

## Efecto de la especie sobre el punto isoelectrico de proteínas y el contenido de compuestos fenólicos del Frijol Arroz y Frijol Vaquita

O. Campos-Herrera, L. González-Cruz, J.M.S. Juárez-Goiz, J.B.E. Hernández-Castillo, L.P. Ortiz-Camacho y A. Bernardino-Nicanor\*

Instituto Tecnológico de Celaya TecNM. Departamento de Ingeniería Bioquímica. Antonio García Cubas Pte. #600 esq. Av. Tecnológico. C.P. 38010. Celaya. Guanajuato. México.

\*aurea.bernardino@itcelaya.edu.mx

**RESUMEN:** El género *Vigna* pertenece a la familia de las leguminosas, por su alto contenido proteínico representa una fuente importante de péptidos que podrían tener propiedades nutraceuticas, es por ello que determinar la diferencia entre el contenido de proteína, punto isoelectrico y compuestos fenólicos de las especies *Vigna unguiculata* y *Vigna umbellata* se considera relevante, para lo cual, la determinación del contenido de proteína tanto en la harina como en del aislado se realizó por el método de microkjeldahl, el punto isoelectrico de ambas especies se determinó de acuerdo a la metodología reportada por Bernardino-Nicanor *et al.*, 20001 y el contenido de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteau. Los resultados indican que la especie influye sobre la concentración y composición de la proteína, por lo que ambas características presentan diferencias significativas, siendo el frijol arroz el que mostró mayor contenido proteínico (30.42 % b.s), un punto isoelectrico ubicado en un pH más bajo (4.0) que el frijol vaquita (4.5), con lo que se logró aislar mayor concentración de proteína (81.88 % b.s) que el frijol vaquita (72.05% b.s), y mayor contenido de compuestos fenólicos (168.72 mg de GAE/g de muestra).

**Palabras clave:** Aislamiento, *Vigna unguiculata*, *Vigna umbellata*.

**ABSTRACT:** The *Vigna* genus is part of the legume family and due their high protein content the species of the *Vigna* genus, are an important source of peptides that could have nutraceutical properties. However differences between species on the protein characteristics have been reported, for this reason in this study the influence of the specie on the isoelectric point of the proteins was determined as well as the total phenolic content of the *Vigna unguiculata* and *Vigna umbellata* species. The protein content in the flour and the isolate of both species was carried out according of microkjeldahl method, the isoelectric point of both species was determined according to the methodology reported by Bernardino-Nicanor *et al.*, 2001 and the total phenolic content was carried out by the Folin-Ciocalteau method. The results indicate influence of the specie on the concentration and composition of the protein, the rice beans showed the highest protein content (30.42% db), an isoelectric point located at a lower pH (4.0) that the cow bean (4.5), and an isolate with higher concentration of protein (81.88% db) than the cow bean (72.05% db) also a higher content of phenolic compounds (168.72 mg of GAE / g of sample). In conclusion, apparently the rice bean show best protein characteristics than the cow bean.

**Keywords:** Isoelectric point, *Vigna unguiculata*, *Vigna umbellata*.

**Área:** Cereales, leguminosas y oleaginosas

### INTRODUCCIÓN

Actualmente, el incremento en la incidencia de las enfermedades crónico degenerativas, ha traído consigo la necesidad de la búsqueda de nuevas alternativas para su tratamiento, o prevención, es por ello que se ha prestado particular interés en las leguminosas, ya que ésta familia ha mostrado ser fuente importante de compuestos bioactivos con efecto positivo para prevenir o reducir los trastornos a la salud, que éstas enfermedades producen en el organismo (Paredes y Valverde, 2006; Figueroa *et al.*, 2010).

Entre las leguminosas que han sido poco estudiadas desde el punto de vista nutraceutico, se encuentra el género *Vigna*, específicamente el frijol arroz (*Vigna umbellata*) y el frijol vaquita (*Vigna unguiculata*). El frijol arroz (*Vigna umbellata*) antes llamada *Phaseolus calcaratus*, es nativo del

