

Fraccionamiento y caracterización de las proteínas solubles de la harina de nuez de Barinas (*Caryodendron orinocense* K.)

Fractionation and characterization of soluble proteins from Nuez de Barinas (*Caryodendron orinocense* K.) flour

Fanny C. Padilla *¹, Thanee Guedez,² Maria J Alfaro ¹, Miriam Regnault,³ Alicia M

Rincón C ¹

* Autor para correspondencia

¹ Unidad de Análisis de Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela (UCV) Apdo 40109 Caracas, 1040 Venezuela. fannypadilla@hotmail.com

² Postgrado de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV)

³ Laboratorio de Análisis de Medicamentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela (UCV)

Resumen

La harina de nuez de Barinas (*Caryodendron orinocense* K.) de acuerdo a estudios realizados presenta un contenido de proteínas en el rango de 15-18%, que permite se pueda considerar como fuente de proteína. Sin embargo no se conoce la composición de estas proteínas. En este estudio se realizó un proceso de fraccionamiento de acuerdo a la solubilidad en diferentes solventes (agua, cloruro de sodio al 5%, hidróxido de sodio 0,02N, etanol al 70%), y el establecimiento de la composición proteica según el peso molecular de la harina de nuez de Barinas obtenida a partir de las nueces secas, molidas y desgrasadas, determinando el rango de pesos moleculares por SDS-PAGE y su comparación con el rango de pesos moleculares de las proteínas de la harina de soya (*Glycine max*). Asimismo, se determinó la digestibilidad *in vitro* por hidrólisis enzimática. Los resultados indican un rango de PM de 20.000-97.000 daltons para la soya y de 6.500-45.000 daltons para la nuez de Barinas. El peso molecular más bajo sugiere una más fácil digestión de las proteínas, que corrobora el valor de la digestibilidad obtenido de 75%. Las proteínas presentes están constituidas por albúminas 50,72%, globulinas 15,56%, prolaminas 23,10% y glutelinas 2,52% que representan el 92,15% del total de proteínas presentes. Estas fracciones presentaron una pureza de 81,57%, 94,01%, 70,86% y 92,53%, respectivamente. Estos resultados sugieren la posibilidad de uso de la harina de *Caryodendron orinocense* en el desarrollo de productos alimenticios para niños y ancianos.

Palabras clave: *Caryodendron orinocense* K, fraccionamiento de proteínas, albúminas, globulinas, prolaminas, glutelinas.

Summary

Nuez de Barinas (*Caryodendron orinocense* K.) flour has been reported to have a content of proteins in the range of 15-18% that allows considering it as a source of proteins. However, there is no evidence on the composition of these proteins. The objective of this study was the extraction and separation of the different fractions of proteins based on their solubility in different solvents (water, 5% sodium chloride, sodium hydroxide 0.02N, and 70% ethanol), and the protein composition assessment of the nuez de Barinas flour from dried, milled, and defatted nuts; by analysis of the range of molecular weight by SDS-PAGE. Molecular weights of proteins from soybean (*Glycine max*) flour, were used for comparison. *In vitro* protein digestibility was determined by enzymatic hydrolysis. Results presented soy proteins in the range of 20.000-97.000 daltons while the nuez de Barinas flour proteins were in the range of 500-45.000 daltons. Low molecular weight proteins should suggest a much easier digestibility of these proteins, which is related to the digestibility index of 75% found. Protein composition was found to be 50.72% albumins, 15.56% globulins, 23.10% prolamins, and 2.52% glutelins which represent 92,15% of total proteins present. These fractions showed a percent purity of 81.57; 94.01; 70.86; and 92.53, respectively. These results suggest the possibility to use this flour in developing food products for children and elderly persons.

Key words: *Caryodendron orinocense* K, protein fractionation, albumins, globulins, prolamins, glutelins.

Introducción

La búsqueda de fuentes alternativas de proteínas se ha convertido, a lo largo de las últimas décadas, en una importante tendencia de investigación, no solo para encarar la creciente demanda de proteínas sino también para conseguir cultivos alternativos que sustituyan a las proteínas de origen animal, capaces de suplementar proteína de alta calidad (1) y prevenir la malnutrición. Las proteínas de nueces en general, gozan de aceptación mundial y son valoradas por sus atributos sensoriales y nutricionales. La harina de nuez de Barinas (*Caryodendron orinocense* K.), árbol nativo del piedemonte andino venezolano de acuerdo a estudios realizados presenta un contenido de proteínas en el rango de 15 – 18%, que permite se pueda considerar como fuente de proteína (2).

