

## EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE ALFALFA (*Medicago sativa*)

N. Medina-Chávez, D. Baigts-Allende\*

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Tablaje Catastral  
31264 km 5.5 Carr. Sierra Papacal-Chuburná Puerto. Parque Científico Tecnológico de Yucatán C.P  
97302.Mérida, Yucatán, México. \*dbaigts@ciatej.mx

### RESUMEN:

La población a nivel mundial se encuentra en un constante crecimiento, lo que ha llevado a la búsqueda de fuentes alternativas que cubran con la demanda alimentaria. Durante los últimos años se ha enfatizado en el uso de proteínas vegetales como nutrimentos sustentables, eficaces y altamente disponibles para consumo humano. La enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), es una proteína (Fracción I) presente en organismos autótrofos como las hojas verdes. Se ha reportado que contiene un alto valor biológico comparable a otras proteínas como caseína y huevo. Sin embargo, algunos compuestos composicionales como los fitoquímicos pueden llegar a generar sabores y colores anómalos que disminuyen su preferencia de consumo. En este estudio, se obtuvieron aislados proteicos a partir de biomasa de alfalfa mediante extracción alcalina con diferentes bases (Tris, NaOH) y agentes reductores/adsorbentes (metabisulfito sódico, PVPP y carbón activado). La presencia de la fracción I fue comprobada por SDS-PAGE, mostrando las bandas de las subunidades estructurales (L, S). La solución alcalina con base Tris incrementó el rendimiento de extracción en comparación con NaOH. Por otro lado, metabisulfito de sodio mostró el mejor efecto en la disminución de la coloración de los aislados proteicos.

### ABSTRACT:

The world population has been growing continuously, which has led to the search for alternative sources to cover the food demand. In recent years, it has emphasized the use of vegetable protein as sustainable, effective and highly available nutrients for human consumption. The ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase enzyme / oxygenase (RuBisCO), is a protein (Fraction I) present in autotrophic organisms like as green leaves. It has been reported that it contains a high biological value proteins in comparison to others proteins such as casein and egg. However, some compositional compounds such as phytochemicals producing some off-flavors/odour, which decrease the consumers preference. In this study, protein isolates were obtained from alfalfa biomass by alkaline extraction bases (Tris, NaOH) and reducing / adsorbent agents (sodium metabisulfite, PVPP, and activated carbon). The presence of fraction I protein was confirmed by SDS-PAGE analyses showing the bands of structural subunits (L, S).The extraction yield of protein increased using Tris-base solution compared with NaOH. On the other hand, sodium metabisulfite agent showed a significant effect in decreasing the coloration of protein isolates.

**Palabras clave:** *Medicago sativa*, proteína foliar, RuBisCO.

**Keywords:** *Medicago sativa*, foliar protein, RuBisCO

**Área:** Nutrición y nutraceuticos.

### INTRODUCCIÓN

El crecimiento poblacional se percibe en un aumento constante, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que para el año 2050 la población mundial se encuentre por encima de los 9 mil millones (FAO/OMS, 2009). Esta problemática ha generado una enorme presión sobre el sistema productivo de alimentos a consecuencia del agotamiento de los recursos naturales. El consumo de proteínas es normalmente asociado a productos de origen animal, sin embargo se sabe que existen muchas fuentes vegetales que pueden proveer las mismas cantidades por porción de alimento (Barbeau & Kinsella, 1988). El uso de materiales vegetales como fuente de alimento proteico representa una alternativa sustentable, de bajo costo y eficiente para la alimentación humana. A pesar de que proteínas vegetales como la soya lleva décadas en el mercado, la disponibilidad de aislados proteicos vegetales comerciales es escasa.

Las fuentes más estudiadas han sido semillas oleaginosas, leguminosas y cereales, sin embargo se ha reportado que los organismos autótrofos entre ellos plantas verdes, contienen una fracción de proteína soluble de alto valor biológico (Fracción I). Esta proteína (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa), es una enzima localizada en la fracción soluble de los cloroplastos que cataliza el primer paso de la fijación de carbono durante la fotosíntesis. Su estructura hexadecamérica está formada por 8 grandes subunidades (~55 KDa) acopladas a 8 pequeñas subunidades (~12.5 KDa) (Barbeau & Kinsella, 1988). Algunas de las razones por las cuales estas fuentes de proteína no han sido totalmente aceptadas, es porque en ocasiones presentan sabores anómalos (amargos) y por su coloración verde oscura, derivada de los pigmentos de la planta, clorofila, carotenoides, proteínas cloroplásticas y productos de oxidación de los polifenoles.