sudeste de Asia, se cultiva principalmente para alimentos, forraje y abono verde sobre todo en las regiones del Este y Noreste de la India (Saikia *et al.*, 1999; Chandel *et al.*, 1978, Mukherjee *et al.*, 1980; Singh *et al.*, 1980). Su importancia radica en su composición nutricional, ya que tiene alta proporción de proteína (20.78%), carbohidratos (59.96%), calcio y hierro biodisponible, así como por los compuestos fenólicos, que le proporcionan alta capacidad antioxidante, (Hoque *et al.*, 2015). Investigaciones recientes, han demostrado que el frijol arroz puede ser utilizado en tratamiento de enfermedades crónico degenerativas como la diabetes, hipertensión e inclusive el cáncer (Ye and Ng 2002; Yao *et al.*, 2012, Wei *et al.*, 2015). EL Frijol vaquita (*Vigna unguiculata*) es originaria de África, se cultiva desde hace 5,000 ó 6,000 años, es una planta asociada al sorgo y al mijo, es un cultivo que se usa tanto en la alimentación humana como animal. El frijol vaquita contiene alta proporción de proteínas con amino ácidos esenciales, ácidos grasos poliinsaturados, fibra dietética, minerales y vitaminas esenciales, comparables con otras leguminosas comunes (Vargas 2012).

Por lo anteriormente mencionado, se considera relevante determinar la influencia de la especie sobre el punto isoeléctrico y contenido de compuestos fenólicos. Los resultados mostraron que el frijol arroz presenta mayor concentración de proteína ( $30.421 \pm 1.1\%$  b.s.) en comparación con el frijol vaquita ( $21.58 \pm 1.14\%$  b.s.). Por otra parte, el punto isoeléctrico de la proteína del frijol vaquita se encontró en pH 4.5, logrando separar el 72 % b.s. del total de la proteína, mientras que la proteína del frijol arroz presentó su punto isoeléctrico en un pH más bajo (4.0), logrando obtener un aislado proteínico con 81.6 % b.s de proteína. Por su alto contenido de compuestos fenólicos (168.72 mg of GAE / g of sample), el frijol arroz representa una fuente potencial de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes. Tanto el frijol arroz como el frijol vaquita representan una fuente importante de proteína que podría tener propiedades nutraceuticas para el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materia Prima

El frijol arroz y el frijol vaquita son provenientes del municipio de Zacatlán ubicado en la Sierra Norte del estado de Puebla, sus coordenadas geográficas son 19° 56' 5" latitud norte, 98° 12' 36" latitud occidental.

### Obtención de harina

Los frijoles de cada especie se molieron con un molino manual, la harina resultante se tamizó a través de la malla No. 40, para tener un tamaño de partícula homogéneo.

### Determinación del punto Isoeléctrico

La determinación del punto isoeléctrico de la proteína se realizó utilizando el método de Bernardino-Nicanor *et al.*, 2001. Una disolución harina de harina: agua 1:14 (p/v), se ajustó a pH de 6, 7, 8, 9 y 10 con NaOH (0.1N), se centrifugó a  $6000 \times g$  por 30 min, y se determinó el contenido de proteína en el sobrenadante para determinar el pH de máxima solubilización de la proteína, utilizando el pH seleccionado, se ajustó el pH del sobrenadante a pH 3, 4 y 5 con HCl (0.1N), se centrifugó a  $6000 \times g$  por 30 min, y se determinó el contenido de proteína en el sobrenadante el pH de máxima precipitación de la proteína es el punto isoeléctrico. La determinación del contenido proteínico se realizó por el método de Bradford, 1976.

### Determinación de proteína de la harina y los aislados proteínicos

Se determinó por el método de microkjeldahl del AOAC, 1995 (Número 995.04). 0.2 g de muestra con 0.2 g de mezcla catalítica y 4 mL de ácido sulfúrico concentrado, se colocaron en el equipo de digestión, la muestra digerida fue colocada en el tubo de destilación con 14 mL de NaOH al 40% y 25 mL de agua destilada, para colectar el destilado se utilizó un matraz Erlenmeyer con 20 mL de ácido bórico al 4% e indicador de Wesselow, el destilado (50 mL) se tituló con una disolución de HCl 0.1N.

**Determinación del Contenido de Fenoles Totales (CFT)**

Para la determinación de fenoles totales se utilizó la técnica de Folin-Ciocalteu adaptada para alimentos por Singleton *et al.*, 1999. 1.58 mL de muestra se mezclan con 100 µL de reactivo Folin-Ciocalteu, se deja reposar por 8 minutos, se agregan 300 µL de disolución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20%), se agita hasta su completa homogeneización y se deja reposar por 2 horas a 20°C, se lee la absorbancia a 765 nm.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Determinación del contenido de proteína**

Los resultados indican que la especie influye en el contenido proteínico de la semilla (Tabla I), ya que el frijol arroz presentó mayor contenido de proteína en comparación con el frijol vaquita, mostrando diferencias estadísticamente significativas, entre ambas especies, sin embargo, ambas s representan una fuente importante de esta macromolécula.

| Tabla II: Contenido de proteína de harina del frijol vaquita ay frijol arroz |                         |
|--|-------------------------|
| Frijol   | Proteína (%) b.s.       |
| Vaquita  | 21.58±0.14 <sup>a</sup> |
| Arroz  | 30.42±0.1 <sup>b</sup>  |

Letras distintas en la misma columna, indican diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ).

