



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
LA PROTEÍNA DEL FRIJOL NEGRO  
(*PHASEOLUS VULGARIS*)**

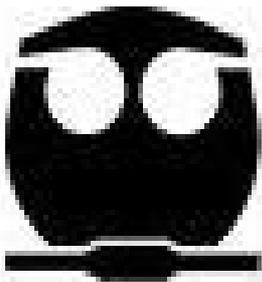
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

Zaine Dergal Dergal



**MÉXICO, D.F.**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: Amelia Farrés González Sarabia**

**VOCAL: Rosa María Argote Espinosa**

**SECRETARIO: Gloria Díaz Ruiz**

**1er. SUPLENTE: Armando Conca Torres**

**2º SUPLENTE: Liliana Rocio González Osnaya**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA. LAB. 312 CONJUNTO "E". FACULTAD DE QUÍMICA. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

**ASESORA DEL TEMA: AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ SARABIA**

**SUSTENTANTE: ZAINE DERGAL DERGAL**

## **AGRADECIMIENTOS**

Para poder realizar ésta tesis de la mejor manera posible fue necesario del apoyo de muchas personas a las cuales quiero agradecer.

Dra. Amelia, gracias por sus enseñanzas, por su confianza, por escucharme, entenderme y apoyarme a lo largo de este proceso. Que honor ser su alumna.

Ale, la vida se ha dedicado a cruzar nuestros caminos. Gracias por todo tu apoyo, por tus consejos y compañía en este trayecto.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, con los cuales compartí el día a día durante casi un año:

Mirna e Israel, gracias por su tiempo, por su ayuda y por su disposición a resolver gran parte de mis dudas.

Sergio, Liliana, Blanca y Ana, nos tocó vivir un proceso similar juntos. Me enorgullece compartir este trabajo con ustedes.

Dennis, Pili, Dra. Maricarmen, Dra. Amanda, Liliana González, Eliana, Carlos Moles, Estela, Vicky, Dafne, Mirna, Lalo, Lu, Eva, Paola, Gaby, gracias por todos los momentos compartidos y a muchos de ustedes por sus consejos que en su momento fueron fundamentales para terminar este proyecto con éxito. A todos ustedes muchas gracias por las risas, las fiestas, las comidas... no pude haber llegado a un mejor lugar.

Al Q.F.B. Agustín Reyo Herrera, a la Dra. Carolina Peña Montes, a la I.A. Mariana Ramírez Gilly, a la Q.F.B. Julieta Sandoval Guillén y al Dr. Arturo Navarro Ocaña por el apoyo técnico brindado durante este proyecto.

A la Universidad Autónoma de México por recibirme con los brazos abiertos. Todo lo vivido en tus aulas, pasillos, jardines, laboratorios lo llevaré por siempre en el corazón. Gracias por brindarme la oportunidad de tener un desarrollo personal y profesional. Que gran orgullo llevar el sello "Hecho en CU" en el corazón.

A la Dra. Gloria Díaz Ruiz y a la M. C. Rosa María Argote Espinosa por haber aceptado ser mis sinodales. Gracias por haber dedicado tiempo a la revisión de este trabajo, pero sobre todo por sus enseñanzas y consejos.

Este trabajo es parte del proyecto del ICYT del Distrito Federal GDF PICs08-33; PRODUCCIÓN Y APROVECHAMIENTO DE UN AISLADO DE FRIJOL COMO ALIMENTO FUNCIONAL CON INFLUENCIA EN EXPRESION GÉNICA QUE AFECTA A LA LIPOGÉNESIS

## **DEDICATORIAS**

Definitivamente... debo dedicar mi tesis a todos aquellos que estuvieron, los que están y continúan a mi lado, mis amigos y a mi familia.

Primeramente a Dios, a ese amigo incondicional con el que aprendí a vivir y que al igual que las enseñanzas e ideales de Santa Teresa de Jesús y San Enrique de Ossó me han acompañado en todo momento.

A mi mamá y a mi papá; piezas sumamente importantes e irremplazables en mi vida. Gracias por darme la vida; gracias por estar ahí siempre; gracias por ser mis amigos; gracias por quererme tanto; simplemente gracias...

A Nayibe; mi hermana quien conoce bien lo que me gusta y mejor lo que me hace enojar. Gracias por estar aquí y por celebrar conmigo mis triunfos. Si... somos diferentes, pero somos hermanas. Te quiero... claro que eres la mejor.

A Tita; eres grande... formaste una gran familia... imperfecta, pero familia a final de cuentas. Gracias por acompañarme siempre.

A mis abuelos Yamil y Juan; a mis abuelas Catalina y Esperanza; y a mis bisabuelas Zaine y Nayibe, los cuales dejaron una huella imborrable en este mundo y aunque no estén físicamente estoy segura de que disfrutaron este triunfo conmigo.

A mi primo y ahijado Nicolás; tú eres un milagro de vida. Quiero que sepas que todo lo que hacemos trae enseñanzas así que cuando llegue el momento haz lo que te haga feliz, siempre sé una persona de bien, agradecido con la vida.

A mis primos y primas; Memo, Stephanie, Paola, Marlen, Katian, Vanesa, Yvonne, Annel, Jonathan, Morice, Scarlet, Omar, Anuar, Tino, Zaine, Jalil, Yamil, Lore, Rashid, Nadim, Samir, Marian, Jorge Becil, Samia y Omar Becil; con los que compartí mi niñez y aunque hoy en día esos momentos han sido escasos los quiero y les deseo que sean felices hoy y siempre.

A mis tíos y tías; Memo, Elena, Javier, Gaby, Omar, Claudia, Juan, Yvonne, Yamil, Paty, Arturo, Martha, Jalil, Lorena, Tino, Zaine, Juan Antonio, Kika, Rico, Sonia, Chava, Sonita, Moy, Jaqueline, Sohaila; a quienes les agradezco el que siempre estén ahí, cada uno a su manera pero siempre en momentos trascendentales.

Por supuesto que a mis grandes amigos de la Facultad:

Ania, Alexis, Cinthya y Dennis: QArpias gracias por ser grandes amigos. Tienen toda mi admiración. Gracias por las risas, las fiestas, las cervezas, las pláticas... en fin... hay momentos inolvidables dentro y fuera de la facultad.

Mariana y María: Si enumerara todos los momentos que vivimos juntas nunca terminaría. Gracias por estar ahí.

David, Meche, Roberto, Ricardo, Sarita, Goretti, Oscar y Bea: Sin ustedes nada hubiera sido igual. Gracias por todos los momentos juntos. El primer semestre fue parte de lo que más disfruté.

Itzia, Betty, Ireri, Mariel Calderón, Maty, Ana Gaby, Ana Laura, Diana, Jess, Lili y Aarón gracias por ser piezas importantes en esta etapa. Los quiero!!!

A la gente de La Florida que me vio crecer sobre todo a mis amigas de toda la vida María José, Nadima, Dora Luz y Gina... Al igual que a maestras de las cuales aprendí grandes cosas de la vida Montse y Sara a todas ustedes gracias por estar siempre al pendiente.

A mi grupo de MTA: Nayibe, Susana, Viviana, Anilú, Paulina, Mónica Robledo, Jess con las cuales compartí tantas cosas y tantos cambios que no importa el tiempo que las deje de ver, siempre serán parte de mí.

# ÍNDICE

## Página

### Resumen

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Marco teórico</b>	<b>3</b>
<b>3. Antecedentes</b>	<b>5</b>
3.1. La cultura del frijol en México	5
3.2. Clasificación taxonómica y botánica	6
3.3. Morfología	6
3.4. Composición química	8
3.4.1. Hidratos de carbono	8
3.4.2. Grasas	9
3.4.3. Proteínas	9
3.5. Compuestos fenólicos	10
3.5.1. Flavonoides	10
3.6. Propiedades funcionales	13
3.6.1. Capacidad de Absorción de Agua	14
3.6.2. Capacidad de Absorción de Aceite	14
3.6.3. Formación y estabilidad de espuma	15
3.6.4. Gelificación	16
3.6.5. Emulsificación	16
3.7. Funcionalidad requerida de los aislados proteicos	17
<b>4. Justificación e importancia</b>	<b>18</b>
<b>5. Hipótesis</b>	<b>19</b>
<b>6. Objetivos</b>	<b>19</b>
6.1. General	19
6.2. Específico	19
<b>7. Metodología</b>	<b>20</b>
7.1. Datos de la muestra	21
7.2. Caracterización física del frijol	21
7.3. Preparación de la materia prima	21
7.4. Curva de solubilidad de la proteína del frijol	21
7.5. Preparación del aislado proteínico	22
7.6. Análisis de la proteína cruda	22
7.7. Medición de la cantidad de carbohidratos totales	24
7.8. Polifenoles	24
7.8.1. Extracción	24
7.8.2. Determinación de fenoles totales	25
7.8.3. Determinación de flavonoides totales	25
7.9. Determinación de las propiedades funcionales	26
7.9.1. Capacidad de Absorción de Agua	26
7.9.2. Capacidad de Absorción de Aceite	26
7.9.3. Formación y estabilidad de espuma	26
7.9.4. Gelificación	27
7.9.5. Índice de actividad emulsificante	27
7.9.6. Estabilidad de emulsión	28

7.10.	Determinación del perfil proteico	28
<b>8.</b>	<b>Resultados y análisis de resultados</b>	<b>30</b>
8.1.	Caracterización física del frijol	30
8.2.	Extracción y Curva de Solubilidad de la Proteína	31
8.3.	Rendimiento y composición del producto obtenido	35
8.4.	Polifenoles (fenoles y flavonoides totales)	38
8.5.	Propiedades funcionales	40
8.5.1.	Capacidad de Absorción de Agua	40
8.5.2.	Capacidad de Absorción de Aceite	41
8.5.3.	Formación y estabilidad de espuma	42
8.5.4.	Capacidad emulsificante y estabilidad de la emulsión	43
8.5.5.	Gelificación	45
8.6.	Perfil proteico del frijol negro	46
<b>9.</b>	<b>Posibles aplicaciones del producto</b>	<b>49</b>
<b>10.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>52</b>
<b>11.</b>	<b>Perspectivas</b>	<b>52</b>
<b>12.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>53</b>
<b>13.</b>	<b>Anexos</b>	<b>62</b>
I.	Medición de carbohidratos totales	62
II.	Tratamiento del almidón	62
III.	Determinación de fenoles totales	63
IV.	Determinación de flavonoides totales	64
V.	Fundamento y preparación de muestras de electroforesis	65
VI.	Usos del frijol como planta medicinal	68
VII.	Fotos del proceso y de las propiedades	69
1.VII.1.	Muestra 1	69
1.VII.2.	Muestra 2	69
1.VII.3.	Harina de frijol tamizada	69
1.VII.4.	Solubilización de la proteína	70
1.VII.5.	Residuo de la suspensión	70
1.VII.6.	Precipitación de la proteína	70
1.VII.7.	Aislado húmedo	71
1.VII.8.	Producto final	71
1.VII.9.	Capacidad de Absorción de Agua	71
1.VII.10.	Capacidad de Absorción de Aceite	72
1.VII.11.	Formación y estabilidad de espuma	72
1.VII.12.	Capacidad emulsificante y estabilidad de la emulsión	72
1.VII.13.	Gelificación	73

## RESUMEN

El frijol es un alimento tradicional de la dieta mexicana culturalmente bien aceptado y reconocido, aunque su consumo ha disminuido. En la búsqueda de alternativas para revertir este fenómeno, se pretende aprovechar la proteína para obtener aislados o concentrados que ofrezcan otras posibilidades de formas de consumo. Por lo tanto, el presente trabajo busca estudiar las propiedades de la proteína del frijol.

Se utilizaron dos variedades negras de frijol (*Phaseolus vulgaris*) las cuales se eligieron al azar y de las que no se conoce su origen, pero mostraron resultados similares. Físicamente, la muestra 1 era más grande, más ancha y con un brillo más intenso que la muestra 2.

De cada uno de éstas se obtuvo un concentrado de proteína de frijol, que sirvió para determinar sus propiedades fisicoquímicas y funcionales.

La pureza proteica obtenida en los aislados varió del 67 al 71%, con un rendimiento proteico del 28.32% al 35.37%.

El aislado presentó una capacidad de absorción de agua que varía según la proporción de proteína/carbohidratos que presenta, mientras que la capacidad de absorción de grasa los valores fueron muy similares. Asimismo se presenta una actividad espumante, la cual es estable por 30 minutos. El índice de actividad emulsificante mas alto se da a una concentración de proteína de 0.2% y a pH 7, aunque la mayor estabilidad se da a pH 4. Los aislados solo presentaron la formación de un gel a pH 3 y con una concentración de 20% de proteína, lo cual hace la producción de geles con los mismos poco viable.

Por otra parte se comprobó la presencia de flavonoides con capacidad antioxidante en niveles de 13-15 mg/100 g de muestra, lo que ofrece una característica a explotar en productos elaborados con estos aislados.

Se proponen unas posibles aplicaciones conforme a los resultados obtenidos en este proyecto.

## 1. INTRODUCCIÓN

El estado nutricional de los individuos es uno de los índices básicos que determinan su nivel de vida e influye de manera decisiva en su desarrollo intelectual, económico y social.

Entre las distintas recomendaciones que la FAO ha establecido para aliviar una alimentación deficiente en distintas regiones del mundo, figura el aumento de la producción y consumo de oleaginosas como tal, o de alimentos formulados a base de derivados proteicos provenientes de los mismos (FAO, 1985).

La mejora de la nutrición es la primera razón para el uso de los aislados proteicos vegetales en diferentes productos, aunque se han encontrado otros efectos benéficos como la reducción de los niveles de colesterol (Sautier *et al.*, 1986) y una incidencia en el índice glicémico. Además, los aislados proteicos vegetales tienen un gran número de aplicaciones por sus propiedades funcionales. Así, se emplean para aclarar el color, mejorar la textura de carnes, embutidos y productos de panadería y pastas, como en el procesado de quesos (El-Sayed, 1997).

La disponibilidad de grandes cantidades de fuentes proteicas vegetales, como la harina desengrasada de oleaginosas, junto con la tendencia a reducir la ingesta de proteínas animales por sus precios elevados o por razones ideológicas, ha fomentado en los últimos años un gran desarrollo en los procesos de extracción y mejora de éstas proteínas vegetales para su uso en alimentación humana. En los próximos años se va a producir un incremento en la disponibilidad de nuevas fuentes proteicas vegetales y en la transformación de estas para su aplicación con fines alimenticios muy concretos conforme a las demandas del mercado en alimentación especializada (infantil o clínica).

Los aislados proteicos más empleados son los de soya, ya que ofrecen ventajas económicas, nutricionales y funcionales, y mantienen las cualidades sensoriales deseables necesarias para la aceptación por el consumidor (Wagner *et al.*, 1990, Nagano *et al.*, 1996, Henn *et al.*, 1998). Hoy día existen una gran variedad de aislados de soya disponibles comercialmente, diseñados específicamente para proporcionar las características deseadas según el alimento de que se trate. La mayoría de las aplicaciones tienen lugar en

alimentos tradicionales que ya tienen establecidos una serie de parámetros de utilización y calidad. Para tener éxito en estos productos, los aislados deben mantener esta calidad homogénea. Esto quiere decir igual o similar color, sabor, aroma, textura y composición química y nutricional.

Estos requerimientos, exigidos por el consumidor, determinan el grado de sustitución proteica. En los últimos años también se han producido aislados proteicos de otros cultivos como colza (Zhou *et al.*, 1990, Gonçalves *et al.*, 1997, Xu *et al.*, 1994b, Mahajan *et al.*, 1995), trigo (Hettiarachchy *et al.*, 1996, Ahmedna *et al.*, 1999), maíz (Lin *et al.*, 1987), garbanzo (Sánchez-Vioque *et al.*, 1999), girasol (Saeed *et al.*, 1988), ajonjolí (López *et al.*, 2005), Phaseolus (Apostolatos 1984, Chau, C.-F. *et al.*, 1997), e incluso de cultivos menores como amaranto (Martínez *et al.*, 1996). Por último, las proteínas de los aislados pueden ser modificadas químicamente, como por ejemplo mediante acilación para mejorar determinadas propiedades como la solubilidad (Wanasundara *et al.*, 1997) o mediante desamidación ácida para mejorar otras propiedades funcionales (Mimouni *et al.*, 1994).

Una fuente de proteína muy importante son las leguminosas, las cuales son ampliamente consumidas en la dieta mexicana. El frijol negro, considerado un alimento nutracéutico, contiene un alto contenido en proteínas, fibra y antocianinas, por lo que sería interesante explorarlo. Han hecho algunos intentos para purificar a la proteína, como el realizado por Morales de León y col (2007), donde la semilla es extruida, por lo que sería importante evaluar la factibilidad de su producción con otros métodos químicos, como es la solubilidad diferencial y precipitación isoeléctrica.