El fraccionamiento de las proteínas de fuentes alimenticias tiene gran importancia porque permite explicar la contribución de cada fracción a la calidad nutricional y las propiedades funcionales y por ende las aplicaciones en la elaboración de ciertos productos alimenticios (3). La extracción o fraccionamiento de proteínas de nueces, cereales y leguminosas ha sido realizada por diferentes autores en base a su solubilidad en diferentes solventes (4-6). Si la calidad de una proteína es importante, le sigue en importancia la digestibilidad, pues no todas las proteínas son digeridas, absorbidas y utilizadas en la misma medida por el organismo humano. Las diferencias de digestibilidad entre las proteínas pueden deberse a diferencias inherentes a la naturaleza de las mismas (configuración, unión de los

aminoácidos), a la presencia de componentes no proteicos con influencia en la digestión (fibra dietaria, taninos y fitatos), a la presencia de factores antinutricionales o a las condiciones de procesamiento de los productos que las contienen que pueden interferir con los procesos enzimáticos de liberación de los aminoácidos. Aún cuando ya se ha establecido la importancia nutricional y tecnológica de la harina de nuez de Barinas, no se han llevado a cabo la determinación de la digestibilidad *in vitro* y la separación y caracterización de las diferentes fracciones proteicas de la misma; razón por la cual surge la necesidad de realizar este estudio.

Materiales y Métodos

Preparación de la muestra:

Las nueces de *Caryodendron orinocense* K., obtenidas en la región de Calderas, Edo. Barinas, Venezuela, fueron descascaradas manualmente y posteriormente molidas en un equipo Modelo 43A F.J. (Stokes Machine Company, Filadelfia, USA). La harina obtenida fue desecada en una estufa con extractor de aire Modelo 38B (Stokes Machine Company, Filadelfia, USA) a 45⁰C por un período de 24 h y desgrasada en un extractor de Soxhlet Vari-Heat, Chicago, USA, utilizando como solvente hexano grado analítico, evaporándolo luego en un rotavapor Heidolph VV 2011 (Heidolph-Elektro Kelheim, Germany). La harina así obtenida se hizo pasar a través de un tamiz de 60 micras de diámetro, para obtener un material uniforme,

que se almacenó en bolsas plásticas, a vacío a 0°C, hasta su posterior tratamiento y evaluación.

Fraccionamiento de proteínas:

Las proteínas de la harina desgrasada fueron extraídas, de acuerdo a su solubilidad según el esquema de la Fig. 1, en una relación de (1:10) durante 30 min con agitación constante, realizando la extracción con cada solvente dos veces, para obtener en el agua (albúminas), en solución de NaCl al 5% (globulinas), en NaOH 0,02N (glutelinas) y en alcohol al 70% prolaminas (7). Luego del período de extracción se centrifugó a 3000 x g durante 30 min y los sobrenadantes del mismo solvente se combinaron, se precipitaron las proteínas en su punto isoeléctrico y los precipitados se lavaron con agua hasta neutralidad (pH 7) para luego liofilizarlos, pesarlos, almacenarlos en viales cerrados a -20°C hasta la realización de los ensayos.

Determinación de proteínas

El contenido de nitrógeno presente en la harina de nuez de Barinas, y en cada sobrenadante y fracción liofilizada obtenidos durante el proceso de extracción se determinó por el método de micro-Kjeldahl (8), para obtener las proteínas presentes multiplicando el resultado por el factor 6,25. Se calculó el porcentaje de recuperación o rendimiento del proceso de extracción tomando en cuenta el porcentaje de proteínas de la harina de nuez de Barinas y el porcentaje de

proteínas presentes en el volumen total de sobrenadante de cada proceso de extracción. El porcentaje de pureza se calculó como el porcentaje de proteínas presentes en cada precipitado liofilizado.

Electroforesis:

El rango de peso molecular de las proteínas se obtuvo por SDS-PAGE en geles miniatura (7 x 7 cm) de poliacrilamida y comparación con las proteínas de la harina de soya (9). Se pesaron 1g de harina de soya y 2g de harina de nuez de Barinas, se agregó buffer fosfato de sodio pH 7,3. Las muestras se agitaron 1 min., se centrifugaron y filtraron.

Se tomaron 200 µl del filtrado y se añadieron 200µl del buffer de muestra (Tris-HCl 0,5M, pH 8,8 12,5%, glicerol 10%, dodecil sulfato de sodio (SDS) 2%, mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,00125%), se llevó a ebullición 5 min y se enfrió a temperatura ambiente. Esta preparación se conservó bajo congelación hasta el momento de su uso. Alícuotas de 5µl se tomaron y se colocaron en las cavidades de los geles. La electroforesis se efectuó en geles de SDS-poliacrilamida al 12% total.