La alfalfa (*Medicago sativa*), es una planta herbácea de la familia de las fabáceas, mundialmente cultivada como forraje en la producción de pellets de alto valor nutrición debido al alto contenido proteico (15-20 %), que son utilizados para la alimentación del ganado. En México se siembran alrededor de 4 millones de hectáreas para forrajes, de los cuales destaca la producción de alfalfa (SAGARPA 2015), con una producción de alrededor de 31.5 millones de toneladas anuales (SIAP, 2014). Normalmente durante la producción del alimento animal, la biomasa es cortada y presionada antes de secarse, procedimiento que produce una gran cantidad de jugo con proteínas solubilizadas que no es aprovechado y que ha sido reconocido como una fuente efectiva de proteínas de alta calidad para consumo humano (Xie *et al.*, 2008).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del tipo de solvente en el rendimiento de aislados proteicos foliares y el impacto del uso de agentes reductores y absorbentes en la disminución de reacciones oxidativas. Así mismo, el material foliar y los aislados fueron parcialmente caracterizados.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material Foliar**

Se trabajó con la biomasa foliar proveniente de cultivos de *Medicago sativa* procedente del estado de Oaxaca, México. El material fue almacenado a temperatura de congelación (-4 °C) hasta su posterior utilización.

### Preparación de aislados proteicos foliares

Las dispersiones formadas por hojas de alfalfa y soluciones alcalinas se homogenizaron (T 18 digital ULTRA-TURRAX®) y maceraron durante toda la noche a una temperatura de 4 °C. Dichas dispersiones se filtraron y el sobrenadante se calentó a 55°C durante 5 minutos. Posterior al tratamiento térmico, las dispersiones se centrifugaron y el remanente fue descartado. La recuperación de la proteína solubilizada se realizó mediante precipitación isoeléctrica. La proteína obtenida se secó en una estufa al vacío a 60 °C durante 4 horas.

### Caracterización parcial del material foliar

El material foliar fue caracterizado en humedad, ceniza y fibra de acuerdo a las normas mexicanas NMX-F-428-1982, NMX-F-066-S-1978 y la ISO6865 (AOAC 978.10) respectivamente. La determinación de proteínas totales del material foliar y de los aislados proteicos se realizó por el método Kjeldahl (AOAC, 1997), llevando a cabo los pasos de digestión, destilación y titulación. El contenido de proteína se calculó multiplicando el contenido de nitrógeno por el factor de conversión Jones de 6.25 (FAO, 1973).

### Determinación de la coloración de los extractos proteicos

El efecto de los agentes a) metabisulfito de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) b) PVPP (polivinilpirrolidona) c) carbón activado granular (poro 4-14), se evaluó mediante espectrofotometría UV visible a una longitud de onda de 420 nm. Las cantidades utilizadas de los agentes mencionados fueron 0.2 % (p/v), 0.04 % (p/v) y 200 mg/5 ml. El porcentaje de pardeamiento de los extractos proteicos foliares de alfalfa obtenidos a partir de las dispersiones foliares (hoja: solución alcalina) centrifugadas fue calculado utilizando la ecuación 1. Las concentraciones de los agentes reductores fueron determinadas en relación a las cantidades permitidas para alimentos.

$$\% \text{ Coloración} = \frac{A_{420 \text{ nm}} \text{ control} - A_{420 \text{ nm}} \text{ muestra}}{A_{420 \text{ nm}} \text{ control}} \times 100$$

(1)

En donde  $A_{420 \text{ nm}} \text{ control}$  = muestra sin tratamiento,  $A_{420 \text{ nm}} \text{ muestra}$  extracto con tratamiento. (Giusti & Wrolstad, 2001).

### Gel electroforesis en condiciones desnaturizantes

Los aislados proteicos foliares obtenidos se solubilizaron y mezclaron con el buffer de muestra (Laemmli 1970) con se calentaron 95 °C durante 5 minutos antes de cargarse en el gel de poli(acrilamida). La separación de los polipéptidos fue en geles

de poliacrilamida de gradiente 4-12% de acuerdo al método de Laemmli (1970). Los geles fueron teñidos con azul brillante Coomassie R-250.