## 2. MARCO TEÓRICO

Las leguminosas son cultivos prioritarios tanto para la alimentación humana como para la animal, y se consideran segundos en importancia después de los cereales. Han sido cultivadas por el hombre casi desde que se descubrió la agricultura. Estas plantas se caracterizan por presentar frutos en forma de vainas entre los cuales el frijol, las habas, las lentejas y los garbanzos son los más conocidos. Son ricas en proteínas, hidratos de carbono, minerales y algunas vitaminas del complejo B.

Según Paredes (2006) varios estudios arqueológicos revelan que el frijol, del género *Phaseolus*, se origina en el continente americano, señalando que es posible que México sea el lugar de origen. Se argumenta que al principio del siglo XVI, los españoles llevaron a Europa las primeras semillas (Flores, 2004). Existen indicios de frijoles comunes, *Phaseolus vulgaris*, hace 5 500 a 7 000 años en el centro de México, donde abundan las poblaciones silvestres, pero su cultivo intensivo se inició entre los siglos I y VII D.C. La distribución y diversidad del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) se concentra en más de un 40 % en México y Mesoamérica (Secretaría de Agricultura 1998, FAO 2004). Es una de las leguminosas más ricas en proteínas (20 %) y algunos aminoácidos esenciales como la isoleucina, leucina, fenilalanina, treonina y valina (Charley, et al. 1998).

El frijol posee un alto contenido de compuestos fenólicos (taninos, flavonoides, antocianinas, ácidos fenólicos) (Lin, 2008) y se diferencia del frijol de soya en la cantidad de proteína, ya que para el frijol negro se tiene un 23.7%, mientras que para el frijol de soya se presenta un 36.7%.

En México el frijol sigue siendo uno de los alimentos más importantes para la dieta de sus habitantes, puesto que su consumo anual fluctúa alrededor de 11 Kg *per capita* (Castellanos, J., 1996, Secretaría de Agricultura 1998).

Nuestro país posee el quinto lugar en la producción mundial de frijol, y solo durante 2004 se produjeron en nuestro país 1,400,160 toneladas (FAO, 2004). No obstante, se importa en promedio alrededor del 11% de la producción para cubrir la demanda interna (Secretaría de Agricultura 1998, FAO, 2004). El frijol tiene gran importancia social porque existen 570 mil productores, además que

genera un total de 76 millones de jornales que equivalen a 282 mil empleos permanentes (Moreno, 2004). Los principales estados productores entre 1994 y 2007 fueron Zacatecas, Durango, Chihuahua y Guanajuato en el ciclo primavera-verano, mientras que Nayarit y Sinaloa lo fueron en el ciclo otoño-invierno y aportan 54.2% de la producción (Secretaría de Agricultura 2008). El frijol se cultiva prácticamente en todos los estados del país, pero la producción se limita al autoconsumo.

Actualmente se cultivan alrededor de treinta variedades distintas del frijol. Dentro del género de *Phaseolus* encontramos cinco especies principales, las cuales son las más cultivadas: *P. vulgaris* "frijol común"; *P. acutifolius* "frijol tépari"; *P. lunatus* "frijol lima"; *P. coccineus* "frijol escarlata"; y *P. polyanthus*, "frijol anual".

### **3. ANTECEDENTES**

Según la FAO (2008), la producción del frijol mundial se concentra en 129 países de los cinco continentes, entre los que destacan por orden de importancia India con 18.48%, Brasil con 16.55%, China con 11.47%, Estados Unidos con 6.84% y México en quinto lugar con 6.80%.

El mayor consumo del frijol se presenta en zonas donde el estándar de vida es bajo, principalmente en naciones que están en vías de desarrollo como América Latina, Asia y África (FAO-SAGARPA, 2004). Según la FAO (2008), de los trece países de mayor consumo de la leguminosa en el mundo, ocho pertenecen a América Latina: Nicaragua, Brasil, México, Paraguay, Belice, Costa Rica, Guatemala y Honduras, lo que confirma los altos niveles de consumo en países en vías de desarrollo. En este continente la especie *Phaseolus vulgaris* se conoce con nombres diferentes; cuando se consume el grano seco lo identifican como frijol, frisol, fréjol, habichuela, poroto, caranota, chuwi, habilla, judía, alubia. Al ser ingerido como legumbre se le denomina chaucha, habichuela, vainita y tabla.

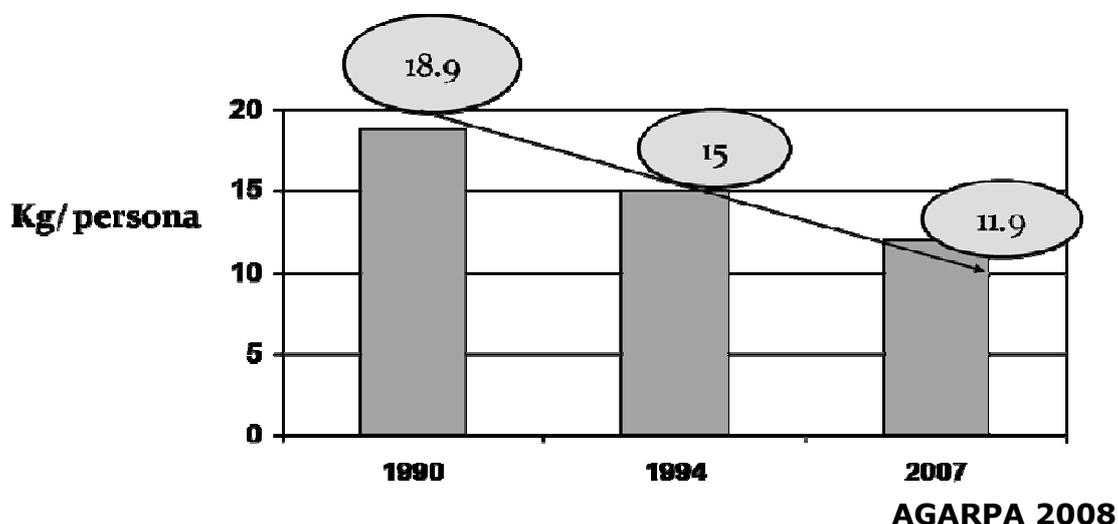
#### **3.1 La cultura del frijol en México**

México se ubica entre los primeros seis países con el mayor consumo de frijol en el mundo. En el país, el frijol es considerado como un producto tradicional estratégico para el desarrollo rural del país.

En unión con el maíz, constituyen el fundamento de la dieta del mexicano, ya que es la principal fuente de proteínas para las clases socioeconómicas más bajas. Forma parte de la cultura gastronómica de México.

A pesar de todo esto el consumo *per cápita* desde la década de los ochenta mantiene una tendencia negativa. Este declive se atribuye al aumento de la concentración y crecimiento de la población en zonas urbanas, lo cual conlleva a modificaciones en los hábitos alimenticios (Romero, 2003). El reto principal del gobierno es revertir la caída en el consumo per cápita del frijol a nivel nacional, ya que gracias al ritmo actual de vida la preferencia de los consumidores por productos de mayor facilidad, hablando propiamente de los

alimentos preparados en el consumo, ha aumentado y por lo tanto el consumo de frijol y de alimentos que necesitan cierta preparación ha disminuido.



### 3.2 Clasificación taxonómica y botánica

El género *Phaseolus* se clasifica dentro la familia *Leguminosae*, subfamilia *Papilionoidae*, tribu *Phaseolae* y subtribu *Phaseolinae*. El nombre científico de la planta es *Phaseolus vulgaris* L (Serrano, 2009). Se cultiva en zonas tropicales y regiones templadas, porque pertenece a las especies denominadas como termófilas, ya que se adapta a cualquier clima menos a las heladas (Debouck, 1985).

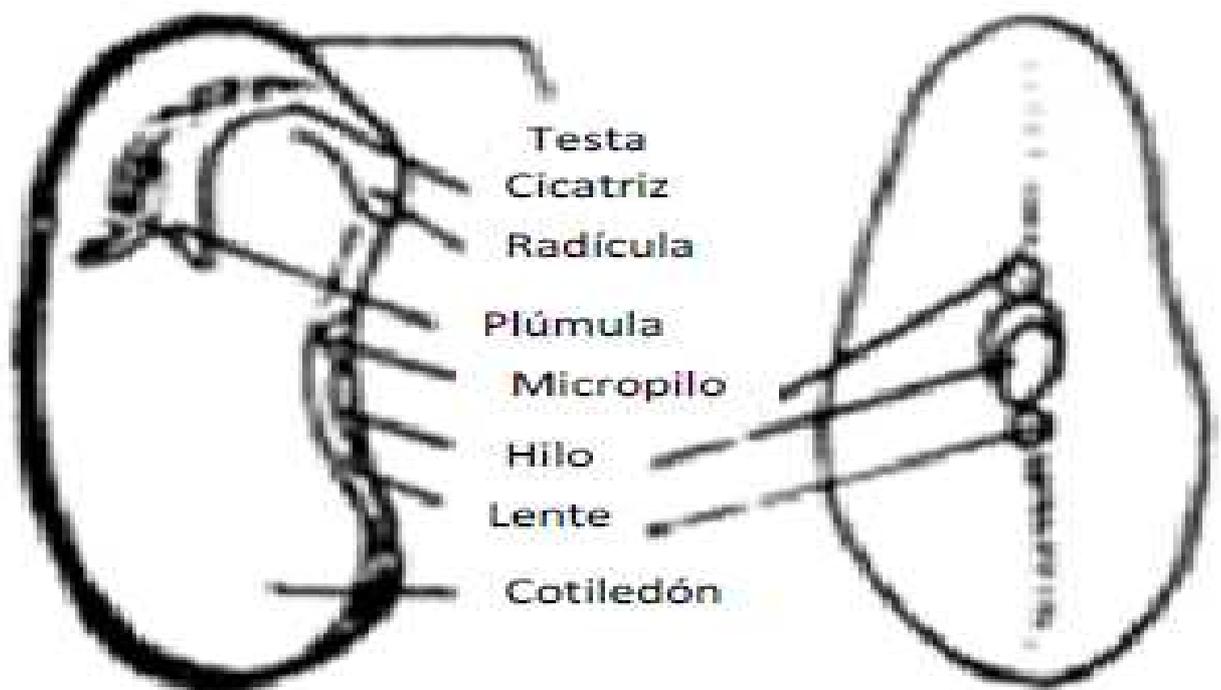
### 3.3 Morfología

Los caracteres morfológicos del frijol se agrupan en caracteres constantes (dan la especie o la variedad y son altamente hereditarios) y caracteres visibles (influencia de las condiciones ambientales sobre el genotipo).

Generalmente la morfología del frijol se hace tomando algunos o todos los caracteres que se enlistan a continuación:

1. Raíz – En condiciones muy favorables, las raíces pueden alcanzar más de un metro de longitud. *Phaseolus vulgaris* presenta nódulos con un diámetro de 2 a 5 mm, los cuales son colonizados por bacterias del género *Rhizobium* con la única función de fijar nitrógeno atmosférico, lo que ayuda a satisfacer los requerimientos de la planta.

2. Tallo principal – Generalmente es herbáceo y con sección cilíndrica o levemente angular.
3. Hojas – En el género *Phaseolus* son generalmente trifoliadas.
4. Flor – En flores recién abiertas se encuentran colores blancos, verdes, y lilas pálidos
5. Fruto – Las vainas de *Phaseolus vulgaris* generalmente son delgadas, angostas y ovals. Tienen una longitud que varía de 1.5 a 7 cm con un ancho de 0.2 a 0.8 cm.
6. Semilla – El número de semillas por vaina es variable, de 2 a 10. La morfología de *Phaseolus vulgaris* se puede observar en la figura No. 2



**Figura No. 2. Morfología de *Phaseolus vulgaris* L. Vargas, et. al., 2000**

El brillo de la testa de la semilla permite una diferenciación fenotípica de la misma en tres categorías: mate, media o brillante. En general presenta variación según a la forma (redonda, ovalada, cuboide, arriñonada o truncada) y en cuanto al tamaño, que está determinado por la longitud, el ancho y el grueso de la misma.

### 3.4 Composición química

El frijol proporciona 20 a 40% de proteína, vitaminas del complejo B y minerales como hierro y calcio. El almidón del frijol es un aporte de energía y de estructuras carbonadas para síntesis posteriores en el metabolismo; sin embargo, la presencia de factores antinutricios, como inhibidores de tripsina, ácido fítico, oligosacáridos y taninos, reduce su valor biológico.

**Tabla No. 1. Composición química del frijol negro (Cheftel, 1989)**

	<b>Para 100 g</b>
Energía	320 Kcal
Humedad	10 %
Proteínas	23.7 g
Hidratos de Carbono	55.44 g
Fibra	4.39 g
Grasas totales	1.47 g
MINERALES	
Calcio	265 mg
Fósforo	407 mg
Hierro	2.8 mg
VITAMINAS	
Tiamina	0.22 mg
Riboflavina	0.09 mg
Niacina	2.01 mg

#### 3.4.1 Composición de hidratos de carbono

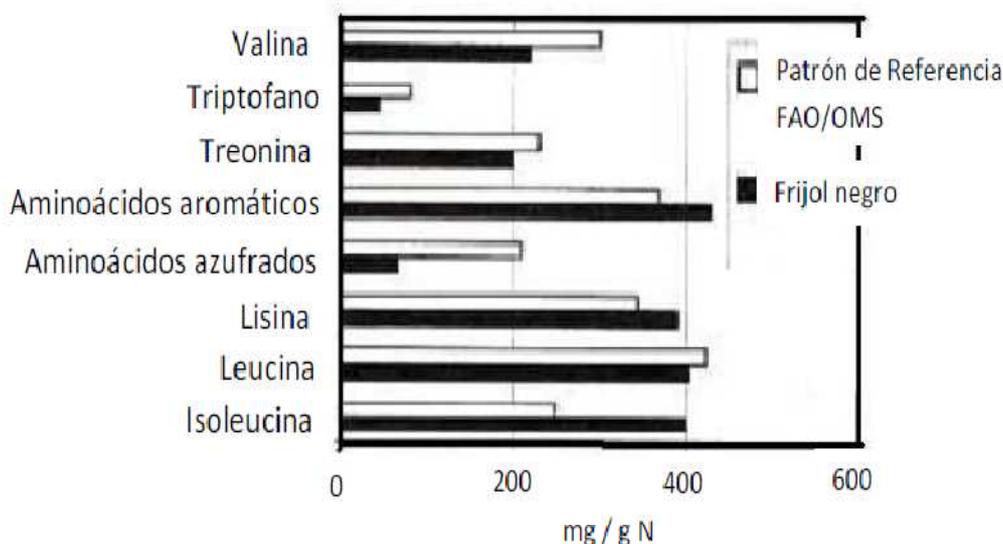
Los hidratos de carbono son los componentes mayoritarios del frijol negro. La mayor parte son complejos, almidón y fibra dietética, mientras que la fracción de azúcares (glucosa libre 0.1%, fibra dietética total 27%) y oligosacáridos (rafinosa 0.4%, estquiosa 3.23%, verbascosa 0.12%) es significativamente menor. El contenido en almidón total es relativamente alto (42,9%), sin embargo, la mayor parte del mismo (62.7%) es almidón resistente a la digestión por la  $\alpha$ -amilasa pancreática, lo que supone que tan solo el 37.3% del total del almidón disponible puede repercutir directamente en la respuesta glucémica (Serrano, *et al.*, 2009).

### 3.4.2 Composición en grasas

Aunque el contenido en grasa del frijol es bajo (1.4%), tiene un alto porcentaje de fosfolípidos (25-35% del contenido al de grasa), que han demostrado tener un potente efecto hipolipemiante (reduce los niveles de colesterol y/o triglicéridos en la sangre), incluso a bajas concentraciones (Maninder, 2007). El ácido linoleico es el ácido graso más abundante (Lowry, 1951).

### 3.4.3 Composición en proteínas

El frijol negro es una de las principales fuentes de proteínas en la dieta del mexicano. La comparación del contenido en aminoácidos de la proteína del frijol con la proteína de referencia de FAO/OMS, indica que el frijol negro es una buena fuente de aminoácidos aromáticos, así como de lisina, leucina e isoleucina. Sin embargo, es deficiente en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína), valina, triptofano y treonina (Figura No. 3).



**Figura No. 3. Contenido de aminoácidos esenciales de frijol cocido (Blanco, 1991)**

Por otra parte, se trabaja con el frijol negro por la presencia de compuestos fenólicos y antioxidantes, por lo que si el aislado tiene propiedades funcionales y en el mismo están presentes estos compuestos, el producto obtenido tendría un valor agregado.

