a  $-20^{\circ}\text{C}$  y después se llevó hasta  $80^{\circ}\text{C}$  con una rampa de calentamiento de  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Las determinaciones fueron realizadas en triplicado. La entalpia de desnaturalización de la proteína fue calculada usando el software TA Instruments.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Extracción de la proteína**

El rendimiento en la extracción de la proteína a partir de la separación de la semilla fue de 35%, el resto fue descartado debido a que la semilla de haba contiene una gran proporción de carbohidratos (almidón), fibra y proteína. Para lo cual fue necesario diseñar un método de separación mediante el cambio de pH de alcalino a ácido, hasta el punto isoeléctrico de las proteínas, este es un método comúnmente usado para separar la fracción proteica de los demás componentes (Karaca *et al.*, 2011) El medio de extracción en la que se encuentran las diferentes

fracciones de las proteínas, influye en las velocidades de precipitación y sedimentación de las mismas, debido a los residuos de aminoácidos cargados o bien; a los puentes de disulfuro que constituyen a las proteínas y que pueden ser disociados o no en soluciones acuosas, por lo tanto el contenido total en los aislados proteicos puede diferir. De tal forma que las fracciones mayoritarias obtenidas en los aislados pueden estar constituidos en relaciones globulina/albumina o legumina/vicilina y modificar las características fisicoquímicas de los productos obtenidos.

### **Liofilización de aislados de proteína de haba**

Una vez obtenido el extracto de proteína por precipitación alcalina-ácida, se procedió a liofilizarla. El rendimiento obtenido del proceso de extracción al de liofilización fue del 92%. Para la liofilización de la proteína de haba, las condiciones manejadas permitieron obtener una proteína sin degradarse, esto se comprobó debido a que el contenido de proteína en los aislados fue de  $19.20 \pm 0.50$  %, mientras que en la harina de haba inicialmente era de  $20.30 \pm 0.20$  %, por lo tanto solamente se cuantificó 5% menos de proteína en el aislado de proteína obtenida. Es importante mencionar que en la determinación de proteína por el método de Kjeldahl, no todo el nitrógeno cuantificado es proveniente de proteínas, probablemente en la harina de haba se presentó mayor porcentaje estas debido a que no todo el nitrógeno cuantificado provenía de las proteínas. Durante el proceso de liofilización, el agua contenida en las soluciones se convierte en cristales de hielo, posteriormente se sublima, minimizando la degradación en las proteínas y con un contenido de humedad mínima.

### **Caracterización física de los aislados de proteína de haba**

Las isotermas de adsorción de humedad de agua experimentales de la proteína se presentan en la figura 1, las cuales presentaron una forma sigmoideal y son clasificadas como isotermas del tipo II, la mayoría de las isotermas que han sido determinadas para alimentos corresponden a este tipo de curvas. Los datos de adsorción se ajustaron al modelo de GAB (Guggenheim-Anderson-de Boer) y los parámetros obtenidos se muestran en la tabla 1. Los valores del módulo de desviación relativa fueron menores al 5% en todos los datos experimentales de temperaturas de almacenamiento y el coeficiente  $r^2$  fue de 0.99. El modelo de GAB describe tres parámetros  $M_0$ ,  $C$  y  $K$ , los cuales tienen significado físico y este es reconocido como el modelo más versátil y usado en el comportamiento de adsorción de agua en los sistemas alimenticios. El parámetro  $M_0$  se encontró en el intervalo de 4.6 a 5.1 kg H<sub>2</sub>O / kg ss y disminuyó conforme la temperatura de almacenamiento se incrementó de 25 a 35°C, probablemente a los cambios de adsorción en los sitios estructurales en la proteína. La disminución en el valor de la monocapa ( $M_0$ ) puede ser atribuido a la reducción del número de sitios disponibles para enlazar agua como resultado de cambios físicos en los materiales, tal como fue observado cuando la temperatura de almacenamiento se incrementó. En mezclas de materiales de biopolímeros como maltodextrina-goma arábica, los valores de  $M_0$  se encuentran en los intervalos de 7 a 12 kg H<sub>2</sub>O / kg ss (Guadarrama-Lezama *et al.*, 2014). Generalmente los biopolímeros poseen mayor afinidad al agua y adsorberla con mayor facilidad que las proteínas, debido a que se presenta un hinchamiento de tales materiales, por lo cual se incrementa el número de sitios polares, donde pueden retener mayor contenido de agua, además de que algunas proteínas presentan poca afinidad al agua. Las globulinas son las proteínas más abundantes en las semillas de leguminosas (70%), estas se caracterizan por ser insolubles en agua por ello se observó que la capacidad de adsorción de agua en la proteína liofilizada fue baja, en comparación con la que

presentan las gomas e hidrocoloides. El valor de  $C$  está asociado con las interacciones adsorbato-adsorbente de tal forma que en los resultados obtenidos a temperaturas mayores ( $35^{\circ}\text{C}$ ) estas interacciones incrementan. El valor de  $K$  involucra las interacciones entre las moléculas del agua y al adsorbente (aislado de proteína) en la multicapa. En este estudio no se encontró diferencia significativa en los valores del parámetro  $K$ , por lo tanto existe un acomodamiento similar en los aislados de la proteína independientemente de la temperatura de almacenamiento.