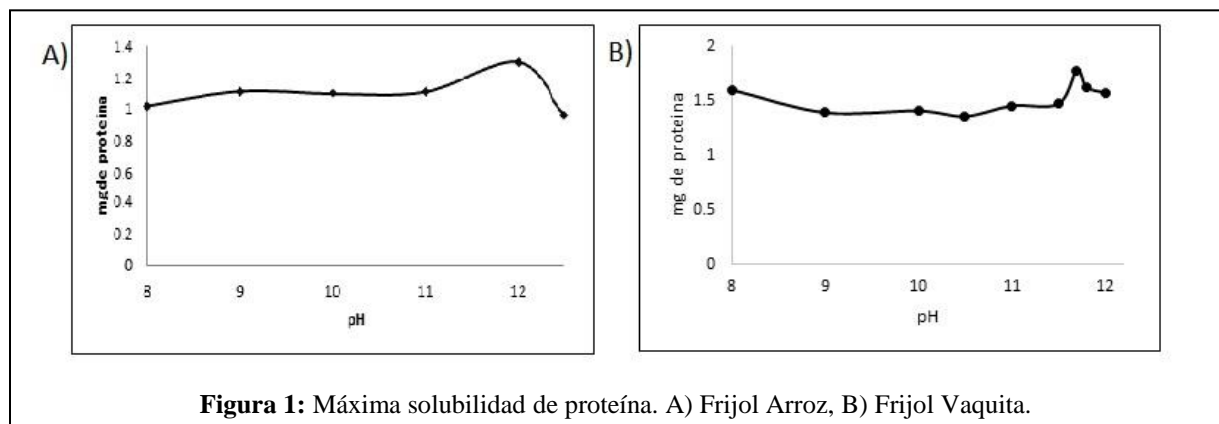
El contenido proteínico del frijol vaquita obtenido en el presente trabajo, es superior al reportado por Quinga, 2017 (17.5%), pero inferior al reportado por Lujan, 2019, (24.47%). Mientras que, el frijol arroz analizado presentó un valor superior al reportado por Katoch, 2013 (22.9 %); Van Oers, 1992 (20.9 %); Kaur *et al.*, 2013 (18.6 – 20.4 %) y Saikia, 1999 (16.9-18 %).

Las diferencias observadas entre lo reportado en la literatura y lo obtenido en el presente trabajo, podrían atribuirse a diferentes factores, tales como; método de determinación del contenido proteínico, técnicas de cultivo, ubicación geográfica y variedad, principalmente.

**Determinación del punto isoeléctrico**

El pH de máxima solubilidad del frijol arroz (Figura 1A), se encontró en 12.0, mientras que en el caso del frijol vaquita (Figura 1B), se encontró en 11.7. Estos resultados son un indicio de que la estructura y composición de las proteínas que conforman cada especie son diferentes.

Para la obtención del punto isoeléctrico, se utilizó como base el pH de máxima solubilidad



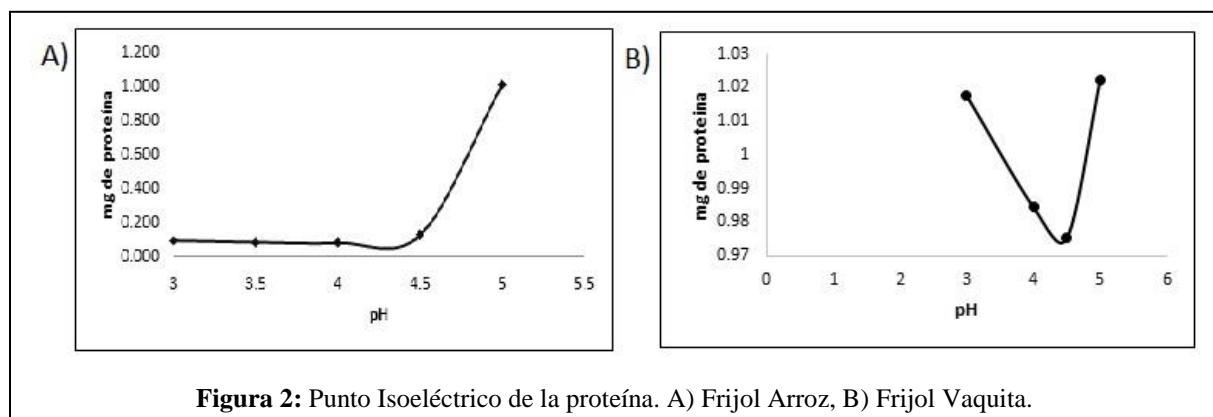
**Figura 1:** Máxima solubilidad de proteína. A) Frijol Arroz, B) Frijol Vaquita.

determinado previamente, utilizando como intervalo de muestreo pH's de 3-5 (valores que son utilizados comúnmente para leguminosas).