### 3.5 Compuestos fenólicos

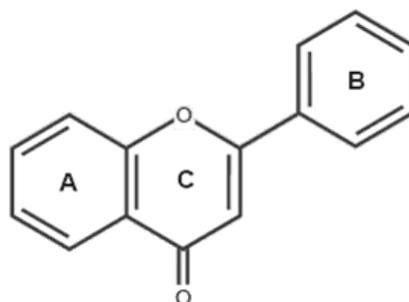
Los compuestos fenólicos se encuentran abundantemente distribuidos en la naturaleza. Son componentes muy importantes en la dieta del hombre ya que tienen efectos contra algunas enfermedades como cáncer y enfermedades cardiovasculares.

Poseen una estructura química adecuada para ejercer acciones antioxidantes ya que actúan como captadores de radicales libres neutralizando especies reactivas de oxígeno e iones metálicos quelantes (Gracia, 2007).

#### 3.5.1 Flavonoides

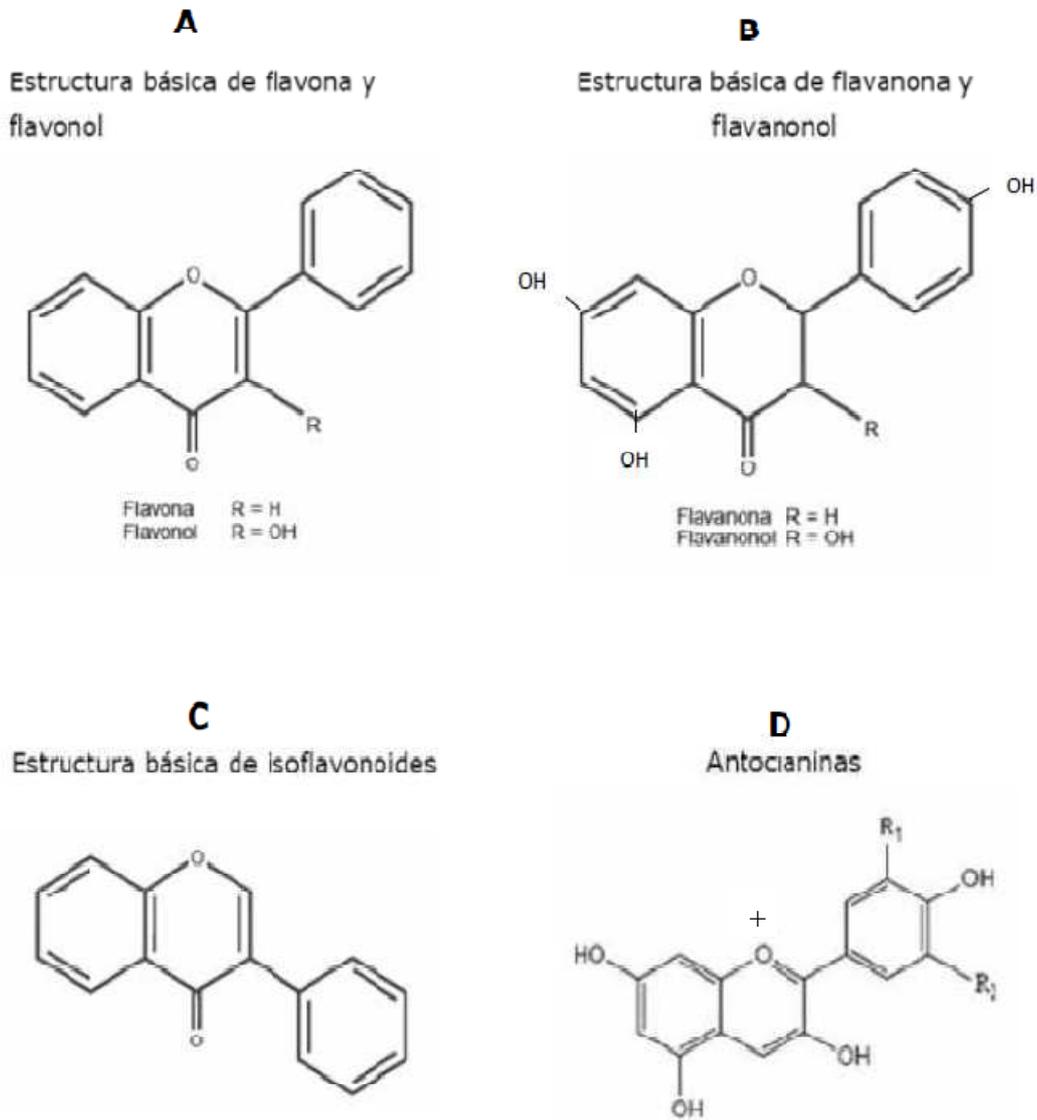
Flavonoides es el nombre genérico de un grupo de moléculas generadas por el metabolismo secundario de los vegetales.

Todos los flavonoides son compuestos derivados del benzo- $\gamma$ -pirano son de bajo peso molecular y comparten un esqueleto común de difenilpiranos ( $C_6-C_3-C_6$ ), el cual se compone de dos anillos de fenilos (A y B) que están ligados por un anillo de pirano (C) (figura 1)



**Figura No. 4 Estructura general de los flavonoides (López, 2002)**

Dependiendo del grado de oxidación y de sustitución del anillo pirano central pueden subdividirse en flavonas, flavonoles, flavononas, isoflavonas, flavanos y antocianinas. En la figura 5 se muestran las estructuras de éstas.



**Figura No. 5. Estructuras básicas de la subdivisión de los flavonoides. (López 2002).**

Los flavonoides son sustancias sólidas, cuyos cristales son de color blanco o amarillento.

No poseen las características de las vitaminas: no son aminas y conforman otro grupo químico, pero su acción protectora y la imposibilidad del organismo

humano de producirlos merecen ser incorporados al grupo de los nutrientes esenciales.

Son sustancias fácilmente oxidables y, por tanto, tienen efecto antioxidante, ya que se oxidan más rápidamente que otro tipo de sustancias.

Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides son (Bors, *et al.*, 1990):

- Presencia de estructura orto-dihidroxi en el anillo B, que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
- Doble ligadura.
- Grupos 3- y 5-OH en los anillos A y C con función 4-oxo en el anillo C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante.

Se destacan por su baja toxicidad y presentan actividad sobre el sistema vascular con acción vitamínica P. Se ha comprobado su potente capacidad de inhibir *in vitro* la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos y reducir la citotoxicidad de las LDL oxidadas (Hirano, *et al.*, 2001). De hecho, las poblaciones que consumen productos ricos en flavonoides estadísticamente presentan menores riesgos de afecciones cardiovasculares. Poseen efectos antimutagénicos y tienen la capacidad de inhibir algunas enzimas.

Se han descrito efectos protectores en patologías como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, úlcera estomacal y duodenal (Saskia *et al.*, 2001). Otras actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas (Vrijssen *et al.*, 1988), así como sus propiedades antitrombótica y antiinflamatoria (Brasseur, 1989).

En estudios epidemiológicos se ha demostrado que con el consumo incrementado de frutas y verduras se experimenta una reducción del 50% en el riesgo de cánceres digestivos y de las vías respiratorias (Hollman, 1998). También modula la reacción de los estrógenos ligándose a sus receptores lo que disminuye el riesgo de cáncer de mama.

Los flavonoides protoantocianídicos pueden ser absorbidos por las membranas celulares y protegerlas de la acción de los radicales libres, y como tienen la

ventaja de ser hidrosolubles y liposolubles pueden atravesar la barrera hematoencefálica y así proteger a las células cerebrales. Además aumentan la efectividad de las células "natural killer" del sistema inmunológico (Bagchi, 2002).

En el hígado, los flavonoides como la quercetina, son capaces de inhibir la activación de las células estrelladas así como la producción de óxido nítrico, alterando vías de expresión de proteínas celulares (Kawada, *et al.*, 1998). En ratas con obstrucción biliar se ha demostrado que el tratamiento con quercetina previene la oxidación lipídica, atenúa los depósitos de colágeno y el proceso de fibrogénesis hepática (Peres, *et al.*, 2000). Algunas fuentes donde se pueden encontrar flavonoides son: tubérculos de cebolla, la uva y la fermentación de ésta (vino), la cerveza, manzanas, brócoli, cerezas, naranja, limón, toronja, alimentos elaborados con soya, té verde y negro, frijol, entre otros.

### **3.6 Propiedades funcionales**

El término "propiedad funcional" que se aplica a los ingredientes alimenticios se define como cualquier propiedad fisicoquímica de los polímeros que influencia algunas características de un alimento y que contribuye a la calidad final del producto.

Pueden depender de factores intrínsecos propios de la molécula, como conformación, relación y disposición de los aminoácidos, hidrofobicidad, ionización, carga eléctrica, forma, peso molecular, entre otros; así como de factores extrínsecos como son el pH, la fuerza iónica, temperatura, actividad acuosa, constante dieléctrica, etc.

Se pueden clasificar en tres grupos principales:

1. Propiedades de hidratación: dependientes de las interacciones proteína-agua. Se incluyen propiedades como la absorción y la retención de agua.
2. Propiedades dependientes de la interacción proteína-proteína, como la precipitación y la gelificación.
3. Propiedades superficiales, que se refieren a la tensión superficial de emulsificación y características espumantes de las proteínas.

Estos grupos no son totalmente independientes. Por ejemplo, la gelificación no solamente implica las interacciones proteína-proteína, sino también las interacciones proteína-agua (Morales de León, 2007).

Además de su importancia como fuente de aminoácidos en la nutrición, las proteínas influyen de manera determinante en las características reológicas (elasticidad, cohesión, viscosidad, gelificación, etc.) y de textura de los alimentos (Cherry, 1981). Por estas cualidades, las proteínas se usan comercialmente en la fabricación de productos alimenticios a los cuales confieren sus propiedades físicas y químicas aparte de que desempeñan un papel muy importante en la aceptación del consumidor. Aunque los alimentos son sistemas complejos compuestos por varios componentes y los efectos funcionales son el resultado de la interacción de cada uno de ellos, es útil realizar estudios de ingredientes individuales para predecir, controlar e impartir características deseables a sistemas de alimentos reales. En la tabla número 2 se presenta la funcionalidad requerida de los aislados proteicos.

Existen muchos métodos de laboratorio para determinar las propiedades funcionales de las proteínas; sin embargo, la extrapolación de estos datos a un sistema complejo, como es un alimento, no siempre es representativa. La mejor manera de obtener información sobre la efectividad de una determinada propiedad es usar la proteína en forma directa en el alimento y observar su comportamiento.

- **Capacidad de Absorción de Agua (WAC):** La composición y conformación de las proteínas tienen efectos importantes sobre las interacciones de las mismas con el agua. Estas interacciones pueden dividirse en dos categorías. La primera de ellas es la capacidad de absorción de agua en la cual el agua se liga a la molécula de la proteína, de forma que ya no queda disponible como solvente. La segunda es la capacidad de retención de agua, en la que el agua se encuentra atrapada dentro de una matriz proteica. Mientras que la absorción de agua es dependiente de las propiedades fisicoquímicas (tipo de aminoácidos y el pH), la capacidad de retención de agua se ve afectada por la estructura y el tamaño de poro de la matriz proteica (Hall, 1996).

- **Capacidad de Absorción de Aceite (FAC):** La capacidad de absorción de aceite de una proteína es muy importante para su aplicación en productos como extensores en productos embutidos y sustitutos de carne, principalmente porque mediante esta propiedad funcional se mejora la retención de sabor así como la palatabilidad de los productos alimenticios. El mecanismo por el cual se lleva a cabo la absorción parece ser la retención física del aceite en un estado sólido, semisólido o fluido (Cheftel, 1989). Las interacciones de la proteína con el aceite dependen en gran medida de la composición y conformación de la misma (Hall, 1996).
- **Formación y estabilidad de espuma:** Las espumas son dispersiones aire-líquido, constituidas por un conjunto de burbujas gaseosas separadas por películas delgadas de líquido. Las causas físicas de la formación de una espuma son varias: una agitación enérgica de líquido con el aire, la caída de un líquido desde cierta altura, el borboteo de aire u otro gas en el seno de un líquido etc. Durante la formación de espuma, la proteína funcional se concentra en la burbuja de gas y la interfase líquida reduciendo la tensión superficial, incrementando así la viscosidad. Esto mantiene la burbuja de gas y minimiza el desperdicio de líquido. Para tener un desempeño satisfactorio, gran parte de la proteína debe ser inicialmente soluble y capaz de desdoblarse de la interfase, orientando las superficies polares y no polares con las fases líquida y gaseosa, respectivamente. Las moléculas de proteína deben interactuar unas con otras para formar una película estable, y la interacción no debe ser demasiado fuerte, para que la proteína se coagule y rompa la película, resultando en una ruptura de la espuma. Existen muchas variables en un sistema de alimentos que pueden afectar este balance, requerido para desarrollar y mantener la espuma. El pH debe estar por encima, pero cercano al punto isoeléctrico. Por lo general un pH de 5 es deseable para la funcionalidad espumante. El volumen de la espuma depende de la concentración de la proteína y por lo tanto, en una base igual en peso, los aislados de proteína son mejores que los concentrados

y las harinas. Las trazas de lípidos en los aislados actúan como inhibidores de la espuma y su remoción mejora las propiedades espumantes. La presencia de sacarosa disminuye el volumen de espuma pero mejora la estabilidad de ésta. El cloruro de sodio incrementa el volumen de la espuma y mejora la estabilidad de la espuma. Los hidrolizados pépticos de proteína de soya han sido utilizados para mejorar las propiedades espumantes. Las proteínas hidrolizadas espuman pronto, y los aditivos, como los sólidos de jarabe de maíz, se utilizan para estabilizar la espuma (Owen, 1985).

- **Gelificación:** El fenómeno de gelificación implica la formación de una matriz tridimensional, principalmente a través de enlaces de hidrógeno entre proteínas que permiten inmovilizar agua dentro de la estructura de gel. Es un proceso complejo que lleva consigo, en un primer paso, un desdoblamiento o desnaturalización de las proteínas, para después favorecer la interacción proteína-proteína que da origen a la estructura tridimensional ordenada en la que quedan retenidos el agua, los glóbulos de grasa, las sales y otras sustancias de bajo peso molecular. Por estas razones, la dureza del gel depende de la intensidad de las fuerzas (uniones hidrófobas, hidrófilas y covalentes) que constituyen dicha estructura y que están en función del pH, de la concentración del polímero, de la temperatura, de la fuerza iónica, del grado de desnaturalización, etcétera (Owen, 1985). Esta propiedad tiene un papel fundamental en la preparación de muchos alimentos, incluyendo productos lácteos, cárnicos, marinos y masa de pan. Esta propiedad es importante no sólo para la formación de geles sólidos, sino también para mejorar la absorción del agua y emulsificación.
- **Emulsificación:** La definición tradicional de una emulsión se refiere a la dispersión coloidal de gotas de un líquido en otra fase líquida (Dickinson y Stainsby, 1988). Estos sistemas de dispersión están constituidos por dos líquidos inmiscibles en los que la fase dispersa se encuentra en forma de pequeñas gotas, entre 0.1 y 10  $\mu\text{m}$ , distribuidas en la fase continua o dispersante. Son inestables, y si se les permite reposar por

algún tiempo, las moléculas de la fase dispersa tienden a asociarse para constituir una capa que puede precipitar o migrar a la superficie, según la diferencia de densidades entre las dos fases (Lissant, 1984). Por lo general, las emulsiones son sustancias cuyas moléculas contienen una parte no polar y otra polar, por lo que es posible que se disuelvan tanto en agua o soluciones acuosas como en disolventes orgánicos y aceites.

La mayoría de las emulsiones que se encuentran en los alimentos están compuestas por aceite y agua. Según las concentraciones de estos dos componentes, las emulsiones sencillas son de aceite en agua (mayonesa, leche, aderezos y cremas) o de agua en aceite (margarina) (Badui, 1999).

**Tabla No. 2. Funcionalidad requerida de los aislados proteicos para ser usados en la elaboración de alimentos (Cheftel, 1989; Badui 1993).**

<b>Propiedad</b>	<b>Uso</b>
Absorción de agua	Salsas, productos cárnicos y productos similares a la carne.
Absorción de aceite	Productos lácteos, productos cárnicos y productos similares a la carne.
Espumado	Panificación, postres, alimentos congelados, productos lácteos y reemplazantes de huevo.
Emulsificación	Alimentos infantiles, bebidas dietéticas, dulces, carnes enlatadas, salsas, productos lácteos, productos cárnicos y productos de confitería y chocolatería.
Gelificación	Masa de panadería, productos lácteos, reemplazantes de huevo y productos cárnicos.

#### **4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA**

Las proteínas de origen animal, tradicionalmente empleadas por su alto valor nutritivo y propiedades funcionales, son difíciles de adquirir y de producir, por lo que las de origen vegetal son la mejor alternativa para la obtención de aislados y concentrados proteicos. Las leguminosas son una fuente a considerar por su alto contenido de nutrimentos y universalidad.