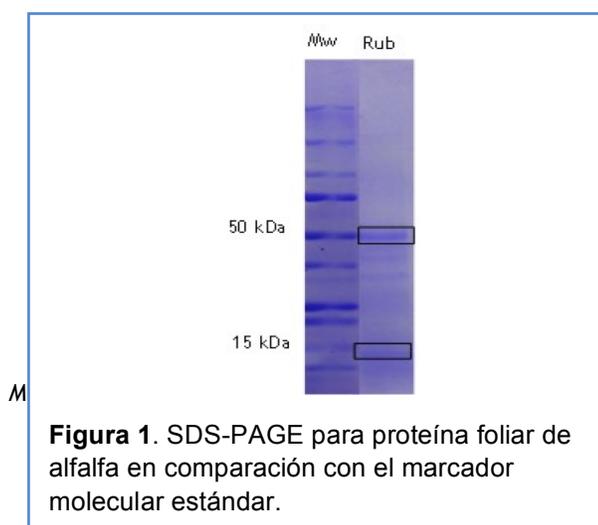
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla I se muestran los resultados composicionales del material foliar de estudio (*Medicago sativa*). El contenido de proteína, fibra y ceniza fueron similares a los reportados por Parada, 1975 (27.11, 18.59, y 12.47 % respectivamente), pero ligeramente mayores en ceniza que lo reportado por Edwards *et al.*, 1975. Esta característica pudo deberse a que el contenido de minerales es muy dependiente tanto de las condiciones de crecimiento de la planta, como a su capacidad de absorber agua pudiendo fácilmente variar de una plantación a otra. El contenido de proteína del pellet foliar resultante de la extracción proteica alcalina, mostró conservar aún la calidad proteica presentando valores de hasta un 20 %.

Tabla I. Caracterización parcial de la hoja de alfalfa	
Determinación (b.s)	Porcentaje
Ceniza	14.24 ± 0.03
Humedad	4.18 ± 0.79
Fibra	18.43 ± 0.11
Proteína	23.2 ± 0.38

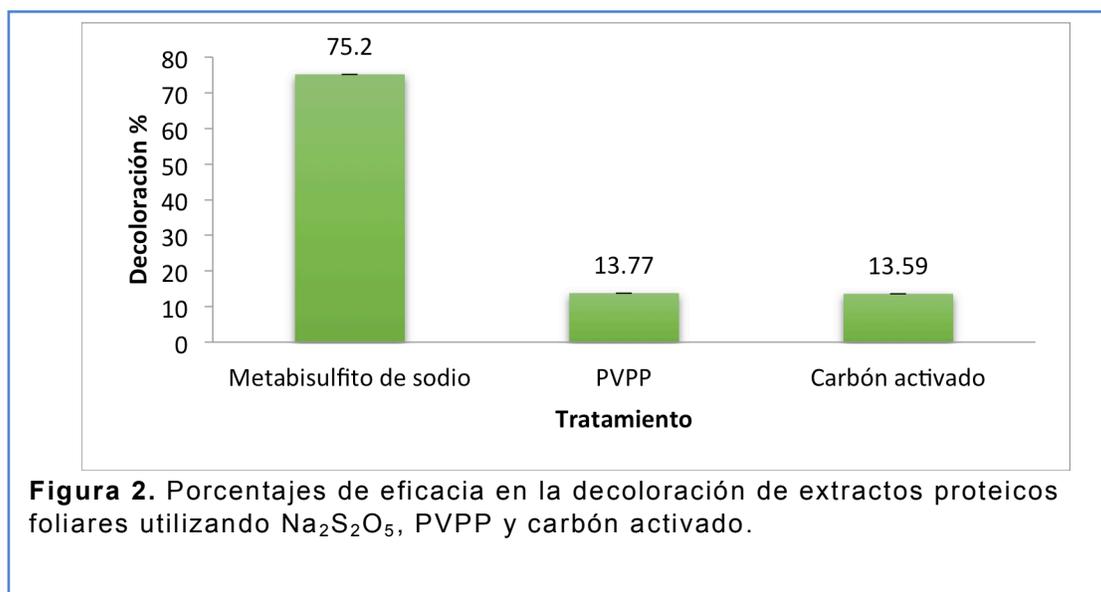
La naturaleza de la solución alcalina tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de rendimiento, en donde la sal Tris aumentó el rendimiento hasta 3 veces en comparación con el NaOH. Este resultado puede deberse a las características amortiguadoras de dicho compuesto, contribuyendo al mantenimiento del pH durante la etapa de solubilización proteica del proceso de extracción.

La presencia de la proteína RuBisCO en los extractos proteicos foliares fue comprobada mediante SDS-PAGE mostrando bandas pertenecientes a las subunidades larga y corta (L, S) con pesos moleculares de ~55 kDa y ~12.5 kDa respectivamente (Figura 1). Estas características estructurales ya han reportadas en la literatura por diferentes autores (Lamsal *et al.*, 2006; Geada *et al.*, 2011; Schwenzfeier *et al.*, 2011).