Los resultados mostraron que el punto isoeléctrico de la proteína del frijol arroz se encuentra en un pH de 4.0 (Figura 2A) y para el frijol vaquita a pH de 4.5 (Figura 2B).

La diferencia en el punto isoeléctrico de ambas especies, son debidas principalmente a la estructura, secuencia y composición de aminoácidos de la proteína que conforma la semilla.

El punto isoeléctrico obtenido para ambas especies se encuentra dentro del intervalo reportado para las



leguminosas de 4 a 6 (Silva *et al.* 1997; Duque *et al.* 2001; Kinsella *et al.* 1976; Adebowate *et al.* 2005; Chove *et al.* 2007)

#### Determinación de proteína de los aislados proteínicos

La concentración de proteína que se logró separar de ambas especies es superior al 70% (Tabla II), es por ello que se considera que se logró obtener aislados proteínicos (Boye *et al.*, 2010; Porrás, 2010).

La concentración de proteína que se logró aislar es superior para el frijol arroz, lo cual es un indicio de que la proteína de esta especie presenta una estructura menos compacta que es más fácilmente alterada con la modificación del pH del medio, lo que permite que sea más fácilmente aislada.

| Frijol  | Proteína (%) b.s.       |
|---------|-------------------------|
| Vaquita | 72.05±0.96 <sup>a</sup> |
| Arroz   | 81.66±2.06 <sup>b</sup> |

Letras distintas en la misma columna, indican diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ).

El contenido de proteína del aislado del frijol vaquita obtenido en el presente trabajo es semejante al reportado por Lujano, 2019 (71.15).

#### Determinación del Contenido de Fenoles Totales (CFT)

El frijol arroz presenta mayor concentración de compuestos fenólicos, que el frijol vaquita. Por otra parte, ambos aislados mostraron la presencia de aminoácidos aromáticos, los cuales pueden ser determinados por el método de Folin.

|         | Harina                   | Aislado                 |
|---------|--------------------------|-------------------------|
| Vaquita | 63.48±0.12 <sup>a</sup>  | 40.48±0.42 <sup>a</sup> |
| Arroz   | 168.55±0.55 <sup>b</sup> | 60.44±0.51 <sup>b</sup> |

Letras distintas en la misma columna, indican diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ).

Se ha reportado que el frijol arroz contiene  $4.88 \pm 0.11$  mg GAE/g, valor inferior al obtenido en el presente trabajo, mientras que el frijol vaquita presentó menor concentración a la reportada en la literatura ( $2440.56 \pm 0.06$  mg/100g) (Vargas *et al.*, 2012; Yao *et al.* 2011)