México es un país de alta producción de frijol, leguminosa que en los últimos años ha sufrido una disminución en su consumo. Esta situación es preocupante ahora que se sabe que este alimento puede ser considerado un nutracéutico por las características de sus componentes, como la proteína y los compuestos fenólicos.

Considerando que una de las razones de la disminución del consumo de este producto es que los consumidores buscan alimentos de preparación sencilla, en este trabajo se presentan las bases para el desarrollo de productos que representarían una alternativa que impactaría en las condiciones nutricias de la sociedad. La obtención de aislados proteicos que conserven las capacidades antioxidantes presentes en la semilla de frijol permitirá su uso en productos enriquecidos, los cuales, representan una alternativa nutrimental y de diversificación. Su explotación dependerá de las propiedades funcionales que presente, por lo que se evaluarán las propiedades emulsificantes y su estabilidad, solubilidad en agua y en grasa, así como la capacidad de generar espumas y formar geles.

Se considera que el uso del frijol negro con este fin permite vislumbrar un mejor producto que otros tipos de frijol por la cantidad de flavonoides que contiene, que permiten considerarlo de entrada como un alimento funcional.

Existen antecedentes como el de Morales de León, en el cual obtuvo a la proteína del frijol negro por medio de extrusión. Es importante mencionar que el trabajar con el frijol crudo trae un riesgo tóxico el cual tiene que ser considerado.

## **5. HIPÓTESIS**

Un aislado proteico elaborado a partir del frijol crudo presentará alta capacidad emulsificante, de espumado y baja de gelificación.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general:**

- ✎ Establecer los parámetros para obtener un concentrado proteínico de frijol que conserve la calidad de la proteína y que tenga propiedades funcionales de interés comercial para diversificar su uso en productos alimentarios

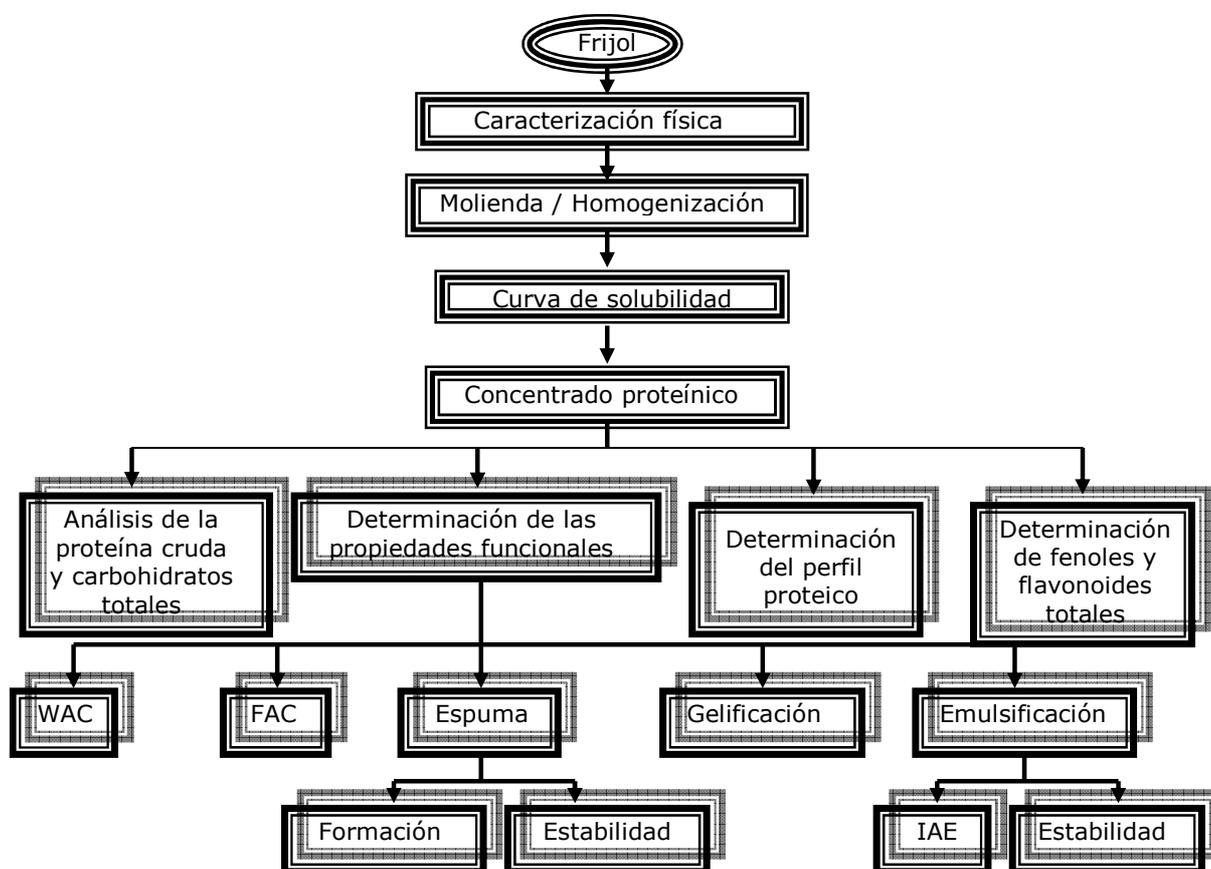
### **6.2 Objetivos específicos:**

- ✎ Obtener un concentrado proteínico del frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) por medio de solubilidad diferencial y precipitación isoeléctrica.
- ✎ Determinar tanto las propiedades fisicoquímicas como las propiedades funcionales (capacidad de absorción de agua, capacidad de absorción de aceite y espumado) del aislado para proponer en qué sistemas alimentarios podrá ser utilizado.
- ✎ Determinar la presencia de compuestos fenólicos en el aislado proteico.

## 7. METODOLOGÍA

De acuerdo con los objetivos propuestos anteriormente, las etapas del desarrollo del proyecto son las siguientes:

1. Extraer la proteína del frijol negro por solubilidad y precipitación isoeléctrica.
2. Caracterizar el aislado por medio de la realización del análisis fisicoquímico.



**WAC** Capacidad de absorción de agua

**FAC** Capacidad de absorción de aceite

**IAE** Índice de actividad emulsificante

### **7.1 Datos de las muestras**

- Lugar de compra: Central de abastos
- Presentación de las muestras: costal de 50 Kg
- Precio de las muestras por kilo:
  - Muestra 1: \$22.00 MN
  - Muestra 2: \$24.00 MN

### **7.2 Caracterización física del frijol**

Se determinaron 6 características físicas de dos semillas diferentes de la variedad del frijol común *Phaseolus vulgaris*. Las características trabajadas fueron: tamaño (longitud, ancho, grueso), densidad (peso de 1000 granos), color, brillo, testa y forma de la semilla.

### **7.3 Preparación de la materia prima**

1. Se removió el material extraño por medios mecánicos y posteriormente se lavó la muestra.
2. Se molió la muestra para obtener harina con ayuda de una Licuadora Waring Comercial Xtreme a velocidad Alta.
3. La harina se homogenizó por medio de un tamiz con una malla del No. 40, la cual equivale a una abertura de 0.420 mm.

### **7.4 Curva de solubilidad de la proteína del frijol**

Preparación de la muestra

Se pesaron 10 gramos de harina de frijol y se les agregó un volumen de 50 mL de agua destilada. La muestra se dejó agitar por 30 minutos. De esta suspensión se tomaron 2 mL y se le ajustó el pH a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 con HCl 0.1 N (BAKER) o NaOH 0.1 N (BAKER) según requiriera el caso.

Precipitación de proteína con ácido tricloroacético (TCA)

Se mezclaron 200  $\mu$ L de la solución saturada de TCA (BAKER) con 900  $\mu$ L de muestra. Se agitaron las muestras en vortex por 15 segundos y se dejaron en reposo en hielo por 15 minutos. La muestra se centrifugó a

14,000 xg por 10 minutos y el pellet se resuspendió con 100 µL con acetona (BAKER) al 90%. La muestra se volvió a centrifugar por 5 minutos a la misma velocidad. Se realizaron lavados con acetona hasta que la muestra fuera blanca y el pellet se resuspendió en 900 µL de NaOH 0.1 N (BAKER). Se realizaron las diluciones necesarias. (1:3000 y 1:3500).

Medición proteína por el Método de Bradford

A 800 µL de la última dilución se le adicionaron 200 µL del reactivo de Bradford, se mezcló con ayuda del vórtex y se dejó en reposo por 5 minutos a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a 595 nm lavando las celdas con etanol industrial (MORELOS) y agua. Se construyó una gráfica de pH contra % de proteína

### **7.5 Preparación del aislado proteínico (Jonson & Brekke; con modificación de El-Adawy, (1983)):**

La harina de frijol se llevó a un pH de 8.0 utilizando una solución de NaOH 0.8 N (BAKER) con el fin de solubilizar la mayor parte de la proteína. Posteriormente la muestra se centrifugó a 10,000 rpm por 20 minutos y a 5°C. El sobrenadante se llevó a pH 4 con HCl 1 N (BAKER) para precipitar la proteína. Se sometió a una centrifugación a 10,000 rpm por 15 minutos y a 5°C. El precipitado se extendió en una charola de aluminio y se dejó secar a temperatura ambiente con ayuda de un ventilador de clip marca Sorex. Se pesó la muestra seca.

### **7.6 Análisis de la Proteína cruda de acuerdo al método (976.05) de la AOAC INTERNATIONAL (2000):**

El método de Kjeldahl consta de tres etapas que en su orden son: digestión de la muestra, destilación con arrastre de vapor del amoníaco producido y valoración ácido base de este amoníaco.

En la primera etapa, el hidrógeno y el oxígeno proteico son oxidados hasta dióxido de carbono y agua, mientras que el nitrógeno es convertido en sulfato de amonio, por la acción de un agente oxidante en medio ácido y con la ayuda de un catalizador. Se han desarrollado diferentes variantes en las cuales

cambia el catalizador ó el agente oxidante, pero en todos los casos, el objetivo final de la etapa de digestión es el de convertir el nitrógeno proteico en sulfato de amonio.

En la etapa siguiente, mediante la acción de una base fuerte, generalmente hidróxido de sodio al 40%, se libera el amoníaco de la sal de amonio. Cuando la valoración se va a efectuar por retroceso, el amoniaco liberado se arrastra con vapor y se recoge sobre un volumen exactamente medido de un ácido estándar. Una variante utilizada comúnmente, consiste en recibir el amoniaco (hidróxido de amonio) sobre ácido bórico aproximadamente al 4% de tal manera que se forma borato de amonio, el cual se titula directamente.

En la etapa final, se hace la valoración de acuerdo con el proceso empleado para la recolección. Así por ejemplo, si el hidróxido de amonio; se recibió sobre un volumen exactamente medido de un ácido estándar, la titulación se hace con una base valorada y en presencia de un indicador adecuado, de tal manera que se determina el ácido que no reaccionó con el hidróxido de amonio destilado y por diferencia, se calcula el hidróxido de amonio producido.

En un tubo de digestión de Kjeldahl se colocó 1 gramo de aislado proteico envuelto en papel encerado y se agregó el catalizador. Se digirió con pastillas de digestión (FOSS) durante 120 minutos. Se dejó enfriar, y posteriormente se agregó 10 ml de agua destilada y NaOH (BAKER) al 36%, destilando inmediatamente y recogiendo el destilado en un matraz Erlenmeyer con 50 ml de ácido bórico al 4%. Se adicionó 5 mL de agua destilada. Se tituló el destilado con HCl (BAKER) 0,1 N. Se calculó el % de recobro de sulfato de amonio.

**CÁLCULOS:**

$$\% N = \frac{(V_m - V_b) \times \text{meq} \times N_{\text{HCl}} \times 100}{m}$$

$$\% P = \% N \times F$$

Donde:

$$\text{meq} = 0.014$$

$$\text{mL blanco} = 0.1 \text{ mL}$$

$$N_{\text{HCl}} = 0.1 \text{ N}$$

$$F = 6.25 \text{ (general)}$$

## 7.7 Medición de la cantidad de carbohidratos totales por medio del método colorimétrico del fenol-sulfúrico (Dubois, 1956).

Se preparó una curva de calibración como lo indica la tabla mostrada a continuación:

No. Dilución	1	2	3	4	5	6	7
µL stock de glucosa	0	100	200	300	400	500	600
µL agua destilada	1000	900	800	700	600	500	400
Concentración de glucosa (%)	0	10	20	30	40	50	60

Se pesó 1 gramo de cada aislado proteico y se le agregó 5 mL de agua. La suspensión se agitó por 15 minutos y se filtró. Se tomó 1 mL del filtrado y se le adicionó 0.5 mL de solución de fenol acuoso al 5% (BAKER). Se agregó en forma rápida 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado (BAKER) y se llevó al vortex para mezclar y capturar algunos rastros de ácido por las paredes del tubo. Los tubos se dejaron reposar por 15 minutos y se introdujeron a un baño de agua a 30°C por 15 minutos. La muestra se leyó a una absorbancia de 492 nm y esta se interpoló en la curva de calibración de glucosa para determinar la concentración en la alícuota. Con este valor se calculó la cantidad de carbohidratos totales en los concentrados proteicos.

## 7.8 Polifenoles

### 7.8.1 Extracción de polifenoles

Se empleó la metodología descrita por Saura (1998). 500 miligramos de concentrado proteínico se extrajeron con 40 mL de metanol/agua (50:50 v/v) (TECSIQUIM) con agitación durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró, el filtrado se guardó y el residuo se extrajo nuevamente con 40 mL de acetona (BAKER)/agua (70:30 v/v) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró y los dos filtrados se juntaron. La solución se concentró en un rotavapor a 37 °C hasta obtener una pasta sólida y se redisolvió en 10 mL de etanol (BAKER).

### **7.8.2 Determinación de Fenoles totales**

Se cuantificaron los compuestos fenólicos utilizando el método oficial de la AOAC, por el método de Folin-Ciocalteu (1989) descrito por Matthaus (2002). A 2 mL del extracto alcohólico concentrado se le adicionó 5 mL de HCl al 0.3% (BAKER). Se tomó una alícuota de 200 µL y se les agregó 1.5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2% (BAKER). Después de 2 minutos de reposo se adicionó 100 µL del reactivo Folin-Ciocalteu (SIGMA) diluido con agua destilada (1:1). Después de 30 minutos de reposo se leyó la absorbancia a 750 nm.

Para calcular la concentración de polifenoles se construyó una curva patrón usando ácido gálico como estándar y los resultados se expresaron como miligramos de ácido gálico por gramo de muestra en peso seco.

### **7.8.3 Determinación de Flavonoides Totales**

Se determinó por el método descrito en la Farmacopea (1989) utilizando como componente de referencia a la rutina. Para lo cual, 1 mL del extracto etanólico (50g/L) se mezcló con 1 mL de AlCl<sub>3</sub> (MALLINCKRODT) en etanol (20g/L) y se aforó a 25 mL con etanol. Se colocó en un baño de agua a 20 °C por 40 minutos y se midió la absorbancia a 415 nm. El blanco se preparó con 1 mL del extracto al cual se le agregó 1 gota de ácido acético (BAKER) y se aforó a 25 mL con etanol. Las soluciones de rutina se prepararon a partir de una solución stock de 0.05 gramos y se trataron bajo las mismas condiciones. La cantidad de flavonoides totales se calculó como:

$$x = \frac{A * m_0 * 10}{A_0 * m}$$

Donde:

x= Cantidad de flavonoides (mg/g de extracto)

A= Absorción de la disolución del extracto

A<sub>0</sub>= Absorción de la solución estándar de rutina

m= Peso de extracto (g)

m<sub>0</sub>= Peso de la solución de rutina (g)

## **7.9 Determinación de propiedades funcionales:**

### **7.9.1 Determinación de la Capacidad de Absorción de Agua (WAC) (Quinn y Paton, 1979).**

Se determinó la capacidad de absorción de agua al colocar 3 gramos del concentrado proteínico en tubos de plástico cónicos Nalgene, con graduación mínima de 15 mL. Al primer tubo se le añadió 4 mL, al segundo 5 mL, y al tercero 6 mL de agua destilada. Los tubos se centrifugaron a 1000 g durante 10 minutos y se registró el volumen total de agua agregada al tubo que presentó menisco de agua y el volumen total de agua agregada al tubo que no lo presenta. La capacidad de absorción de agua se expresó en mL de agua absorbida / g de muestra.

