

Efecto del pH de extracción y caracterización funcional de proteínas de ñuña (*Phaseolus vulgaris* L)

Effect of pH on protein extraction and functional properties of Ñuña (*Phaseolus vulgaris* L) beans

Antonio Rodríguez Zevallos¹, Alexis Gutiérrez Arce² y Carolina Pretel Hiuguay³

Recibido: 4 de noviembre de 2014
Aceptado: 15 de diciembre de 2014

Resumen

Los concentrados proteicos procedentes de granos son demandados para suplementar alimentos procesados con fines nutricionales o para mejorar propiedades funcionales. Se evaluó la extracción de proteínas de frijol Ñuña variedad pava y se determinaron el rendimiento y las propiedades: capacidad de absorción de agua y de aceite, capacidad de formación y estabilidad de espuma.

Los granos fueron remojados y molidos en agua, regulados a pH alcalino (8, 9 y 10), agitados por 60 min, filtrados y la porción líquida regulada a pH 4.5, luego reposo 30 min y centrifugado; al final secado a 32 °C por 14 horas. A los resultados se les aplicó las pruebas de Levene, análisis de varianza y Duncan.

El mayor rendimiento de extracción (79.4 %) se obtuvo a pH 10 y con 43.6 % de proteínas en el aislado. La mayor absorción de agua y aceite se obtuvo con el aislado proteico a pH 8, la mayor formación de espuma se alcanzó con la extracción a pH 10, pero la mayor estabilidad de espuma se logró con la extracción a pH 8. Los aislados proteicos de frijol Ñuña cuentan con buenas propiedades funcionales y pueden emplearse en diversos alimentos, como productos lácteos y de panificación.

Palabras claves: frijol Ñuña, extracción de proteínas, propiedades funcionales

Abstract

The protein concentrates from grains are demanded to supplement processed foods for nutritional purposes or to improve functional properties. Protein extraction Nuña bean Pava variety was evaluated and the performance and properties were determined: water and oil holding capacity, foam capacity and stability.

Beans were soaked and ground in water, regulated at alkaline pH (8, 9 and 10), agitated for 60 min, filtered and the liquid part regulated to pH 4.5, and 30 min rest then centrifuged; finally dried at 35 °C for 14 hours. The dates were analyzed by tests Levene, analysis of variance and Duncan.

The highest extraction yield (79.4 %) was obtained at pH 10 and 43.6 % of proteins in the isolated; the oil and water holding capacity was higher with the extraction at pH 8, most foaming was achieved by extraction at pH 10, but as foam stability was achieved by extraction at pH 8. The isolated protein of Nuña beans, have good functional properties and can be used in many foods, such as dairy and bakery.

Key words: Nuña bean, protein extraction, functional properties

1 Doctor en Ciencias Agronómicas, profesor asociado de la Universidad Privada Antenor Orrego.

2 Egresado de la Escuela de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Privada Antenor Orrego.

3 Estudiante de la Escuela de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Privada Antenor Orrego.

I. Introducción

El frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) constituye uno de los legados valiosos de la agricultura andina, teniendo su centro de origen en la sierra del Perú, donde existe gran diversidad genética como resultado de miles de años de domesticación. Esta leguminosa es muy nutritiva por su alto contenido de proteínas y es un importante alimento para las comunidades campesinas de los andes (Alfonzo, 2000).

El cultivo de esta leguminosa se ha extendido a Colombia, Ecuador y Estados Unidos por la característica propia de reventar por efecto del calor; y las características agronómicas y ventajas de todas las leguminosas en cuanto al aporte de proteínas, carbohidratos, fibra y componentes minerales.

Actualmente hay interés en la elaboración de nuevos productos a partir de proteínas procedentes de granos con alto contenido de ellas, entre los que se vienen estudiando a las leguminosas. Se realizan los procedimientos de extracción de las proteínas y se evalúan las propiedades funcionales que determinan el uso de los aislados proteicos en diferentes productos transformados. Entre las propiedades funcionales se puede mencionar a la solubilidad, la formación de espumas y emulsiones (Makri y Doxastakis, 2006).