### BIBLIOGRAFÍA

- Adenowale, Y.A., Adeyemi, A. y Oshodi, A.A. (2005). Variability in the physicochemical, nutritional and antinutritional attributes of six *Mucuna* species. *Food Chemistry*. 89 (1): 37-48.
- Bernardino-Nicanor, A., Moreno, A. O., Ayala, A. M., & Ortíz, G. D. (2001). Guava seed protein isolate: functional and nutritional characterization. *Journal of food biochemistry*, 25(1), 77-90.
- Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43, 414-431.
- Bradford M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Chandel, K. P. S., Joshi, B. S., Arora, R. K., & Pant, K. C. (1978). Rice bean a new pulse with higher potential. *Indian Farming*, 28, 9, 19-22
- Chove, B., Grandison, A.S. y Lewwis, M.J. (2007) Some functional properties of fractionated soy protein isolates obtained by microfiltration. *Food Hydrocolloids*. 21(3): 113-120.
- Duque, R.L., Davila, O.G., Velazquez, R.A.D, Vidal, M.O., Sanchez, P.M.E. y Calderon, D.G. (2001). Efecto del pH sobre las propiedades funcionales de un micelizado de semillas de cacahuate (*arachis hypogaea* L.) variedad virginia. IX congreso nacional de biotecnología y bioingeniería, XIII congreso nacional de ingeniería bioquímica, II congreso internacional de ingeniería bioquímica Veracruz, Mexico. Sociedad Mexicana de biotecnología y bioingeniería.
- Figueroa, G. J. J., Guzmán, M. S. H., Herrera, H. M. G., Rumayor, R. A. F., Alvarado, N. M. D. y Sánchez, T. B. I. (2010). Botana a base de frijol con alto valor nutricional y nutracéutico. Folleto Técnico. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC-INIFAP. (28): 27.
- Hoque B. R., D. D. Wadikar and P. E. Patki. (2015). Rice bean: nutritional vibrant bean of Himalayan belt (North East India). *Nutrition & Food Science*. 46:412-431.
- Katoch R., Nutritional potential of rice bean (*Vigna umbellata*) an underutilized legume, *J. Food Sci.* 78 (2013) C8-C16.
- Kaur, A. ; Kaur, P. ; Singh, N. ; Singh Virdib, A. ; Singh, P. ; Chand Ranac, J., 2013. Grains, starch and protein characteristics of rice bean (*Vigna umbellata*) grown in Indian Himalaya regions. *Food Res. Int.*, 54 (1): 102-110.
- Kinsella, J.E. y Melachouris, N. (1976). Functional properties of protein in foods: A survey. *CRC critical Reviews in food Science and Nutrition*. 7(3): 219-280.
- Lujano N. J., Pacheco, E. (2019). "Propiedades funcionales de harina y aislados proteico del frijol pinto (*vigna unguiculata*).
- Mukherjee, A. K., Roquib, M. A., y Chatterjee, B. (1980). Rice bean K-1 for the scarcity period. *Indian Farming*, 29, (12), 19-26.
- Paredes, O. y Valverde, M., E. (2006). Los recursos nutracéuticos y medicinales que Mesoamérica le ha dado al mundo. *CINVESTAV*. 25(3): 65-73.
- Porras Saavedra, J. (2010). Caracterización del proceso de obtención de aislados de proteína de *Lupinus silvestre* del estado de Hidalgo.
- Quinga, M. A. (2017). "Caracterización de proteínas obtenidas a partir de harina de Firiguero (*Vigna unguiculata* L.) y de sus hidrolizados mediante electroforesis SDS-PAGE y RP-UHPLC. Universidad técnica de Ambato.
- Saikia, P; Sarkar, C. R y Borua, I; 1999. Chemical composition, antinutritional factors and effect of cooking on nutritional quality of rice bean (*Vigna umbellata* (Thunb). Ohwi and Ohashi) *Food Chemistry* 67(4): 347-352.
- Silva, JBD., Bora, P.S. y Neto, V.Q. (1997). Caracterización de propiedades funcionales de aislado proteico de semillas de algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) modificado por acelicao. *Ciencia y tecnología de alimentos*. 17(3).

## Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos

- Singh, S. P., Mishra, B. K., Chandel, K. P. S., & Pant, K. C. (1980). Major food constituent of rice bean (*Vigna umbellata*). *Journal of Food Science and Technology*, 17, 238-240.
- Van Oers CCCM. 1992. *Vigna umbellata*. Pp 75-77. En: L.J.G. Pulses, van der Maesen, S. Somaatmadja (eds.). *Plant Resources of South East Asia, PROSEA1*.
- Vargas, Y. R., Villamil, O. E., Murillo, E., Murillo, W., & Solanilla, J. F. (2012). Caracterización fisicoquímica y nutricional de la harina de frijol caupí *Vigna unguiculata* L. cultivado en Colombia. *Vitae*, 19(1), S320-S321.
- Wei, Y., Yan, J., Long, F. and Lu, G. (2015). *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi et Ohashi or *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi et Ohashi (Chixiaodou, Rice Bean). in Liu, Y., Wang, Z. And Zhang, J. (Eds), *Dietary Chinese Herbs Chemistry, Pharmacology and Clinical Evidence*, Springer, New York, NY, pp. 551-560.
- Yao, Y., Cheng, X., Wang, L., Wang, S., & Ren, G. (2011). Biological potential of sixteen legumes in China. *International journal of molecular sciences*, 12(10), 7048-7058.
- Yao, Y., Cheng, X.Z., Wang, L.X., Wang, A.H. and Ren, G. (2012). Major phenolic compounds, antioxidant capacity and antidiabetic potential of rice bean (*Vigna umbellata* L.) in China. *International Journal of Molecular Science*. 13: 2707-2716.
- Ye, X.Y. and Ng, T.B. (2002). Delandin, a Chitinase-like Protein with antifungal, HIV-1 reverse transcriptase inhibitory and mitogenic activities from the rice bean *Delandia umbellata*. *Protein Expression and Purification*. 24(3): 524-529.