### **7.9.2 Determinación de la Capacidad de Absorción de Aceite (FAC) (Sosulski y col. 1976).**

Se determinó la capacidad de absorción de grasa al colocar 3 gramos del concentrado proteínico en tubos de plástico cónicos Nalgene, con graduación mínima de 15 mL. Al primer tubo se le añadió 1 mL, al segundo 2 mL, y al tercero 3 mL de aceite de maíz. Los tubos se centrifugaron a 1000 g durante 10 minutos y se registró el volumen total de agua agregada al tubo que presente menisco de aceite y el volumen total de aceite agregado al tubo que no lo presenta. La capacidad de absorción de aceite se expresó en mL de aceite absorbido / g de muestra.

### **7.9.3 Determinación de la formación y la estabilidad de espuma**

La capacidad para producir espuma y la estabilidad de espuma se determinaron por el método descrito por Coffman y García (1977). Dos gramos de proteína se suspendieron en 100 mL de agua desionizada y se centrifugaron durante 5 minutos a velocidad media. La mezcla se transfirió a una probeta graduada de 250 mL y el aumento del volumen se registró como la capacidad para producir la espuma. Después de 30 minutos el volumen de la espuma fue medido otra vez y expresado como la estabilidad de la espuma.

#### **7.9.4 Determinación de la Gelificación (Lawal Olayide, 2004)**

Se ajustó el pH de 10 ml de suspensión de proteínas que varían de 2, 5, 10, 15 y 20 g de proteína/100ml a pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. Una vez en el pH adecuado, las suspensiones fueron colocadas en un baño de agua hirviendo durante 20 minutos. Se dejaron durante 1 hora a temperatura ambiente y, a continuación, a 4 ° C durante 20 horas. La presencia de un gel se consideró como un resultado positivo.

#### **7.9.5 Determinación del índice de actividad emulsificante (IAE) (Pearce y Kinsella, 1978).**

Se prepararon suspensiones del aislado proteico de frijol negro en que se varió la concentración de proteína desde 0.1 hasta 5% (p/v) a pH 4 y pH 7.

El índice de actividad emulsificante se determinó tras mezclar tres partes de la suspensión de aislado proteico con una parte de aceite. Se realizó una agitación mecánica intensa en un homogenizador durante 2 minutos. La emulsión preparada se diluyó en una solución de SDS (0.1% NaCl (BAKER) 0.1 M pH 7 y la turbidez de esta dilución se leyó a 500 nm en espectrofotómetro

El índice de actividad emulsificante se calculó de la siguiente manera:

$$IAE=2T D / \Phi C \text{ (en m}^2\text{/g)}$$

Donde:

T – turbidez 2.303 D.O/I

D.O. – densidad óptica que se multiplica por el factor de dilución de la emulsión

I – longitud de la celda en m (0.01 m)

D – factor de dilución

$\Phi$  – fracción volumétrica de la fase apolar dispersa

C – concentración de la solución de proteína ( g/m<sup>3</sup>)

### **7.9.6 Determinación de la estabilidad de emulsión (Dagorn-Scaviner y col. 1987).**

Se midió la resistencia de una emulsión a la coalescencia ante una fuerza centrífuga midiendo el volumen de la fase aceite que se separó ( $V_s$ ). Se prepararon emulsiones con diferentes concentraciones de proteína de la suspensión del concentrado proteico en un rango de 0.1% a 5% de proteína en un pH de 4 y 7. Se mezclaron tres partes de una suspensión del aislado con una parte de aceite y se realizaron las emulsiones en un homogenizador a 20,500 rpm durante 2 minutos. Las emulsiones se vaciaron a tubos cónicos graduados y se centrifugaron a 1000 g durante 10 minutos.

La cuantificación se realizó con la siguiente fórmula:

$$RC = V_s / V_i \cdot 100$$

Donde:

RC - resistencia a la coalescencia (%)

$V_s$  - fase de aceite separado (mL)

$V_i$  - volumen inicial de aceite en la emulsión

### **7.10 Determinación del perfil proteico por electroforesis (Schägger H, et al., 1987)**

A los aislados proteicos se les realizó una electroforesis en gel de acrilamida/bisacrilamida para analizar su perfil proteico. En el anexo V se describe el fundamento de esta metodología.

Las cantidades que se describen a continuación sirven para el sistema de minigeles de Bio-Rad (Mini-Protean II®). Las mismas pueden adaptarse para otras cámaras de diversa capacidad, conservando las proporciones.

Para la preparación del gel separador o inferior con concentración de 10% de acrilamida (5 ml, grosor = 0,1 mm), se mezcló los siguientes reactivos en un matraz Erlenmeyer de 50 ml:

Agua destilada	2000 $\mu$ L
Acrilamida/Bisacrilamida	1665 $\mu$ L
Buffer separador (Tris HCl pH 8.8)	1250 $\mu$ L
Dodecil sulfato sódico (SDS)	50 $\mu$ L
Persulfato amónico (APS)	25 $\mu$ L

Se preparó el molde para el gel. Con la mezcla de reactivos a temperatura ambiente se inició la polimerización agregando 2.5 ml de tetrametilen, etilen diamina (TEMED) a la mezcla. Inmediatamente se mezcló y se vertió la solución en los vidrios (molde), hasta la marca, sin atrapar burbujas. Posteriormente, se eliminó el menisco en la superficie, con una delgada capa de isobutanol, depositada muy suavemente sobre la mezcla. Se dejó que polimerizara el gel (óptimamente en 20 min). Una vez que la interfase entre el polímero y el isobutanol se tornó visible, se esperó 10-15 min adicionales para que se completara la reacción. Luego, se decantó el exceso de líquido de la superficie, y se colocó el peine para muestras, en posición ligeramente inclinada (para no atrapar burbujas). Se mezclaron los componentes del gel superior (compactador o concentrador):

Agua destilada	1530 $\mu$ L
Acrilamida/Bisacrilamida	320 $\mu$ L
Buffer concentrador (Tris HCl pH 6.8)	625 $\mu$ L
SDS	25 $\mu$ L
APS	12.5 $\mu$ L
TEMED	2.5 $\mu$ L

Se mezcló y se vertió de inmediato en el molde, nivelando el peine a su posición horizontal, sin atrapar burbujas. Se dejó polimerizar. Posteriormente se retiró el peine deslizándolo suavemente. Se prepararon las muestras y se realizaron los cálculos pertinentes para inyectar 0.015 mg de proteína de cada una de ellas. Se cargaron las muestras en los pozos incluyendo los marcadores de peso molecular como referencia. Se llenó la cámara con el amortiguador se colocó el gel y se corrieron las muestras a 80 mV por 10 minutos, y posteriormente el voltaje se aumentó a 120 mV hasta que el azul de bromofenol llegara casi al borde inferior del gel (45-60 min). Se sacó el gel, y se depositó en un recipiente tapado (para evitar los vapores tóxicos del metanol), con agitación suave con azul de Coomassie durante 12 horas con lo cual el gel se tiñó. Se eliminó el exceso de colorante con varios cambios del decolorador (solución de metanol y ácido acético al 50/50%).

## 8. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las muestras utilizadas fueron dos semillas de frijol negro que pertenecen al mismo género y a la misma especie (*Phaseolus vulgaris*), por lo que al frijol más grande se le etiquetó como muestra 1, y al más chico se le etiquetó como muestra 2. En el anexo VII se muestran las imágenes de los frijoles utilizados (foto 1 y foto 2).

Al realizar una evaluación de la calidad de los dos lotes de granos se analizó la presencia de materias extrañas encontrando un 0.7% de éstas, granos quebrados con un valor del 2% y libre de insectos, por lo cual se le considera un frijol sano.

### 8.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL FRIJOL.

**Tabla No. 3 Dimensiones de las semillas del frijol**

Muestra	Largo (cm)	Grueso (cm)	Ancho (cm)
1	1.15±0.06	0.48±0.02	0.58±0.1
2	0.95±0.05	0.40±0.02	0.53±0.03

**Tabla No. 4 Densidad (peso de 1000 granos)**

Muestra	Densidad (g)
1	308.8±0.6
2	204.53±0.13

**Tabla No 5. Características visibles de la semilla**

Muestra	Color	Brillo	Testa	Forma
1	Negro liso	Intenso	Lisa	Ovalada
2	Negro liso	Intermedio	Lisa	Ovalada

En la caracterización se observó que los dos frijoles eran de color negro, con brillo que va de intenso a intermedio y el 100% presentó una testa lisa (tabla 5).

El tamaño de las semillas tiene una variación tanto en la longitud, como en el ancho y el grueso de éstas. El largo de las semillas de la muestra 1 varió desde 1.01 a 1.22 cm, mientras que las semillas de la muestra 2 se observó una variación de 0.88 a 1.05 cm. El grueso de las semillas de las dos muestras variaron entre 0.38 y 0.52 cm predominando los granos entre 0.40 a 0.48 cm. Las semillas de la muestra 1 son más anchas que las de las muestras 2 ya que las primeras varían entre 0.43 a 0.69 cm obteniendo un promedio de 0.58 cm, mientras que las segundas entre 0.49 y 0.57 cm, con un promedio de 0.53 cm (tabla 3).

El peso de mil granos es un indicador del tamaño de grano relacionado con el rendimiento de molienda, por lo que la muestra 1 tiene granos más grandes que la muestra 2.

## **8.2 EXTRACCIÓN Y CURVA DE SOLUBILIDAD DE LA PROTEÍNA DEL FRIJOL NEGRO.**

El tratamiento que se le dio a la materia prima permitió eliminar toda la materia extraña, como piedras, ramas, y tierra, que venían entremezcladas en los costales de plástico junto con el frijol.

Ya limpio, el frijol se molió en la licuadora, teniendo el cuidado necesario de no dejarla prendida más de un minuto y de esperar a que se enfriara entre cada molienda para que la proteína no se dañara por causa del calor provocado por la fricción de la muestra con las aspas. Posteriormente, la harina se tamizó con el objetivo de eliminar parte de la cáscara y así obtener una harina uniforme con partículas de tamaño no mayor a 0.420 mm. En la foto 3 del anexo VII se presenta el aspecto de la harina obtenida.

Conocer la proporción de proteína de cada uno de los frijoles utilizados era fundamental para predecir qué tan posible era obtener un aislado o solo un concentrado. Se analizó la cantidad de proteína que tenía cada una de las

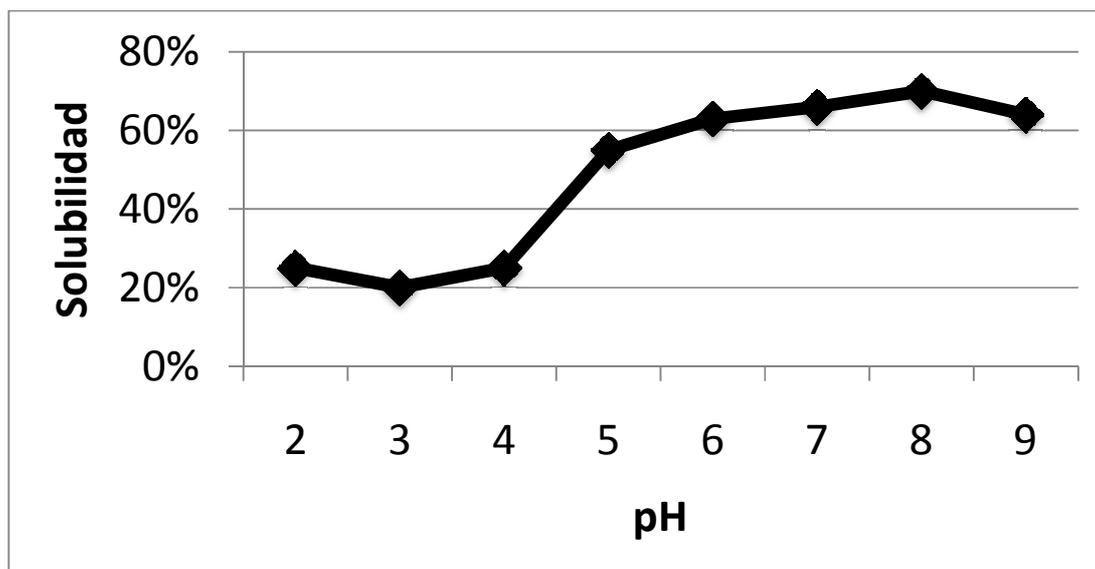
harinas, y la proveniente de la muestra 2 contiene mayor porcentaje de proteína que el de la muestra 1, con 70.71 y 67.87% respectivamente (tabla No. 7). Esto puede deberse a la práctica de siembra que tuvo cada uno, ya que el tipo de suelo, los nutrientes que este presenta, el clima, la fecha en que se sembró y se cosechó, qué fertilizante se ocupó, qué tanto se regó y con qué tipo de agua se realizó, entre muchas otras cuestiones, inciden en gran medida en la cantidad de nutrientes que la semilla puede desarrollar, datos que no se conocen en este caso.

Los aislados y concentrados proteicos que provienen de fuentes vegetales tienen un papel muy importante en muchas formulaciones de nuevos productos alimenticios. La aceptabilidad de tales precipitaciones proteicas depende de su calidad sensorial, valor nutricional y de sus propiedades funcionales, todas las cuales son afectadas por el método de obtención (Naczki, et. al., 1986).

El proceso de aislamiento se basa en la diferencia de solubilidades y en el punto isoeléctrico de las distintas fracciones proteicas que componen al frijol. Para la obtención del aislado generalmente se parte de harinas desengrasadas, pero el frijol solo contiene 1.47 gramos por cada 100 gramos, por lo que no es una fracción que interfiera en el proceso.

Para la extracción, originalmente se había propuesto que se cociera el frijol con el fin de simular las características en que un ser humano consume esta leguminosa, pero como el frijol contiene alrededor del 42.7% de almidón con la temperatura de cocción y el agua presente, éste se gelatinizaba, causando la encapsulación de más del 98% de la proteína.

Por todo esto se decidió que el frijol se utilizaría crudo con lo cual se aumentó el rendimiento, pero no se eliminó del todo el problema. En la gráfica No. 1 se presentan los resultados de solubilidad de la proteína a diferentes pH.



**Gráfica No. 1 Solubilidad de la proteína del frijol negro**

La solubilidad en agua de los materiales proteicos es de gran importancia en la tecnología de los alimentos. Por sí misma, esta propiedad sólo tiene aplicación directa en la elaboración de bebidas y productos similares; sin embargo, debe determinarse siempre, puesto que incide sobre otras propiedades como la emulsificación, gelificación, formación de espuma, etc. Por eso ha sido usada como una medida para otras propiedades funcionales y su valoración da una información ponderable sobre la proteína como ingrediente. La mayor porción de la proteína del frijol se puede extraer con agua en una proporción de harina-agua 1:5. Si a esta suspensión no se le agrega álcali o ácido el pH usualmente será de 6.4, donde aproximadamente se solubiliza un 60% de suspensión de la proteína de frijol extraída. La solubilización es el resultado del balance entre fuerzas subyacentes proteína-proteína e interacciones proteína-solvente. Esto implica que se establezca una fuerte interacción proteína-solvente para que el material proteico se solubilice en alto grado, de lo contrario se favorecerá la asociación proteína-proteína que disminuye la solubilidad e incluso puede provocar la precipitación. Este balance es afectado por cambios en el pH del medio, en la concentración, temperatura, naturaleza del solvente, presencia de otros componentes, entre otros (Hermansson, 1978).

La adición de hidróxido de sodio para obtener un pH de 8 incrementa la solubilidad a un 70% (foto número 4 Anexo VII). El pH del medio donde está inmersa la proteína influye marcadamente en su solubilidad. Para la mayoría de las proteínas la solubilidad es mínima a valores de pH correspondientes a su punto isoeléctrico y aumenta al alejarse de él. Esto se debe a que en el punto isoeléctrico se igualan las cargas eléctricas positivas y negativas de los polímeros, lo cual favorece la interacción proteína-proteína que induce a la agregación, disminuyendo por consiguiente la solubilidad. En esta curva de solubilidad podemos notar que el mínimo es pH 4. Es importante notar que a pH mayores del punto máximo (pH 8) disminuye drásticamente la solubilidad de la proteína.

Las proteínas de las leguminosas contienen más aminoácidos ácidos que básicos (como la mayoría de las proteínas), por eso sus puntos isoeléctricos se encuentran, por lo general, en el rango de pH ácido, siendo, en consecuencia, su solubilidad mayor en el lado alcalino.

Después de solubilizar a pH 8 y centrifugar la muestra se desecharon los carbohidratos y los lípidos (foto número 5, anexo VII), para que a continuación se precipitara la proteína a pH 4 (foto número 6, anexo IV) obteniendo la proteína de color morado con un aspecto plástico y cristalino (foto número 7 y 8, anexo VII), lo que a simple vista indica que seguramente no se eliminaron totalmente los carbohidratos, lo que se confirmó con la determinación de carbohidratos totales que estuvo en el rango de 29-32% (tabla No. 8).

El residuo principal de esta extracción es el almidón por lo que en el apartado de anexo II se encuentra una propuesta del tratamiento alternativo para este.