Se ha aislado proteínas por medio de extracción alcalina seguida de precipitación isoeléctrica a partir de granos de lentejas (*Lens culinaris*), pallar (*Phaseolus lunatus* L.), frijol pinto (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto), frijol caupi (*Vigna unguiculata*) y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Se determinó rendimientos proteínicos y se evaluaron las propiedades como capacidad de absorción de agua y aceite, formación y estabilidad de espuma, formación de emulsiones, formación de geles y solubilidad (Jarpa-Parra y otros (2014); Tan y otros (2014); Makri y Doxastakis (2006); Chel-Guerrero y otros (2011)).

El frijol ñuña es una leguminosa con elevado contenido de proteínas (18 – 23 %), no se cuenta con trabajos científicos sobre extracción de proteínas a partir de este frijol, por lo que el presente estudio tiene el propósito de determinar el pH apropiado de extracción (8, 9 y 10) que permita obtener el mayor rendimiento de proteína (%) y determinar su influencia sobre las propiedades funciones de absorción de agua y de aceite, así como la formación y estabilidad de espuma de los aislados proteicos.

II. Materiales y métodos

2.1 Lugar de ejecución

La investigación se realizó en los laboratorios de ciencia de alimentos y tecnología de alimentos de la Escuela de Ingeniería en Industrias Alimentarias

de la Universidad Privada Antenor Orrego. Trujillo, Perú.

2.2 Material

Se trabajó con frijol ñuña variedad Pava, cosecha 2014, procedente de la provincia de Cajabamba de la región de Cajamarca.

2.3 Procedimiento de extracción de proteína

La extracción de proteína se efectuó a partir de una adaptación de los métodos de Corzo-Rios y otros (2000) y de Jarpa-Parra y otros (2014), que comprenden la siguiente secuencia: a los granos de frijol ñuña se les separó la materia extraña y granos muy pequeños o rotos, luego se pesaron 50 g por unidad experimental y se remojaron en agua destilada en una relación de 1:3 (p/v) durante 8 horas a temperatura ambiente. A continuación se eliminó manualmente las cáscaras y los granos húmedos sin cáscara se colocaron en una licuadora y se adicionó 250 mL de agua destilada, se trituraron a velocidad media por 3 minutos. La suspensión se colocó en un vaso de vidrio de 1000 mL, se adicionó 250 mL de agua destilada para tener una relación 1: 10 (p/v) de grano /agua. La suspensión se ajustó según el pH (8, 9 o 10) con NaOH 1N y se agitó por 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación se filtró la suspensión y la parte líquida se ajustó a pH 4.5 con HCL 1N, luego se colocó en refrigeración (8°C) por una hora. Después se centrifugó la suspensión a 5000 rpm por 10 minutos, se eliminó el líquido y se recolectó los sólidos (proteína). Se procedió a secar el aislado de proteínas en una estufa a una temperatura de 32 ± 3 °C durante 14 horas. Las proteínas desecadas se guardaron en envases de polietileno y se almacenaron a temperatura ambiente. El procedimiento de extracción se realizó por triplicado para cada pH.

2.4 Métodos de análisis

- Tamaño de la semilla: Se midieron las dimensiones de ancho, largo y espesor en la semilla entera realizando repeticiones por cuádruple.
- Peso de la semilla: Se registró el peso de 100 semillas de frijol y se obtuvo el promedio. Luego se clasificó el grano según la relación peso - tamaño de semilla que se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Relación del peso de la semilla con el tamaño

Peso de 100 granos	Tamaño
<18	Muy pequeño
18 a 25	Pequeño
26 a 40	Mediano
>40	grande

Fuente: Aguirre- Santos y Gómez-Aldapa (2010)

- Determinación de proteínas: según el método Kjeldahl, ($N \times 5.7$) (AOAC, 1990).
- Capacidad de absorción de agua del grano: Se tomaron al azar 25 granos intactos de frijol que se pesaron en una balanza electrónica con precisión de 0.01 g, para determinar el peso del material seco (PMS). Los granos se sometieron a remojo en agua destilada durante 18 h a temperatura ambiente. Después se drenaron y se eliminó el excedente de agua con papel absorbente. Los granos se pesaron nuevamente y se obtuvo el peso del material remojado (PMR), luego se determinó la capacidad de absorción de agua con la ecuación siguiente: $CAA (\%) = ((PMR - PMS) / PMS) 100$