El rango de peso molecular de la mezcla proteínas estándar fue de 6.500 a 205.000 Daltons.

Digestibilidad *in vitro*:

Se realizó de acuerdo al método multienzimático (10). Las enzimas utilizadas fueron tripsina, quimotripsina y peptidasa. La digestibilidad se correlaciona con el descenso del pH después de 10 min. de la suspensión de proteína a pH 8 y 37°C, usando como patrón la caseína.

Análisis Estadístico

Todas las determinaciones realizadas fueron hechas por triplicado, y los resultados se calcularon sobre base seca, expresándose como promedio y desviación estándar.

Resultados

En la Tabla 1 se puede observar que la fracción de albúminas fue la más abundante en la harina de nuez de Barinas, seguida de las prolaminas mientras el porcentaje total de proteína extraída fue de 92,15% (% de recuperación o rendimiento). Los valores de pureza de las fracciones de proteínas variaron entre 94,01% para las globulinas y 70,86% para las prolaminas.

La determinación de pesos moleculares por electroforesis SDS-PAGE (Tabla 2) indica la presencia de 2 bandas de proteínas de bajo peso molecular en la muestra de harina de nuez de Barinas (*C. orinocense* K.) iguales a las de

proteínas de harina de soya y otras 3 bandas diferentes a las de soya, lo cual se presenta en un rango de PM de 6.500 – 45.000 daltons en la nuez de *β*arinas.

El estudio de la digestibilidad de la harina de nuez de Barinas (*C. orinocense* K.) *in vitro* presentó un valor de $75,5 \pm 0,2$ %.

Discusión

El mayor contenido de albúminas y de prolaminas diferencia la harina de nuez de Barinas (*C. orinocense* K.) de otras leguminosas que son ricas en albúminas y principalmente globulinas como es el caso del *Phaseolus vulgaris* (11) y lupino (*Lupinus mutabilis*) (12). La variación en el contenido de albúminas en leguminosas ha sido ampliamente reportada y de acuerdo con Bhatti (13) esto se debe al proceso de extracción, temperatura y el pH utilizado. Un rendimiento o porcentaje de recuperación de 92,15% se puede considerar alto, si se compara con un 42,4% obtenido para las proteínas del *Phaseolus lunatus* (14). La harina de nuez de Barinas contiene baja cantidad de glutelinas como las leguminosas pero se diferencia de estas por su contenido en prolaminas (15). El alto contenido de prolaminas la hace más cercana a las harinas de cereales que tienen como fracción proteica principal a las prolaminas.

En las determinaciones de pesos moleculares de las proteínas presentes por SDS-PAGE de las muestras analizadas (Tabla 2) se indica la presencia de 2 bandas de bajo peso molecular (20.000 y 36.000 Daltons) iguales a las

presentadas por la harina de soya y además otras 3 bandas diferentes a la soya pero también de bajo peso molecular (6.500, 14.200 y 29.000 Daltons).

Los resultados de los porcentajes de pureza de las fracciones proteicas, que fueron relativamente altas con excepción de las prolaminas, indican que el proceso de extracción fue adecuado bajo las condiciones programadas; dos extracciones sucesivas durante 30 min. cada una con agitación constante, pues el aumento del tiempo de extracción a 60 min no arrojó diferencias significativas en el porcentaje de recuperación y pureza.

La digestibilidad *in vitro* de la harina de nuez de Barinas (*C. orinocense* K.) presentó un valor de $75,5\pm 0,2$ %, valor similar al encontrado para el concentrado de lupino (*Lupinus mutabilis*) (16) y menor que el de aislado de soya (88.4%) (17). En general los aislados y concentrados proteicos presentan una mayor digestibilidad debido al proceso de obtención de los mismos que elimina parcial o totalmente algunos de los constituyentes no proteínicos (18).

Se ha demostrado que la harina de nuez de Barinas (*C. orinocense* K.) no contiene inhibidores de tripsina y presenta un contenido de fibra dietaria de 2.5 % (2), Sin embargo, es importante resaltar este valor de la digestibilidad (75,5%) porque estudio realizado en la harina de *Canavalia ensiformis* (leguminosa) se encontró una digestibilidad mucho menor 49,87% (19), por lo tanto una mayor digestibilidad significa una ventaja de la harina de *C. orinocense* K.