Es significativo mencionar que en esta parte experimental el color tuvo un gran impacto en la confiabilidad de las determinaciones, ya que a pH básico la proteína era de color azul oscuro, mientras que a pH ácido tomaba un tono violeta. Esto se puede atribuir a que el frijol contiene compuestos fenólicos conocidos como antocianinas a las cuales se le atribuyen la actividad antioxidante del frijol negro, por lo que sería interesante estudiarlas en un futuro para la obtención de colorantes y antioxidantes naturales que pueden ser útiles para la industria alimentaria mexicana.

Los aislados y concentrados proteicos que provienen de fuentes vegetales tienen un papel muy importante en muchas formulaciones de nuevos productos alimenticios. La aceptabilidad de tales precipitaciones proteicas depende de su calidad sensorial, valor nutricional y de sus propiedades funcionales, todas las cuales son afectadas por el método de obtención (Naczki, *et al.*, 1986)

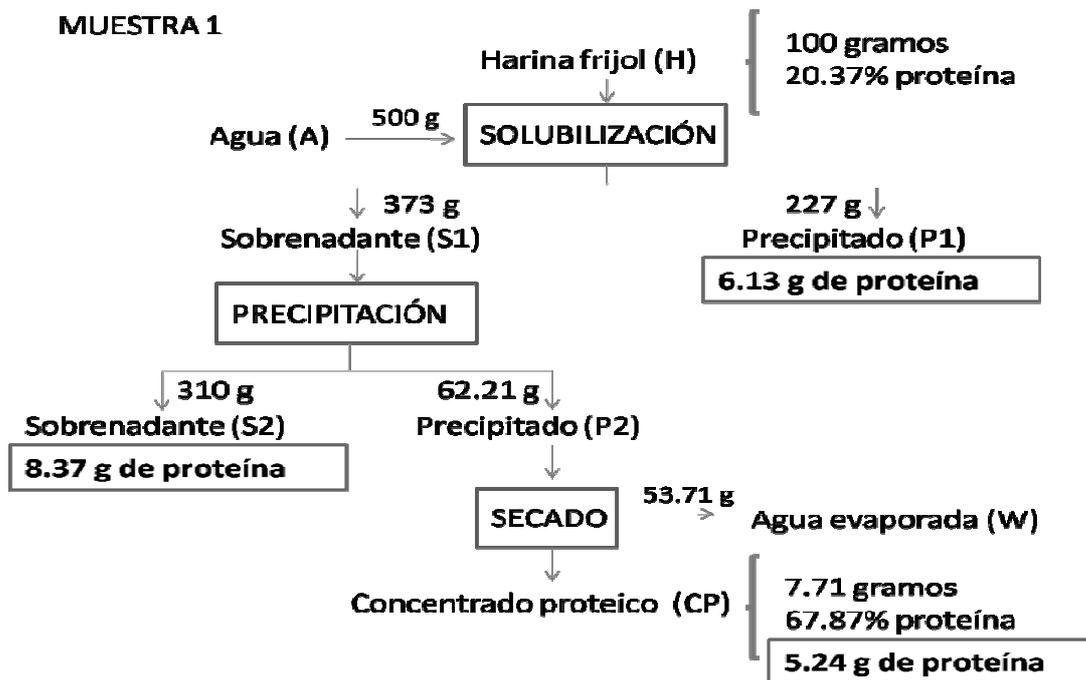
### 8.3 Rendimiento y Composición del producto obtenido

En la tabla No. 6 se puede observar que se emplearon más de tres kilos y medio para obtener 180 y 198 gramos de proteína en las dos muestras, respectivamente.

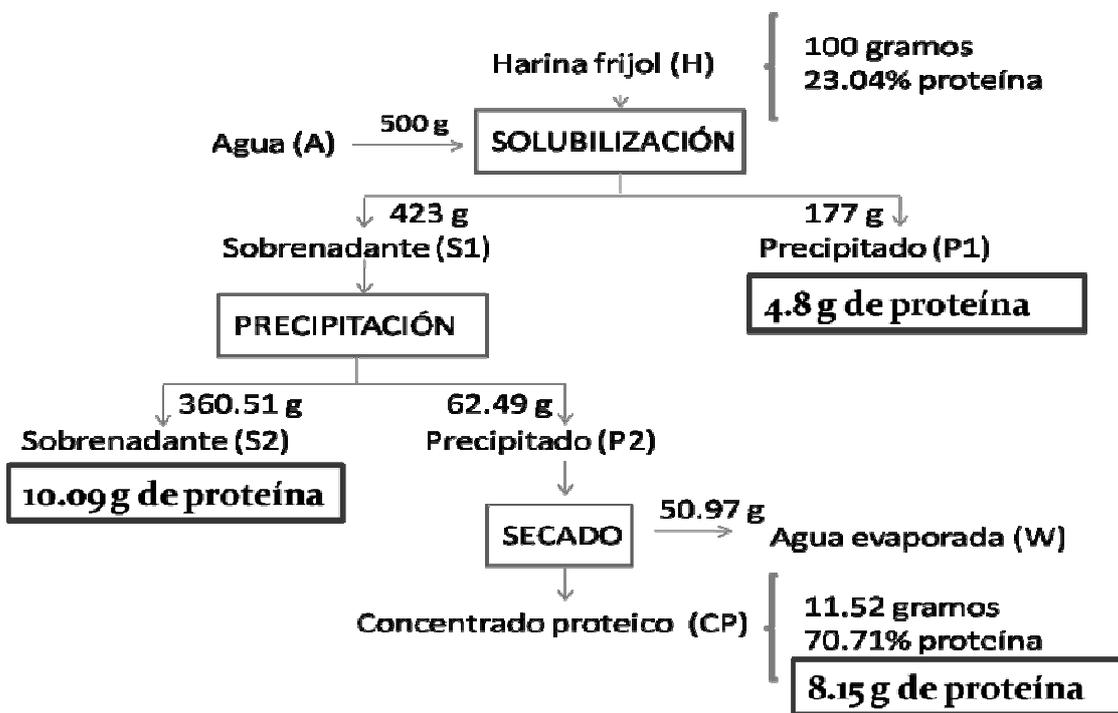
**Tabla No. 6**

	<b>Muestra 1</b>	<b>Muestra 2</b>
<b>Harina total del frijol</b>	3529.38 g	3650 g
<b>Concentrado total obtenido</b>	267.14 g	280.71 g
<b>Proteína total del concentrado</b>	181.31 g	198.49 g

El rendimiento del aislado proteico está en función de la extracción de proteínas de la semilla y de las condiciones de la precipitación isoelectrica. A fin de lograr el mayor rendimiento posible en la obtención del aislado se debe procurar que la extracción de proteínas sea máxima. Son varias las condiciones que influyen sobre la extracción proteica: pH, temperatura, tiempo de extracción, relación harina-extractante, efectos de sales, etc; siendo el pH la condición más importante (Bello & Okezie, 1989). Se realizó un estudio piloto trabajando con 100 gramos de harina de cada una de las muestras con lo que se obtuvo el balance de materia de cada una de ellas, los cuales se exhiben en los diagramas siguientes:



**Figura No. 6 Balance de materia de la muestra 1**



**Figura No. 7 Balance de materia de la muestra 2**

En los dos casos se observa que donde se pierde mayor cantidad de proteína es en la precipitación por lo que sería recomendable reprocessar el sobrenadante 2 y recuperar mayor porcentaje de esta.

En la tabla No. 7 se muestra el rendimiento proteínico de cada uno de las muestras.

**Tabla No. 7**

	<b>100 g frijol</b>	<b>Proteína (g)</b>	<b>Rendimiento proteínico (%)</b>
<b>Muestra 1</b>	8.5 g concentrado	5.76	*28.32%
<b>Muestra 2</b>	11.52 g concentrado	8.15	●35.37%

\* Considerando que la harina del frijol 1 contiene 20.42% de proteína

● Considerando que la harina del frijol 2 contiene 23.04% de proteína

Por medio del análisis del Nitrógeno total se obtuvo la pureza de la proteína, la cual fue de 67.96% para la muestra 1 y de 70.71% para la muestra 2. En el caso de los carbohidratos, el valor obtenido de la muestra 1 (31.9%) es mayor que en el de la muestra 2 (29.1%).

**Tabla No. 8**

<b>Frijol</b>	<b>% Pureza de la proteína</b>	<b>% de Carbohidratos totales*</b>
1	67.87	31.9
2	70.71	29.1

\* La curva patrón se encuentra en el apartado Anexo I

Se puede hablar de un aislado cuando se tiene el 90% o más de pureza, por lo que se obtuvo un concentrado, el cual fue adecuado para estudiar las propiedades fisicoquímicas de la proteína de cada frijol.

Para obtener un aislado es necesario eliminar mayor cantidad de carbohidratos. Una propuesta teórica es la aplicación de la biotecnología directamente en el aislado obtenido, agregando la enzima  $\alpha$ -amilasa obtenida a partir de *Bacillus subtilis* recombinante, ya que licúa el almidón y lo convierte en dextrina la cual es importante para la producción de jarabes o para la industria panadera. En el grupo de trabajo se hizo un estudio agregando las enzimas al comienzo del proceso de extracción el cual no tuvo un resultado favorable ya que con el tratamiento térmico (cocción) aplicado la proteína se desnaturaliza, por lo que su solubilidad cambia y no se pudo obtener (Quiñones, comunicación personal).

Otro camino a tomar sería seguir la metodología descrita por Marquez y Lajolo (1981), quienes alteran la fuerza iónica de la suspensión (agua + harina) con cloruro de sodio y precipitan las tres fracciones.

Morales de León, *et al* (2007) y Kaur & Singh (2007) extraen la proteína por medio de la solubilidad y precipitación isoelectrónica, pero en ninguno de los dos mencionan la pureza ni el rendimiento obtenido de su producto, aunque le dan el nombre de aislado. La única diferencia de sus metodologías con la que se aplicó en este trabajo es que ellos le dan un tratamiento químico, remojando el frijol con agua destilada y con buffer de acetatos pH 4, respectivamente, antes de la extracción.

#### **8.4 POLIFENOLES (FENOLES TOTALES Y FLAVONOIDEOS TOTALES)**

El grano de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es una fuente rica de sustancias quimioprotectoras. De manera particular, los compuestos fenólicos han mostrado una actividad biológica como antioxidantes, antimutagénicos y anticancerígenos, y se encuentran principalmente en la testa.

Interesa saber si estos compuestos se pueden encontrar también en el concentrado proteico. Por lo tanto, se evaluó su presencia empleando compuestos de referencia: el ácido gálico, que es un ácido orgánico que forma

parte de los taninos y permitió determinar la concentración de fenoles totales. La estructura y la curva de calibración obtenida para este ensayo se presenta en el Anexo III. Los resultados (tabla 9) muestran que los dos concentrados contienen compuestos fenólicos en cantidades significativas, aunque no es la fuente ideal. El valor reportado por Espinosa (2006) de contenido de fenoles totales en frijol silvestre de México es un rango de 0.9 a 2.11 mg eq. de ácido gálico/g de harina.

**Tabla No. 9 CONTENIDO DE FENOLES TOTALES MILIGRAMOS DE ÁCIDO GÁLICO POR GRAMO DE AISLADO EN PESO SECO.**

<b>Concentrado</b>	<b>Ácido gálico mg /g de concentrado</b>
1	1.35±0.54
2	1.06±0.63

Comparando los niveles fenólicos obtenidos con los reportados para un aislado proteico de soya (isoflavonas 2 mg/g proteína de soya (Noriega, 2007).) el aislado proteico de frijol contiene menor cantidad.

Los flavonoides totales se cuantificaron empleando como referencia a la rutina, que es un flavonol formado por una ramnosa unida a una glucosa mediante un enlace glucósídico de tipo (1β-6). La estructura y la curva de calibración obtenida para obtener el contenido de flavonoides totales se presenta en el anexo IV. Los resultados (tabla 10) muestran valores menores que los obtenidos para el análisis de fenoles. Esto se encuentra dentro de lo esperado, siendo que los flavonoides son un subgrupo de los compuestos fenólicos.

**Tabla No. 10 CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES MILIGRAMOS DE RUTINA POR CADA CIEN GRAMOS DE MUESTRA EN PESO SECO**

<b>Concentrado</b>	<b>Rutina mg/100 g de muestra</b>
1	13.54±0.88
2	14.56±0.77

En general, los concentrados y aislados de proteínas de frijoles contienen bajas cantidades de flavonoides, en comparación con otras frutas y verduras como las fresas, cerezas, arándanos, uvas, calabazas, zanahorias, etc, que disponen entre 240 a 600 mg/g (Cataya-Reynaldo, 2001), por lo que el aislado proteico no es una fuente idónea, aunque es un beneficio extra que presenta.

### 8.5 PROPIEDADES FUNCIONALES

Las propiedades funcionales estudiadas fueron capacidad de absorción de agua, capacidad de absorción de aceite, formación y estabilidad de espuma, gelificación y el índice de actividad emulsificante así como la estabilidad de esta emulsión.

**Tabla No. 11 Capacidad de absorción de agua**  $\frac{mL\text{de agua absorbida}}{100\text{ g muestra}}$

<b>Tubo</b>	<b>1 (4mL)</b>	<b>2 (5mL)</b>	<b>3 (6mL)</b>
<b>Aislado muestra 1</b>	98.88±0.03	97.78±0.03	100±0.0
<b>Aislado muestra 2</b>	86.66±0.0	73.33±0.0	82.22±0.01

El agua es un ingrediente universal en los sistemas alimentarios. Cuando el agua se agrega en exceso a un alimento, una parte de esta interactúa con los sólidos. Como lo muestra la tabla No 11 el aislado de la muestra 1 tiene valores de 97 a 100% de absorción de agua, mientras que el aislado de la muestra 2 presenta valores de 73-86%, por lo que se ve que los dos frijoles difieren en la capacidad de absorción de agua, ya que, como se ha comentado anteriormente, el frijol 1 tiene menor cantidad de proteína, y, por lo tanto, mayor cantidad de carbohidratos, los cuales ayudan a retener una cantidad de agua mayor. La capacidad para absorber agua es considerada una propiedad funcional de las proteínas, fundamental en alimentos viscosos tales como sopas, salsas, masas y productos horneados, productos donde se requiere una buena interacción proteína-agua.

Tjahjadi *et al.*(1988), mencionan que la capacidad de absorción de agua de los aislados proteicos puede ser afectada por factores conformacionales y del medio ambiente o del entorno donde este el aislado; cambios conformacionales

en las moléculas de proteínas pueden exponer los aminoácidos internos en la estructura, haciendo que puedan interaccionar con el agua. Las globulinas, fracción importante en el perfil proteico del frijol negro, son las proteínas que mas aminoácidos polares tiene, los cuales tienen una gran afinidad por el agua, produciéndose un incremento en la capacidad para absorber agua. En el anexo VII se muestra una fotografía (número 9) de la prueba realizada.

**La capacidad de absorción de grasa (CAG)** de las proteínas es una importante propiedad funcional de estos polímeros debido a que aumenta o mejora la retención del sabor y el gusto de muchos productos alimenticios donde son usados como ingredientes (Paredes-López, 1991).

**Tabla No. 12 Capacidad de absorción de grasa**  $\frac{mL \text{ de aceite absorbido}}{100 \text{ g de muestra}}$

<b>Tubo</b>	<b>1 (1mL)</b>	<b>2 (2mL)</b>	<b>3 (3mL)</b>
<b>Aislado muestra 1</b>	33.33±0.0	66.66±0.00	100±0.0
<b>Aislado muestra 2</b>	33.33±0.1	66.66±0.01	93.33±0.0

En la tabla No 12 se presentan los resultados de la capacidad de absorción de aceite y los resultados son muy parecidos, ya que los valores van desde 33-100%. En virtud de que el frijol común tiene una cantidad importante de aminoácidos hidrofobicos como la leucina, isoleucina, valina y triptófano, lo cual hace que sea muy afín al aceite. La capacidad de absorción de grasa (CAG) es producto del atrapamiento físico de las grasas por parte de las proteínas, a través de la formación de micelas. La CAG está determinada por la estructura de la matriz proteica, la disposición de los aminoácidos dentro de la estructura proteica, lo cual a su vez determina las interacciones hidrofobicas proteína-grasa, por el tipo de grasa y por la presencia de almidones (Kinsella, 1976). Esta capacidad de las proteínas de enlazar lípidos es muy importante para la formulación de productos para freír y para la retención de los sabores. Así mismo, disminuye el desarrollo de la rancidez oxidativa y en consecuencia aumenta la estabilidad durante el almacenamiento (Sathe, *et al.*, 2002).

En el anexo VII se muestra una fotografía (número 10) de la prueba realizada.