El resultado se comparó con la clasificación establecida por Aguirre-Santos y Gómez-Alpaca (2010) y se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Clasificación de las variedades de frijol en base a la capacidad de absorción de agua

Capacidad de Absorción de Agua (CAA) (%)	Problemas de cáscara dura
Mavor de 100	Sin problemas
70 - 100	Problema moderado
40 - 69	Problema severo
0 - 39	Problema muy severo

Fuente: Aguirre-Santos y Gómez-Aldapa (2010)

- Absorción de agua o aceite de aislados proteicos

Se pesa 0.5 g de muestra y se mezcla con 7.5 mL de agua destilada o 10 mL de aceite de girasol. El contenido se remueve por 1 minuto con un alambre delgado para dispersar la muestra en el agua o aceite, la mezcla se mantiene a temperatura ambiente (22 a 25 °C) por 30 minutos, luego se centrifuga a 3200 rpm por 30 minutos. El líquido retenido por los sólidos es medido. La capacidad de absorción de agua y aceite es expresada como g de agua o aceite absorbido por g de muestra (Fleming y otros, 1974; Lin y otros, 1975; Tan y otros, 2014).

- Capacidad de formación y estabilidad de espuma de aislados proteicos

Pesar 1.5 g de muestra, suspender en 100 mL de buffer fosfato pH 7 (1.5 % (p/v), en seguida se procede a batirlo durante 5 minutos en una licuadora, se vierte sobre una probeta graduada y se mide el volumen. El porcentaje de incremento del volumen debido al batido se calcula por la diferencia del volumen antes y después del batido.

Incremento Vol (%) = $((VDB - VAB) / VAB) \times 100$. Siendo VDB volumen después del batido y VAB volumen antes del batido.

La estabilidad de espuma se midió por los cambios de volumen en la probeta, a intervalos de 1, 10, 20, 60 y 90 minutos. El valor inicial del volumen se

consideró como el valor de 100 %. El método está basado en Lin y otros (1975) y Jarpa-Parra y otros (2014).

III. Resultados y discusión

3.1 Características fisicoquímicas del frijol ñuña

3.1.1 Tamaño y peso de la ñuña

En el cuadro 3 se presenta las dimensiones del frijol ñuña variedad Pava. Estos granos son de color plomizo, con puntitos negros y de forma esférica, descripción que coincide con Van Beem y otros (1992). Respecto a la relación peso del grano con el tamaño, todos los granos pueden ser considerados como grandes de acuerdo a la clasificación establecida por Aguirre-Santos y Gómez-Aldapa (2010). De otro lado, como se muestra en el cuadro 4, se ha establecido tres rangos por peso: 26 % pequeños, 40.25 % mediano y 33.75 % grandes. El peso encontrado por 100 granos fue de 72 g, lo cual indica que los granos son grandes, de peso mayor que granos de frijoles como Bayo Victoria, Pinto Saltillo o Negro San Luis determinados por Aguirre-Santos y Gómez-Aldapa (2010). Van Beem y otros (1992) encontraron frijol ñuña variedad Pava con un peso de 68 g por 100 granos, valor ligeramente menor que el encontrado en esta investigación. De acuerdo a los resultados obtenidos se optó por trabajar con los granos medianos y grandes para la investigación.

Cuadro 3. Dimensiones del grano de ñuña variedad Pava

Ancho (cm)	largo (cm)	Espesor (cm)
0.812 ± 0.097	1.312 ± 0.136	0.71745 ± 0.090

Cuadro 4. Relación del peso del grano con el tamaño de grano ñuña variedad Pava

tamaño	rango	(%)	Promedio (g)
pequeño	<0.6	26.00	0.49 ± 0.07
mediano	0.6 a 0.8	40.25	0.70 ± 0.06
grande	>0.8	33.75	0.92 ± 0.11
TOTAL		100.00	0.72 ± 0.18

3.1.2 Capacidad de absorción de agua del frijol

De acuerdo a la categoría establecida en el cuadro 2 y el valor obtenido de 100.82 ± 1.27 %, la capacidad de absorción de agua (CAA) del grano de frijol ñuña es alta, mucho mayor comparada con frijoles como Bayo Victoria, Pinto Saltillo o Negro San Luis que fueron de 22.35, 48.23 y 32.27 % respectivamente, determinadas por Aguirre-Santos y Gómez-Aldapa (2010).