Como conclusión se puede inferir que la harina de nuez de Barinas (*C. orinocense* K.) tiene potencial como ingrediente en la formulación de alimentos para niños y ancianos, por las características fisiológicas que presentan estos grupos etarios y tomando en consideración los resultados obtenidos de bajo peso molecular de las proteínas y alta digestibilidad.

Esquema de Fraccionamiento

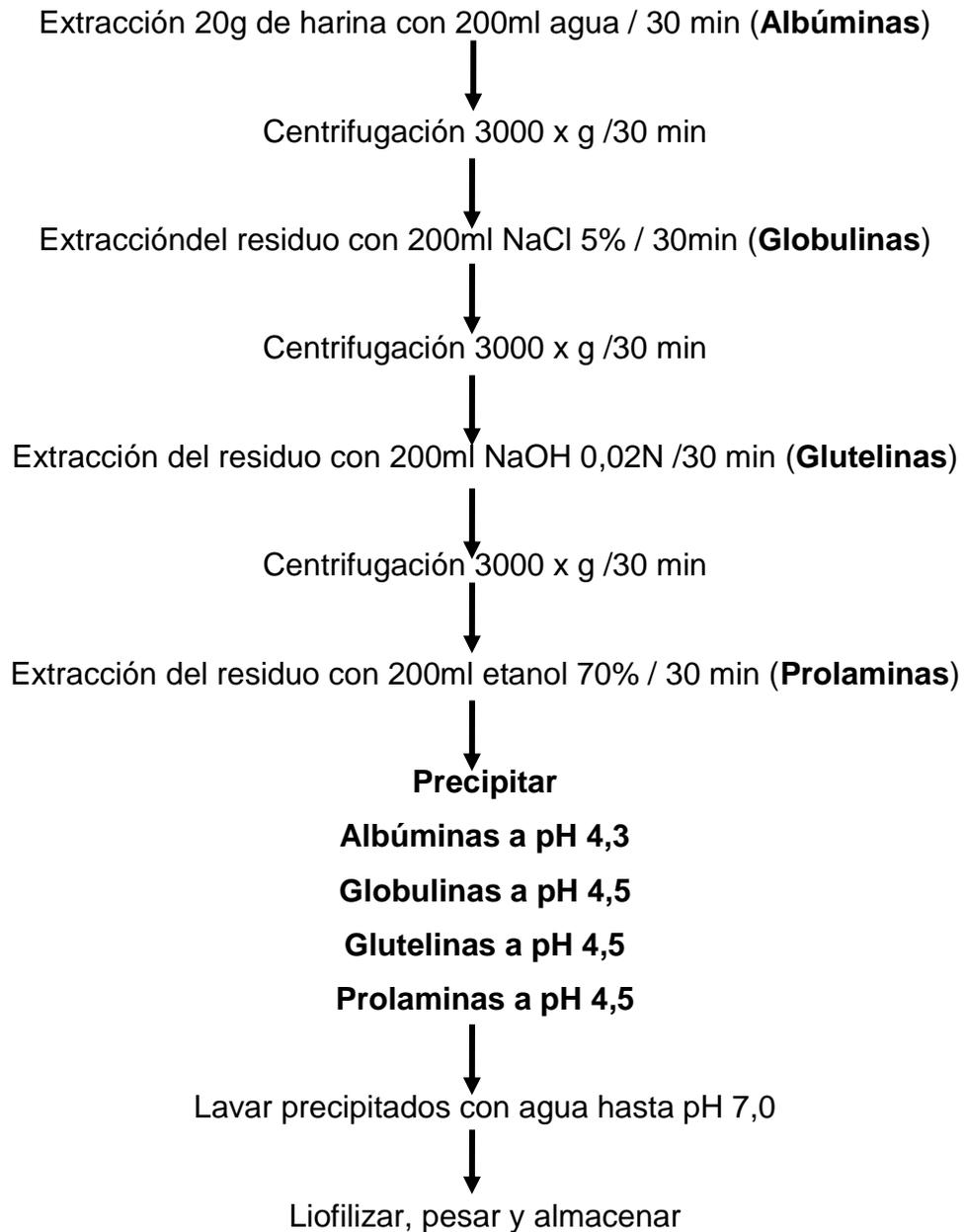


Figura 1 Esquema de fraccionamiento de las proteínas de la harina de *Caryodendron orinocense* K.

Tabla 1. Contenido y pureza de las fracciones de proteínas de la harina de nuez de Barinas (*C. orinocense* K.)