**Las espumas** son sistemas bifásicos en los cuales las burbujas de gas (por lo general aire) están rodeadas por una fase líquida continua, formando películas delgadas. La capacidad de las proteínas para formar espumas depende de su facilidad para migrar hacia la interfase aire-agua y formar una película interfacial cohesiva que sea capaz de atrapar y retener el aire. Esta película debe ser lo bastante fuerte para retener la humedad y soportar esfuerzos mecánicos (Phillips, *et al.*, 1990).

**Tabla No. 13 Formación y estabilidad de la espuma**

<b>Concentrado</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>V inicial (mL)</b>	<b>V final (mL)</b>	<b>FORMACIÓN <math>\Delta V</math> (mL)</b>	<b>ESTABILIDAD V después de 30 min</b>
<b>1</b>	2	100	90±0.58	10±0.58	94±0.58
<b>2</b>	2	100	94±0.58	6±0.58	96±0.58

Se puede observar que la proteína del frijol tiene una actividad espumante ya que el volumen aumenta de 6-10 mL, manteniéndose de 4-6 mL de ésta por más de 30 minutos.

Este resultado es congruente con lo reportado por Enwere *et al.*, (1998) quienes afirman que las harinas de frijol se caracterizan por tener buenas propiedades espumantes y por generar una espuma estable. También Susheelamma y Rao, citados por los autores antes nombrados, reportaron excelentes capacidades espumantes de proteínas globulares de frijoles negros (*Phaseolus mungo*).

La capacidad espumante y su estabilidad dependen de dos conjuntos distintos de propiedades moleculares. Mientras que la capacidad espumante se ve afectada por la velocidad de adsorción, la flexibilidad y la hidrofobia, la estabilidad depende de las propiedades reológicas de la película proteica. La proteína de la mayor parte de los alimentos está formada por mezclas de diversas especies moleculares; por ello, sus propiedades espumantes son determinadas por la interacción entre los componentes proteicos en la interfase (Fennema, 2000).

La formación de espuma es una propiedad funcional de las proteínas utilizada en la elaboración de diversos productos de panificación, repostería y confitería, así como también en la preparación de postres y alimentos congelados. Desde el punto de vista de su aplicación en tecnología de alimentos se requiere no solamente que la proteína sea capaz de formar un volumen grande de espuma, sino que ésta sea estable, es decir que no tienda a colapsar en corto tiempo. En el anexo VII se muestra una fotografía (número 11) de la prueba realizada.

**La capacidad emulsificante y la estabilidad de la emulsión** son parámetros que se confunden muy fácilmente; por eso Hermansson (1979), establece claramente la diferencia entre estos dos términos; menciona que "La capacidad emulsificante denota la cantidad máxima de aceite que puede ser emulsificada por una dispersión de proteína; mientras que la estabilidad de la emulsión se refiere a la capacidad de una emulsión, con una cierta composición, para permanecer sin cambios.

**Tabla No. 14. Índice de la actividad emulsificante (IAE) y la estabilidad de la emulsión (RC) del concentrado proveniente de la muestra 1.**

<b>CONCENTRADO FRIJOL 1</b>				
	<b>pH 4</b>		<b>pH 7</b>	
<b>Concentración proteica (%)</b>	<b>IAE (m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>RC (%)*</b>	<b>IAE (m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>RC (%)*</b>
0.2	26.05±0.19	63.33±0.01	28.71±0.14	76.67±0.16
0.5	10.32±0.03	83.33±0.07	11.00±0.09	80.00±0.3
0.8	7.17±0.02	96.67±0.07	7.07±0.02	76.67±0.07
1	5.56±0.02	80.00±0.05	5.57±0.01	73.33±0.08
2	2.65±0.02	76.67±0.15	2.80±0.25	36.67±0.11
3	1.80±0.02	73.33±0.06	1.88±0.01	0.00±0.00
4	1.41±0.03	83.33±0.26	1.41±0.01	6.67±0.04
5	1.13±0.02	60.00±0.01	1.16±0.01	26.67±0.15

\* RC = resistencia a la coalescencia

**Tabla No. 15. Índice de la actividad emulsificante (IAE) y la estabilidad de la emulsión (RC) del concentrado proveniente de la muestra 2.**

<b>CONCENTRADO FRIJOL 2</b>				
	<b>pH 4</b>		<b>pH 7</b>	
<b>Concentración proteica (%)</b>	<b>IAE (m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>RC (%)*</b>	<b>IAE (m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>RC (%)*</b>
0.2	23.59±0.02	100.00±0.00	28.29±0.03	96.67±0.13
0.5	9.62±0.01	100.00±0.00	11.41±0.02	83.33±0.11
0.8	5.90±0.02	100.00±0.00	7.07±0.01	83.33±0.03
1	4.84±0.03	100.00±0.00	5.73±0.04	100.00±0.00
2	2.36±0.01	150.00±0.00	2.85±0.02	100.00±0.00
3	1.60±0.01	166.67±0.58	1.88±0.02	0.00±0.00
4	1.22±0.01	150.00±0.00	1.42±0.02	0.00±0.00
5	0.99±0.03	150.00±0.00	1.15±0.01	0.00±0.00

\* RC = resistencia a la coalescencia

La estructura rígida y compacta que dan las globulinas a la proteína, la cual es la principal fracción proteica de *Phaseolus vulgaris*, no las hace proteínas con buen potencial para funciones superficiales como las emulsificantes (Sathe, et al., 2002). Sin embargo como lo muestran las tablas número 14 y 15 los resultados señalan que los concentrados provenientes de muestras crudas del frijol fueron capaces de desarrollar este tipo de propiedades.

Sin importar el pH (4 o 7) a la que este la muestra el índice de actividad emulsificante de las muestras presentan sus valores más altos (29-23 m<sup>2</sup>/g) a concentración proteica baja (0.2%), mientras que sus valores más bajos (aproximadamente de 1 m<sup>2</sup>/g) se presentan a concentraciones proteicas de 5%. Las proteínas pueden actuar como emulsificantes porque reducen la tensión interfacial entre el agua y el aceite, formando películas firmes en la interfase lo cual evita la unión de las partículas de aceite (Kanteewicz, et al., 1987). Por lo que podemos decir que el frijol es un buen emulsificante y atribuir a que contiene mayor cantidad de aminoácidos no polares.

En general, los resultados muestran que los dos concentrados pueden tener aplicaciones como agentes emulsificantes, sobre todo en emulsiones alimentarias donde el pH se acerque a la neutralidad. También se pueden utilizar a pH 4, aunque para lograrlo se requiere una mayor concentración de proteína. La capacidad emulsificante de la proteína del frijol *Phaseolus vulgaris* decrece al aumentar la concentración de proteína, por lo que en la industria alimentaria se puede utilizar como un agente emulsificante sin agregar tanto concentrado. En cambio la resistencia a la coalescencia es mayor a pH ácido que en la neutralidad, presentando sus valores más altos en la muestra número 2 con porcentajes mayores al 100%. En el anexo VII se muestra una fotografía (número 12) de la prueba realizada.

Una de las propiedades funcionales más importantes de las proteínas es su **capacidad para formar geles** después del calentamiento. El mecanismo de la gelificación es complejo donde hay un primer paso que consiste en una desnaturalización de las proteínas, para después favorecer la interacción proteína-proteína que da origen a la estructura tridimensional ordenada en la que quedan retenidos el agua, los glóbulos de grasa y otras sustancias de bajo peso molecular.

**Tabla No 16. Comportamiento de la Gelificación proteica de las dos muestras de frijol**

Concentración de proteína/Ph	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20%	-	+	-	-	-	-	-	-	-

+ Presencia de un gel

- No hay presencia de un gel

Como se puede observar en la tabla número 16 que el pH del medio y la concentración de proteína influyen en la formación del gel, como también en su comportamiento reológico. Los dos concentrados proteícos de frijol gelifican a una concentración de 20 gramos de proteína en 100 mililitros de agua a un pH de 3.

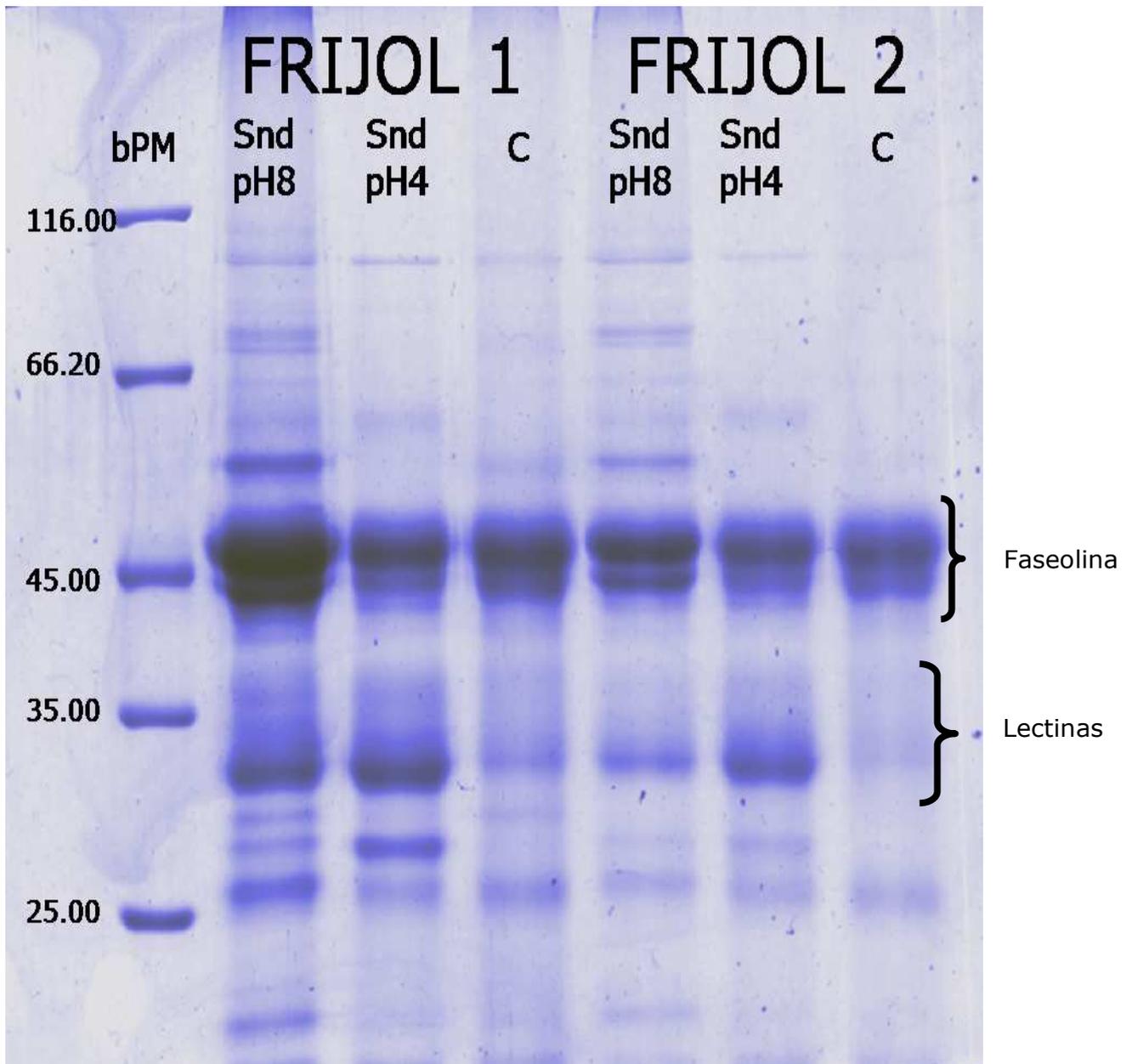
El color de este gel es rosa pálido y se le considera un gel fuerte, ya que al invertir el tubo el gel no se desliza. En el anexo IV se muestra una fotografía (número 13) de la prueba realizada.

La transformación que se da de una suspensión a un gel ocurre debido a la desnaturalización por calor de la proteína. Esta transformación es irreversible debido a que las estructuras secundarias y terciarias son rotas. La actual formación del gel ocurre gracias a la agregación controlada de las moléculas de las proteínas después del enfriamiento, por lo cual éste no se puede hacer muy rápido, ya que el gel que se forma sería débil, razón por la cual el enfriamiento es a temperatura ambiente. Otros factores que afecta el proceso de gelificación es la concentración de proteína. En este caso se necesitan concentraciones altas del concentrado obtenido, lo que limitaría su aplicación a la industria.

## **8.6 PERFIL ELECTROFORETICO DE LOS AISLADOS PROTEICOS DEL FRIJOL**

Se realizó el análisis electroforético en tres pasos importantes de la extracción:

1. Al sobrenadante de la harina a pH 8, el cual corresponde a la máxima solubilidad de las proteínas en agua. **(snd pH 8)**
2. Al sobrenadante de la harina a pH 4, el cual corresponde a la mínima solubilidad de las proteínas en agua. **(snd pH 4)**
3. Al concentrado obtenido. **(C)**



**Figura No. 8 SDS-PAGE de los aislados proteicos obtenidos del frijol negro (*Phaseolus vulgaris*)**

En el gel se puede ver que entre la suspensión que está a pH 8 y la de pH 4 se pierden proteínas de 55 a 100 KDa.

El análisis electroforético en los diferentes pasos en el aislamiento de las proteínas de la semilla de frijol negro crudo mostró por lo menos quince proteínas (globulinas y albúminas representan el 60% y 40%, respectivamente, de la proteína total) entre 19 y 110 KDa de peso molecular.

Destacan las de pesos moleculares 19 KDa, 26 KDa, 32 KDa y 46 KDa, que son constantes en los tres pasos de la extracción.

Las proteínas más abundantes son las que corresponden a un peso molecular aproximado de 46 KDa (Ramirez, *et al.*, 1991). La principal proteína de la semilla es la faseolina, que es una glicoproteína, por lo que probablemente su función principal sea de reserva. Esta proteína está constituida por una familia de polipéptidos (S, B, T, C y H), cuyos pesos moleculares oscilan entre 45 y 58 KDa. Estudios hechos en la Universidad de Wisconsin indicaron que la faseolina era el factor que determinaba tanto la cantidad como la calidad de la proteína de la semilla, por lo que podemos decir que nuestro concentrado es de buena calidad proteínicamente hablando (CIAT, 1989).

Además de la faseolina, en los cotiledones se han descrito otras proteínas con diferentes pesos moleculares y cuya función no aparece tan claramente asociada a la fuente de reserva; ellas se han descrito a las lectinas, de 32 KDa, las cuales parecen estar relacionadas con características de calidad pobre. Si observamos esta banda a lo largo del proceso aparece muy intensa en la harina del frijol a pH 8 y a pH4, pero en el concentrado aparece menos clara. Dentro de las lectinas se encuentran el Grupo PHA, las cuales tienen un peso molecular de 22 a 33 KDa.

## 9. POSIBLES APLICACIONES DEL PRODUCTO

*"Deja que la comida sea tu medicina y que la medicina sea tu comida"*  
Hipócrates.

Hoy en día hay una gran demanda de productos que contribuyen al mantenimiento o a la mejora del estado de salud y/o reducción del riesgo de padecer una enfermedad. Algunos usos del frijol común como planta medicinal se encuentran en el anexo VI.

Los concentrados proteicos obtenidos en este trabajo contienen componentes biológicamente activos que tienen efectos benéficos para la salud.

Según las propiedades estudiadas, a continuación se presentan algunas propuestas de productos a los que se puede integrar el concentrado, tomando como base la información de Riego Gómez (1988).

- a) Barra de cereales, ya que éstos, en combinación con el concentrado proteico del frijol, son una fuente alternativa de isoflavonoides y fibra, que pueden ayudar a controlar los niveles de colesterol en sangre, además de ser proteína de buena calidad ya que se complementan.
- b) Bebidas carbonatadas agregando el concentrado proteico de frijol negro como un aditivo emulsionante para proporcionar turbidez a la bebida o como agente espumante en las bebidas que están conformadas por cerveza con gaseosa como la shandy o ginger beer y en los refrescos de cola.
- c) La mayonesa se define como una emulsión semisólida del tipo aceite/agua. El concentrado proteico de frijol negro funciona como emulsificante, reduciendo los riesgos de coalescencia formando una película interfacial de rigidez conveniente.

- d) La margarina es una dispersión de gotas de una fase acuosa en una fase semisólida que contiene aceite líquido y cristales de grasa sólidos. Desde el punto de vista de coloides químicos, el factor básico en su fabricación es la fácil emulsificación de la fase acuosa y no la estabilidad de la emulsión, por lo que el concentrado proteico del frijol funcionaría como emulsificante.
  
- e) Un helado es un producto lácteo, formado por una espuma parcialmente congelada, con 40 a 50% de aire ocluido, por lo que el concentrado proteico de frijol negro puede actuar como espumante dando un mayor porcentaje de aire y así obtener un rendimiento mayor o como emulsificante para estabilizar la mezcla inicial para adsorberse en las interfaces de los glóbulos grasos y formar enlaces con el agua y las proteínas y como núcleo de cristalización.
  