3.2 Rendimiento de extracción de aislado proteico de ñuña en función al pH de extracción

En el cuadro 5 y la figura 1 se muestran los contenidos de proteínas en función al pH de extracción, así como las variaciones del rendimiento en proteínas (%) del aislado proteico respectivamente, observándose que estos se incrementan al aumentar el pH, fue significativamente ($p < 0.05$) mayor a pH 10.

En cuanto al contenido de proteína de los aislados fue relativamente bajo comparado con Corzo-Rios y otros (2000) que obtuvieron 66% de proteína a partir de leguminosa *Mucuna pruriens* a pH 7, Chel-Guerrero y otros (2002) encontraron 72 % de proteína en *Phaseolus lunatus* a pH 7 y finalmente Jarpa-Parra y otros (2014) obtuvieron 82 % de proteínas en lentejas (*Lens culinaris*) a pH 9; Tan y otros (2014) obtuvieron aislado proteico de frejol común variedad Pinto con contenidos máximos de proteína de 54.8 % a pH 8. Se puede señalar que el pH de extracción tiene gran influencia en el contenido final y el rendimiento en proteínas de los aislados de las leguminosas, el porcentaje de rendimiento fue importante (79 %). Otras condiciones de extracción que pueden influir son la relación soluto/solvente, la inclusión de centrifugación de todas las etapas de separación, tipo de solvente y la solubilidad de las proteínas a los diferentes pHs de trabajo que indican los autores mencionados anteriormente.

Cuadro 5. Contenido de proteína de aislados de ñuña en función al pH de extracción

pH	Proteína (%)
8	36.13
9	34.71
10	43.61

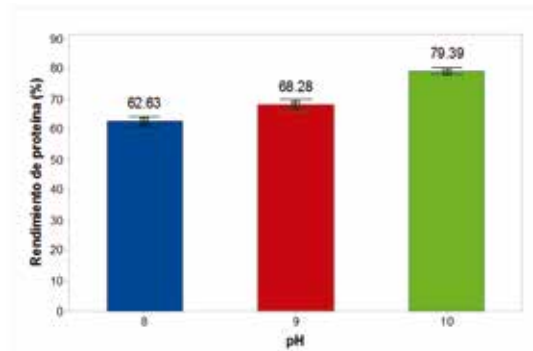


Figura 1. Variaciones de rendimiento de proteína extraída de frijol ñuña en función al pH de extracción

3.3 Capacidad de absorción de agua o aceite de los aislados proteicos de ñuña

En la figura 2 se observa que disminuye la absorción de agua en función al pH de extracción de los aislados proteicos de ñuña. Tang y otros (2014) encontraron un valor de 1.65 de absorción de agua en aislados proteicos extraídos a pH 8 de frejol variedad Pinto, valor parecido a esta investigación. Jyothirmayi y otros (2006) extrajeron proteínas de

harina de *Erythrina variegata* a pH 10 y encontraron una absorción de agua de 2.25 g/g, valor mayor al obtenido en esta investigación. Finalmente, Chel-Guerrero y otros (2011) encontraron el valor de 1 g/g de absorción de agua en globulinas extraídas de *Phaseolus lunatus*.

La figura 3 indica que la absorción de aceite de los aislados proteicos en función del pH no fue afectada por el pH de extracción, solo a pH 8 el valor es ligeramente mayor, no hubo diferencias estadísticas. Tang y otros (2014) encontraron un valor de 1.43 de absorción de aceite en aislados proteicos extraídos a pH 8 de frejol variedad Pinto; Jyothirmayi y otros (2006) extrajeron proteínas de harina desgrasada de *Erythrina variegata* a pH 10 y encontraron una absorción de aceite de 1.52, valores un poco mayores al de la ñuña.