Fracción	% Total Proteína (N x 6,25) (Sobrenadante)	% Pureza Proteínas (Liofilizado)
Albúminas (agua)	50,72 ± 0,72	81,57 ± 1,33
Globulinas (NaCl)	15,56 ± 0,56	94,01 ± 1,36
Prolaminas (NaOH)	23,10 ± 0,83	70,86 ± 0,59
Glutelinas (Alcohol)	2,52 ± 0,21	92,54 ± 1,34
Proteína residual	7,83	
% Recuperación	92,15 ± 1,39	

Tabla 2. Peso molecular de proteínas presentes en harina de nuez de Barinas (*C. orinocense* K.) y soya (*Glycine max*)

PROTEINAS ESTANDAR	PM	Estandar	Soya	Barinas
Aprotinina	6.500			
α -Lactalbúmina	14.200			
Inhibidor tripsina	20.000			
Tripsinógeno	24.000			
Anhidrasa carbónica	29.000			
Gliceraldehido3-fosfato dehidrogenasa	36.000			
Ovalbúmina	45.000			
Glutamato dehidrogenasa	55.000			
Albúmina	66.000			
Fructosa 6-fosfato-quinasa	84.000			
Fosforilasa b	97.000			
β -Galactosidasa	106.000			
Miosina	205.000			

Referencias

1. Rosa M, Ferreira R, Texeira A. Storage proteins from *Lathyrus sativus* seeds. J. Agric Food Chem. 2000; 48:5432-5439
2. Alfaro, M. J, Alvarez, I, Padilla, FC. Factores antinutricionales y perfil de aminoácidos de la harina semi-desgrasada de la nuez del *Caryodendron orinocense* K. Rev. Fac. Farmacia, 2004, 67:3-7
3. Kwon K, Park K, Rhee K. Fractionation and characterization of proteins from coconuts (*Cosus nucifera* L.) J. Agric Food Che., 1996; 44:1741-1745
4. Sze-Tao K, y Shridhar K. Walnuts (*Juglans regia* L.): proximate composition, protein solubility, protein amino acid composition and protein *in vitro* digestibility. J. Sci. Food Agric. 2000; 80:1393-1401
5. Siddhuraju P, Becker K, Makkar H. Chemical composition, protein fractionation, esencial amino acid potential and antimetabolic constituents of an unconventional legume, Gila bean (*Entada phaseoloides* Merrill) seed kernel. J. Sci. Food Agric. 2002; 82: 192-202
6. Lookhart G, Bean S. Separation and characterization of wheat protein fractions by high performance capillary electrophoresis. Cereal Chem. 1995; 72: 527-532
7. Chavan U, McKenzie D, Shahidi F. Protein classification of beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) Food Chem. 2001;75:145-153

8. AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International. 17th Edition. Editor Horwitz, W. Maryland, USA. 2000.
9. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-685.
10. Hsu H, Vavak D, Satterlee L, Miller G. Multienzyme technique for estimating protein digestibility. J Food Sci 1977; 42: 1269-1279
11. Sathe S, Salunkhe K. Functional properties of great northern bean seed (*Phaseolus vulgaris*) proteins: emulsion, foaming, viscosity and gelation properties. J Food Sci. 1981; 46: 71-75.
12. Santos C, Ferreira R, Teixeira A. Seed proteins of *Lupinus mutabilis*. J Agr Food Chem. 1997; 45: 3821-3825.
13. Bhatta, R. Albumin proteins of eight edible grain legume species: electrophoretic patterns and amino acid composition. J. Agric. Food Chem. 1982; 30: 620
14. Gallegos S, Pacheco J, Betancur D, y Chel L. Extracción y caracterización de las fracciones proteínicas solubles del grano de *Phaseolus lunatus L.* Arch. Latinoamer. Nutr. 2004; 54:81-88
15. Sauvaire Y, Baccou J, Kobrehel K. Solubilization and characterization of fenugreek seed proteins. J Agric Food Chem. 1984; 32: 41-47

16. Sathe S, Desphande S, Salunkhe D. Functional properties of lupin seed (*Lupinus mutabilis*) proteins and concentrates. J Food Sci. 1982; 47: 491-497.
17. Swamylingappa B, Srinivas H. Preparation and properties of protein isolate from hexane-acetic acid treated commercial soybean meal. J Agric Food Chem. 1994; 42: 2907-2911.
18. Norma Venezolana Covenin 2729-90 Productos proteínicos vegetales (PPV). Directrices generales para su utilización en los alimentos de consumo humano. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Fondonorma, Caracas
19. Ramirez A, Ortiz L. Estudio de algunas características de las proteínas de Canavalia. Arch. Latinoamer. Nutr. 2000; 50: 69-73

Recibido: 04 de marzo de 2009

Aprobado: 09 de julio de 2009