Tabla I. Valores de los parámetros para el modelo de GAB que describen el aislado de la proteína de haba

T ( $^{\circ}\text{C}$ )	$M_0$	$C$	$k$	$r^2$
25	5.18279	10.68061	0.73638	0.99993
35	4.66241	6.66196	0.72992	0.99988

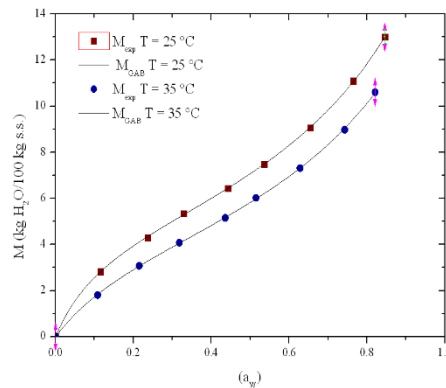


Figura 1. Gráfica de Isotermas de adsorción de humedad del aislado de proteína de haba

### Caracterización térmica del aislado de proteína de haba

En la figura 2 se muestra el barrido obtenido de flujo de calor contra la temperatura obtenido mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB). El área bajo la curva calculada de este diagrama representa la entalpía de desnaturalización del aislado de proteína, la cual fue de  $133.5 \text{ J/g}$ . A temperatura de  $72.80^{\circ}\text{C}$  se inducen cambios importantes en la estructura conformacional del aislado de proteína de haba. La desnaturalización de las proteínas depende de la composición en aminoácidos presentes en cada una. La velocidad de desnaturalización de cada proteína además de la velocidad de flujo de calor aplicado y del tamaño de partícula de las proteínas, de su conformación química y estructural; es decir si su acomodamiento tridimensional es lineal o no (Ya *et al.*, 2000). Se han reportado termogramas similares para proteínas globulares como la  $\beta$ -lactoglobulina (Fitzsimons *et al.*, 2007). La desnaturalización de las proteínas involucra adsorción de calor para romper enlaces intramoleculares generando un proceso endotérmico, posteriormente existe una agregación de las estructuras desnaturalizadas, formando nuevos enlaces intermoleculares que involucran un proceso exotérmico y se ven reflejados en el termograma como un pico exotérmico. En la proteína de haba se observa un pico exotérmico, después de  $140^{\circ}\text{C}$ , este proceso puede ser atribuido a una reducción en la intensidad de la desnaturalización endotérmica, bajo las condiciones que promueven la agregación de las proteínas desnaturalizadas (Fitzsimons *et al.*, 2007).

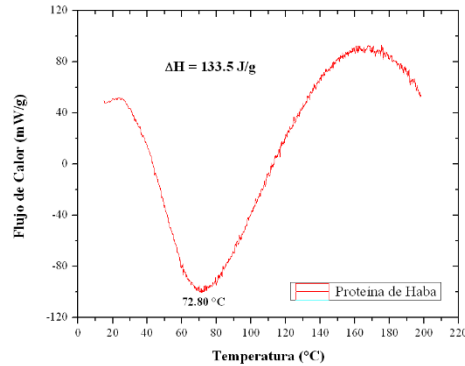


Figura 2. Diagrama de entalpía de desnaturalización del aislado de proteína de haba

## CONCLUSIONES

Las isotermas de adsorción de los aislados de proteína de haba se ajustaron bien al modelo de GAB; sin embargo debido a la naturaleza de las proteínas, estas tienen mejor capacidad de adsorción en comparación con los hidrocoloides. El análisis térmico por CDB nos permitió encontrar información respecto a la desnaturalización y procesos de agregación de los aislados de proteína de haba. La harina de haba (*Vicia faba*) es una buena fuente de aislados de proteínas, que podrían ser utilizados por la industria alimentaria debido a sus propiedades físicas, térmicas y funcionales.

## BIBLIOGRAFÍA

- Fitzsimons SM, Mulvihill M, Morris ER. 2007. Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. *Food hydrocolloids* 21:638-644.
- Guadarrama-Lezama AY, Cruz-Olivares J, Martínez-Vargas SL, Carrillo-Navas H, Román-Guerrero A, Pérez-Alonso, C. 2014. Determination of the Minimum Integral Entropy, Water sorption and Glass Transition Temperature to Establishing Critical Storage Conditions of Beetroot Juice Microcapsules by Spray Drying. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13 (2): 405-416.
- Huns-Jürgen B, Karlheinz G, Michael K. 2011. *Physics and Chemistry of Interfaces: WILEY-VCH* 188-195.
- Karaca AC, Low N, Nickerson M. 2011. Emulsifying properties of chickpea faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International* 44:2742-2750.
- Pasqualini S, Lluch C, Antonielli M. 1991. Seed storage proteins in several genetic lines of *Vicia-faba*. *Plant Physiology and Biochemistry* 29: 507–515.
- Roy F, Boye JI, Simpson BK. 2010. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International* 43(2): 432–442.
- Vioque, J. Alaiz, M., Girón-Calle, J. 2012. Nutritional and functional properties of *Vicia faba* protein isolates and related fractions. *Food Chemistry* 132, 67–72.