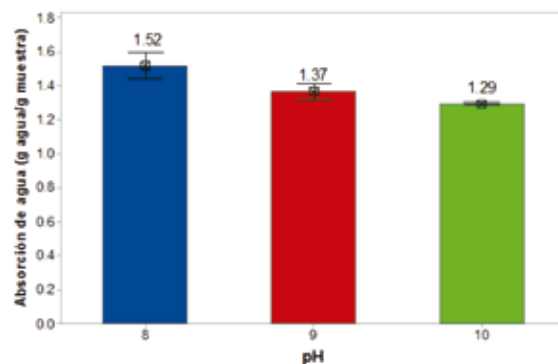


Figura 2. Capacidad de absorción de agua de aislados proteicos de ñuña en función del pH de extracción

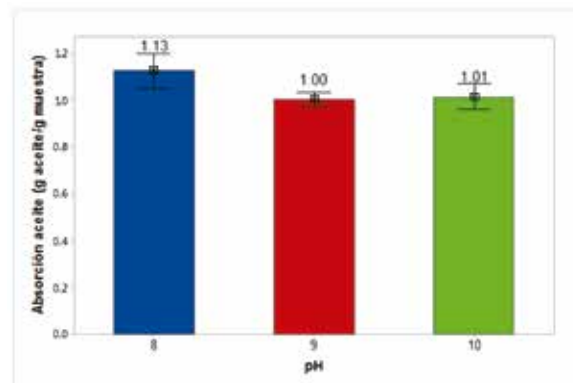


Figura 3. Capacidad de absorción de aceite de aislados proteicos de ñuña en función del pH de extracción

3.4 Capacidad de formación y estabilidad de espuma en aislados proteicos de ñuña

La figura 5 muestra la influencia del pH de extracción sobre la capacidad de formación de espuma de los aislados proteicos de ñuña, incrementándose significativamente ($p < 5$) a mayor pH, a pH 10 se obtuvo 39.33% de espuma. Jyothirmayi y otros (2006) en aislado de proteína *Erythrina variegata* extraída a pH 10 encontraron 20 % de espuma formada, valor menor a esta investigación.

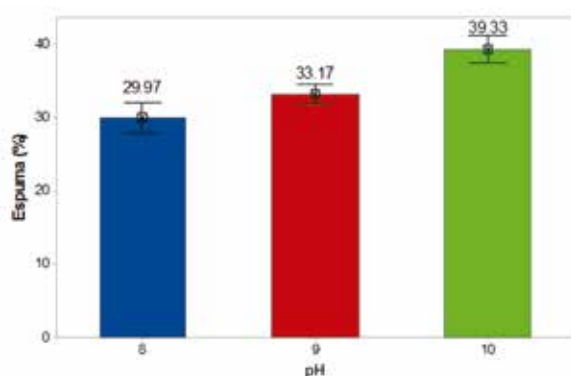


Figura 4. Capacidad de formación de espuma de aislados proteicos de ñuña en función del pH de extracción. Soluciones al 1.5%.

En la figura 5 se muestra la estabilidad de las espumas formadas en función del tiempo, observándose que hasta los 20 minutos los porcentajes de espuma son similares en todas las muestras, pero ya a los 60 minutos las muestras extraídas a pH 8 son más estables que las de pH 9 y 10; a los 90 minutos se mantiene la diferencia. Tan y otros (2014) encontraron estabilidad del orden de 77 a 84 % para proteína de lentejas para tiempos de 15 minutos, valores mayores a los establecidos para el aislado proteico de ñuña para ese tiempo (>50 %).