**Figura 1.** SDS-PAGE para proteína foliar de alfalfa en comparación con el marcador molecular estándar.

En cuanto a la efectividad de los agentes estudiados en la coloración de los extractos proteicos, se observó que el metabisulfito de sodio, disminuyó significativamente el color, seguido por PVPP y el carbón activado (Figura 2). Estudios previos realizados por Manohan *et al.* (2012), demostraron la efectividad del  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , en reacciones de pardeamiento en vegetales (papa), como inhibidores de la actividad enzimática de PFO. En nuestro caso, los resultados podrían indicar que la coloración del extracto es principalmente debido a reacciones de oxidación que a compuestos de pigmentación. Debido a que son los compuestos sulfitos los cuales se caracterizan por actuar en la inactivación de las PFO o en la reducción de los compuestos de oxidación (quinonas) a fenoles. (Kavrayan & Aydemir, 2001; Paul & Gowda, 2000).



### CONCLUSIONES

El fraccionamiento de la proteína foliar obtenida de alfalfa podría ser una herramienta útil en el doble aprovechamiento (humano-animal) de la biomasa de dicho cultivo que presenta una alta extensión territorial en México. Por otro lado, la Fracción I (RuBisCO), podría ser una fuente alternativa de proteína para consumo humano que sea más sustentable, de bajo costo, alta disponibilidad y de mayor asequibilidad para la población de escasos recursos.

### BIBLIOGRAFÍA

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1997). Official Methods of Analysis, 16th ed. Pp. 2-32. Washington, DC: AOAC.
- Barbeau, W. E., & Kinsella, J. E. (1988). Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) from green leaves-potential as a food protein. *Food Reviews International*, 4(1), 93-127.
- Edwards, R. H., Miller, R. E., De Fremery, D., Knuckles, B. E., Bickoff, E. M., & Kohler, G. O. (1975). Pilot plant production of an edible white fraction leaf  
*Medina-Chávez y Baigts-Allende/Vol. 2 (2017) 295-300*

- protein concentrate from alfalfa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(4), 620-626.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2009 FAO en el siglo XXI. Lograr la seguridad alimentaria en un mundo cambiante. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/015/i2390s/i2390s00.pdf>. Consultado el 4 de abril del 2015.
- Geada, D., Alvarez, A., Alonso, A., Garcia, H., Valdes, R., Geada, G. (2011). & Playa, L. H. Purificación de la rubisco de tabaco sin pasos cromatográficos: evaluación genotóxica y citotóxica en células de *Escherichia coli*.
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lamsal, B. P., Koegel, R. G., & Gunasekaran, S. (2007). Some physicochemical and functional properties of alfalfa soluble leaf proteins. *LWT-Food Science and Technology*, 40(9), 1520-1526.
- Manohan, D., & Wai, W. C. (2012). Characterization of polyphenol oxidase in sweet potato (*Ipomoea Batatas* (L.)). *Journal for the Advancement of Science & Arts*, 3(1), 14-31.
- Mexicana N. NMX-F-428-1982. Determinación de humedad en alimentos (método rápido de la termobalanza). *Determination of moisture in food*. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. NMX F.
- Mexicana, N. NMX-F-066-S-1978. Determinación de cenizas en alimentos. Foodstuff-Determination of ashes. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. NMX F.
- Parada, E. (1975), Tesis de Maestría en Ciencias. Producción de concentrados proteínicos a partir de hojas. ENCB-IPN. México D.F.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). Tercer informe de labores 2014-2015. Estrategia de Productividad y Competitividad Agroalimentaria. Producción agrícola. 2015. Disponible en: [http://www.sagarpa.gob.mx/Transparencia/POT\\_2015/FRACCION\\_X/3er\\_Informe\\_de\\_Labores\\_Sagarpa\\_2015.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/Transparencia/POT_2015/FRACCION_X/3er_Informe_de_Labores_Sagarpa_2015.pdf). Consultado el 13 de abril 2016.
- Schwenzfeier, A., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2011). Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis* sp. *Bioresource technology*, 102(19), 9121-9127.
- SIAP (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2014. Anuario Estadístico de la producción agrícola. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>. Consultado el 10 abril de 2016.
- Thiex, N. (2008). Evaluation of analytical methods for the determination of moisture, crude protein, crude fat, and crude fiber in distillers dried grains with solubles. *Journal of AOAC International*, 92(1), 61-73.
- Xie, Z., Huang, J., Xu, X., & Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 111(2), 370-376.