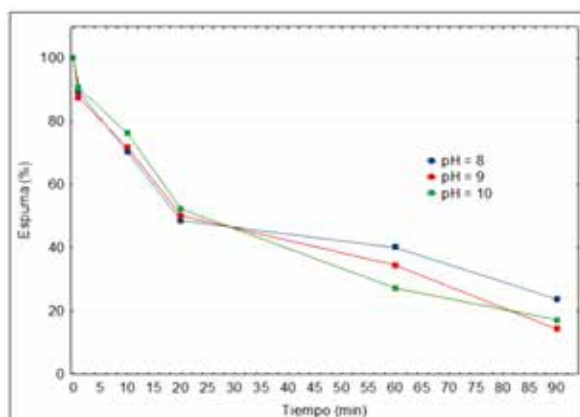


Figura 5. Estabilidad de espumas de aislados proteicos de ñuña en función del pH de extracción y tiempo

IV. Conclusiones

Al aumentar el pH de extracción se incrementó el rendimiento de extracción de proteínas del frijol ñuña, llegando hasta 79.4 % y con 43.6 % de proteína al pH 10.

Las propiedades de absorción de agua y aceite de los aislados proteicos disminuyeron por efecto del pH de extracción, siendo mayores al pH 8.

Las espumas formadas con los aislados proteicos presentaron mayor volumen a pH de extracción más elevado, a pH 10 se llegó hasta 39.3%. Sin embargo, a través del tiempo los aislados proteicos extraídos a pH 8 fueron más estables.

Los aislados proteicos de frijol ñuña cuentan con buenas propiedades funcionales, por lo que pueden ser usados en diversos alimentos, especialmente en productos lácteos y de panificación.

V. Agradecimiento

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación (PAI 2014) del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Privada Antenor Orrego. Trujillo. Perú.

VI. Referencias bibliográficas

Alfonzo, G. (2000). *Efecto del tratamiento térmico sobre el contenido de fibra dietética total, soluble e insoluble en algunas leguminosas*. Archivos latinoamericanos de Nutrición. 50 (3): 281 – 285.

Aguirre-Santos, E y Gómez-Aldapa, C.A. (2010). *Evaluación de las características fisicoquímicas en la especie de frijol Phaseolus vulgaris de las variedades Pinto Saltillo, Bayo Victoria y Negro San Luis*. XII CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. Universidad de Guanajuato, México.

Corzo-Rios, L; Chel-Guerrero, L; y Betancur-Ancona, D. (2000). *Extracción de las fracciones de almidón y proteína del grano de la leguminosa Mucuna pruriens*. Tecnol. Ciencia Ed. (IMI) 15(1): 37 – 41.

Chel-Guerrero, L; Gallegos-Tintoré, S; Martínez-Ayala, A; Castellanos-Ruelas, A y Betancur-Ancona, D. (2011). *Funcional properties of Proteins from Lima Bean (Phaseolus lunatus L.) seeds*. Food Sci Tech

Int 17(2): 119 – 126.

Fleming S. E., Sosulski F.W, Kilara, A. y Humbert E.S. (1974). *Viscosity and water absorption characteristics of slurries of sunflower and soybean flours, concentrates and isolates*. Journal of Food Science: 39 (1): 188-192.

Jarpa-Parra, M; Bamdad, F; Wang, Y; Temelli, F; Han, J y Chen, L. (2014). Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. LWT – Food Science and Technology 57: 461 – 469.

Jyothirmayi, T; Prabhakara, P.G. and Walde, S.G. (2006). *Nitrogen extractability and functional properties of defatted Erythrina variegata flour*. 96: 242 -247.

Lin, M. J.Y., Humbert E. S., y Sosulski F. W. (1975). *Certain functional properties of sunflower meal (Helianthus annuus)*. Journal of Food Science 39 (2): 368-370.

Makri, E y Doxastakis, G. (2006). *Emulsifying and foaming properties of Phaseolus vulgaris and Coccineus proteins*. Food Chemistry. 98: 558 – 568.

Tan, E; Ngoh, Y y Gan, C. (2014). *A comparative study of physicochemical characteristics and functionalities of pinto bean protein isolate (PBPI) against the soybean protein isolate (SPI) after the extraction optimisation*. LWT – Food Science and Technology 152: 447 – 455.

Van Beem, J; Kornegay, J and Lareo, L. (1992). *Nutritive Value of the Nuña Popping Bean*. Economic Botany 46 (2): 164 – 170.