- f) Como aditivo en emulsiones cárnicas, las cuales desempeñan un papel fundamental en la fabricación de embutidos. El concentrado proteico de frijol negro contribuirá a mejorar la textura y la estabilidad de la emulsión.
  
- g) En masas de panadería y pastelería, las cuales son sistemas de una complejidad coloidal considerable ya que antes de pasar al horno, la masa está formada conjuntamente por una emulsión, una espuma y una dispersión coloidal. El concentrado proteico del frijol negro actuaría como un emulsificante, evitando el efecto antiespumante de las grasas sobre el retículo proteico, asegurando la emulsificación de las grasas y permitiendo mantener una cierta humedad en el pan o en el pastel. Puede funcionar también como un aditivo espumante para proporcionarle una buena aireación a la masa y como constituyente del retículo tridimensional responsable del desarrollo de un pastel durante su permanencia en el horno.

- h) Polvo para preparar bebidas tipo café capuchino instantáneo como espumante para dar una espuma más compacta, persistente y con mayor densidad sin la necesidad de disolverlo en leche.
- i) Colorante natural ya que contiene antocianinas, pigmentos hidrosolubles con características de glucósidos, responsables de los colores rojo, anaranjado, azul y púrpura de las uvas, manzanas y fresas (Badui, 1993).
- j) En polvo para preparar imitación de gelatina de sabor mezclando el concentrado proteico del frijol negro con la carragenina obteniendo variedad de texturas y una calidad proteica mayor que si solo se usara la goma natural industrial.

Es importante que estos alimentos sean biodiseñados individualmente para satisfacer las especificaciones de sabor, textura y nutrición del producto final.

## **10. CONCLUSIONES**

1. Se diseñó un proceso para obtener a la proteína del frijol del cual:
  - a) Se obtuvo un mayor rendimiento a partir de frijol crudo que del cocido.
  - b) Se logró una concentración proteica del frijol crudo partiendo de 20-23% en el grano hasta el 67-70%, por lo que se puede hablar de que se obtuvo un concentrado.
2. De acuerdo al estudio de las propiedades funcionales los aislados proteicos:
  - a) Presentan capacidad para absorber agua y aceite
  - b) Pueden tener aplicaciones como agentes espumantes y emulsificantes dentro de la industria alimentaria.
  - c) Forman un gel de color rosa pálido a una concentración proteica de 20% y a pH 3.
3. Las principales proteínas presentes son la faseolina y las lectinas con peso molecular de 46 y 32 KDa respectivamente.
4. Los concentrados contienen polifenoles los cuales se encuentran en cantidades bajas, lo que permitirá el valor agregado por ser un nutracéutico.
5. El aislado proteico gracias a sus características y propiedades puede ser aplicado en productos de la industria alimentaria.

## **11. PERSPECTIVAS**

1. Estudiar los factores antinutricios en el concentrado para ver si arrastró alguna toxina, ya que recordemos que el frijol se usó crudo.
2. Probar experimentalmente cómo se comporta el concentrado de frijol negro en un sistema alimentario.
3. Desarrollar alimentos funcionales con el concentrado de frijol negro.
4. Encontrar una forma de obtener una mayor pureza de la proteína de frijol negro.
5. Evaluar el efecto en el metabolismo de glucosa.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. A.O.A.C (2000). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist, Washington, D.C., pp 1-2, 33-34.
2. Ahmedna, M., Prinyawiwatkul, W., y Rao, R.M. (1999). Solubilized wheat protein isolate: functional properties and potential food applications. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1340-1345.
3. Aplicación de preparados enzimáticos en las diferentes industrias alimentarias [en línea, disponible en [http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_quimicas\\_y\\_farmaceuticas/schmidth02/parte07/01.html](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/schmidth02/parte07/01.html); Internet; accesado el 14 de enero de 2010].
4. Apostolatos, G. (1984). Protein isolate rich in methionine from the edible dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Food Technol.* 19, 233-237.
5. Badui Dergal S. (1993). Química de alimentos. 3a edición Alhambra Mexicana. México D.F. pp. 464
6. Badui Dergal, S. (1999). Química de los Alimentos. Pearson Educación. Addison Wesley Longman de México, México. pp. 648
7. Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Ray SD, Sen CK y Preuss HG (2002). Cellular Protection with Proanthocyanidins Derived from Seeds. *Ann N Y Acad Sci* 957, 260-270.
8. Base de datos estadísticos. Disponible en <http://www.fao.org> Consultado el 26 de octubre de 2009
9. Bello, A.B. and Okezie, B. O. (1989) Effect of extraction conditions on the extractability of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L) DC) proteins. *J. Food Sci.* 54(6), 1989-1990.
10. Blanco, A. y Bressani, R., (1991). Biodisponibilidad de aminoácidos en el frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Arch Latinoamer Nutr.* 41, 38-51.
11. Bors, W., Heller, W., Michael, C. y Saran, M. (1990) Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol*, 186, 343-355.
12. Brasseur, T., (1989) Propriétés anti-inflammatoires de flavonoides. *J Pharmacol Bel*, 44, 235-241.

13. Cadena Santos V., (2006). Tesis: Nopal (*Opuntia spp.*) Estudio para valorar la utilización de residuos de cladodio como fuente de fibra dietética y antioxidantes. Facultad de Química. Universidad Autónoma de México.
14. Campell MK. (1995) Biochemistry. 2 ed. Saunders College Publishing, p. 522
15. Cartaya, O. y Reynaldo, I. (2001). Optimización de la obtención del Complejo de Bioflavonoides del Limón. Revista Cubana de Química. IV Congreso Internacional de Química. XIII. 2-5
16. Chau, C.F., Cheung, P.C.K., y Wong, Y.S. (1997). Functional properties of protein concentrates from three chinese indigenous legume seeds . J. Agric. Food Chem. 45, 2500-2503.
17. Chávez Planes M.A., Díaz Brito J., Pérez U, Delfín J, (1990) Temas de enzimología T-2 Facultad de Biología Universidad de la Habana. 31-41
18. Cheftel J.C., Cuq J.L. y Lorient, D. (1989) *Proteínas Alimentarias*. Capítulo 4. Ed Acribia. Zaragoza, España 107-139
19. Cherry, J.P. (1981). Protein functionality in foods. American Chemical Society, Washington, D.C 149-176.
20. CIAT (1989) Progreso en la investigación y producción del frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) Advances in bean (*Phaseolus vulgaris L.*) research and production Cali Colombia p. 462  
[http://books.google.com.mx/books?id=w\\_9nA\\_-kO2IC&printsec=frontcover&dq=inauthor:%22Ciat%22&cd=1#v=onepage&q=&f=false](http://books.google.com.mx/books?id=w_9nA_-kO2IC&printsec=frontcover&dq=inauthor:%22Ciat%22&cd=1#v=onepage&q=&f=false) INTERNET Consultado el 14 de enero 2010
21. Coffman, C., García, V. (1977) Functional properties and amino acid content of a protein isolate from mung bean flour. J. Food Technol. 12, 473-484
22. Dagorn-Scaviner, C. Gueguen, J. and Lefebvre J. (1987). Emulsifying properties of pea globulins as related to their adsorption behaviors. Journal Food Science. 52 (2), 335-340

23. Debouck D. y Hidalgo R. (1985) Morfología de la planta del frijol común. En: López, M., Fernandez, F. y van Schoonhoven, A. (Eds.) Frijol: investigación y producción, CIAT, Cali, Colombia, 7-47.
24. Dickinson, E., Stainsby, G., (1988) Advances in Food Emulsions and Foams. Elsevier Applied Science, Londres y Nueva York 796 pp.
25. Dubois, M. K. A. Gillies, J. K. Hamilton, P. A. Rebers y F. Smith. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chem. 28, 350-356.
26. El-Sayed, M.M. (1997). Use of plant protein isolates in processed cheese. Nahrung 41, 91-95.
27. Enwere N.J., Mc Walters K.H. y Phillips R.D. (1998) Effect of processing on some properties of frijol seed, protein, starch, flour and akara. Int. J. Food Sci. Nutr. 49: 365-373.
28. Esparza Rivera J. R., Meza Velásquez F., Meza Velásquez M., Meza Velásquez J. A. (2005) Efecto de la adición de proteína de soya en la textura de un pan blanco Agrofaz: publicación semestral de investigación científica, pp 775-782
29. Espinosa Alonso G., Lygin A., Widholm J., Paredes López O. (2006) Polifenoles (compuestos nutraceuticos) en frijol Silvestre de México. Cinvestav-IPN Guanajuato Gto. México.
30. FAO/WHO/UNU. (1985) Energy and Protein Requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. World Health Organization Technical Report Series 724. Geneve,
31. Fennema O (2000) Química de los Alimentos. 2ª ed. Acribia. Zaragoza, España. pp 433-469
32. Flores E. J. (2004) Breve historia de la comida mexicana. De bolsillo, México. 31-32
33. Garfin, D.E. (1990) One dimensional gel electrophoresis. Methods Enzymol. 182, 425-441.
34. Gonçalves, N., Vioque, J., Clemente, A., Sánchez-Vioque, R., Bautista, J., y Millán, F. (1997). Obtención y caracterización de aislados proteicos de colza . Grasas y Aceites 48, 282-289.

35. González, A., A. Wong, A. Delgado, R. Papa, y P. Gepts. (2005). Assessment of inter simple sequence repeat markers to differentiate sympatric wild and domesticated populations of common bean. *Crop Sci.* 45, 606-615.
36. Gracia Nava, M. A. Cuantificación de Fenoles y Flavonoides Totales en Extractos Naturales Universidad Autónoma de Querétaro.
37. Henn, R.L., y Netto, F.M. (1998). Biochemical characterization and enzymatic hydrolysis of different commercial soybean protein isolates. *J. Agric. Food Chem.* (46) 3009-3015.
38. Hermansson, A.M. (1979). Methods of studying functional characteristics of vegetable proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56 (3), 272-279
39. Hettiarachchy, N.S., Griffin, V.K. y Gnanasambandam, R. (1996). Preparation and functional properties of a protein isolate from defatted wheat germ. *Cereal Chem.* 73, 364-367.
40. Hirano, R., Sasamoto, W., Matsumoto, A., Itakura, H., Igarashi, O. y Kondo, K. (2001) Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *Internal Medicine I, Nacional Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama, Japan. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, (47) 357-362.
41. Hollman, P.C.H y Katan, M.B. (1998) Absorption, Metabolism, and Bioavailability of Flavonoids. En: *Flavonoids in Health and Disease*. Rice Evans, C. y Parker, L. (Eds.). Marcel Dekker, INC. New York, 22, 483-522
42. ITESM (2004) Diagnóstico nacional y estatal sobre problemática y perspectivas de la producción de frijol en los estados de Sinaloa y Zacatecas, FAO-SAGARPA, México. 81 p.
43. Jonhson, E. A. y Brekke, C. J. (1983) Functional properties of acylated pea proteins isolates *J. Food. Sc.* 48, 722-725.
44. Kanterewicz, R.J. Elizalde, B.E. Pilosof, A.M.R. y Bartholomai, G.B. (1987). Water-oil absorption index (WOAI): A simple method for predicting the emulsifying capacity of food proteins. *J. Food. Sci.* 52(5): 1381-1383.

45. Kaur, M. y Singh, N.. (2007) A comparison between the properties of seed, starch, flour and protein separated from chemically hardened and normal kidney beans. *J. Sci. Food and Agric*, 87, 729-737.
46. Kawada N., Seki S., Inoue M. y Kurobi. T. (1998) Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin and N-acetylcysteine, on the function of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology*, 27, 1265-1274.
47. Kinsella, J.E. (1976) Functional properties of proteins in food: A survey. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 7, 219-279
48. Lawal O. S. (2004). Composition, physicochemical properties and retrogradation characteristics of native, oxidized, acetylated and acid-thinned new cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) starch. *Food Chem* 87, 205-218
49. Lin Long-Ze, Harnly J., Pastro-Corrales M., Luthria D. (2008). The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Food Chem.* 107, 399-410.
50. Lin, C.S., y Zayas, J.F. (1987). Functionality of defatted corn germ proteins in a model system: fat binding capacity and water retention . *J. Food Sci.* 52, 1308-1311.
51. Lissant, K. J., (1984). *Emulsions and Emulsion Technology*. Vol. VI. Marcel Dekker, Inc. Nueva York E.U. 1-69
52. López Luengo M.T., (2002) Flavonoides <http://www.dfarmacia.com> consultado el 16/02/2010. *OFFARM* 21:4 108-114 Elsevier
53. Mahajan, A., y Dua, S. (1995). Functional properties of rapeseed protein isolates . *J. Food Sci. Technol.* 32, 162-165.
54. Marquez, U. L. y Lajolo Franco M. (1981) Composition and digestibility of albumin, globulins, and glutelins from *Phaseolus vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.* 29, 1068-1074
55. Martínez, E.N. y Añón, M.C. (1996). Composition and structural characterization of *Amaranthus* protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study . *J. Agric. Food Chem.* 44, 2523-2530.
56. Matthaus, B, (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds *J. Agric. Food Ch.* 12, 3444-3452.

57. Mimouni, B., Raymond, A.M., Merle-Desnoyers, A.M., Azanza, J.L., y Ducastaing, A. (1994). Combined acid deamidation and enzymatic hydrolysis for improvement of the functional properties of wheat gluten. *J. Cereal Sci.* 21, 153-165.
58. Morales de León, J. Vázquez Mata, N. Torres, N., Gil Zenteno, L. y Bressani, R. (2007) Preparation and Characterization of Protein Isolate from Fresh and Hardened Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *J. Food Sci.* 72, 96-102
59. Moreno Casasola, P. (2004) Vida y Obra de Granos y Semillas. Fondo de Cultura Económica. México, 207 pp
60. Naczek, M., Rubin, L. J., y Shahidi, F. (1986). Functional properties and phytate content of pea protein preparations. *J. Food Sci.* 51, 1245-1247.
61. Nagano, T., Fukuda, Y., y Akasaka, T. (1996). Dynamic viscoelastic study on the gelation properties of b-conglycinin-rich and glycinin-rich soybean protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3484-3488.
62. Noriega L., Tovar A.R., Gonzalez-Granillo M., Hernandez-Pando R., Escalante B., Santillán-Doherty, P., Torres, N. (2007) Pancreatic insulin secretion in rats fed a soy protein high fat diet depends on the interaction between the amino acid pattern and isoflavones. *J. Biol Chem.* 13, 282-302.
63. Owen, R.F. (1985) Characteristics for Gel Formation and Gel Structure. *Food Chem. Department of Food Sci. University of Wisconsin Ed. 2da.* p.p. 292-294.
64. Paredes, L.O., F. Guevara L., y L.A. Bello P. (2006). Los alimentos mágicos de las culturas mesoamericanas. Fondo de Cultura Económica, México, 205 pp.
65. Paredes-López, O., Ordorica, C. y Olivares, M.R. (1991). Chickpea protein isolates: Physicochemical, functional and nutritional characterization. *J. Food Sci.* 56 (3) 726-729.
66. Pearce, K.F. y Kinsella, J.E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.* 26 (3) 716-723

67. Peres, W., Tuñón, M.J., Collado, P.S., Herrmann, S., Marroni, N. y González-Gallego, J. (2000) The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol*, (33) 742-750
68. Phillips, L.G., German, J.B., O'Neill, T.E., Foeceding, E.A., Harwalkar, V.R., Kilara, A., Lewis, B.A., Mangino, M.E., Morr, C.V., Regenstein, J.M., Smith, D.M. y Kinsella, J.E. (1990). Standarized procedure for measuring foaming properties of three proteins, A Collaborative Study. *J. Food Sci.* 55 (5) 1441-1444.
69. Quinn J. R. y Paton D., (1979) A practical measurement of water hydration capacity of proteins materials. *Cereal Chem.* 56 (1), 38-40
70. Ramirez H, Calderón A., Roca W.M. (1991) Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) pp. 826-840
71. Riego Martín, M. B. y Gómez Herrera, C. (1988) Química-física interfacial de emulsificantes alimentarios. Parte II. Mecanismos de estabilización de emulsiones. *Emulsiones en alimentos elaborados. Grasas y Aceites* (39), 111-118.
72. Romero, P.E. (1993) *Los retos de la soberanía alimentaria en México* Tomo I, Instituto de Investigaciones Económicas, UNAM-Juan Pablos, México pp. 53-67.
73. Rosales-Serna, R., J. A. Acosta-Gallegos, R. P. Durán-Durán, H. Guillén-Andrade, P. Pérez-Herrera, G. Esquivel-Esquivel, y J. S. Muruaga-Martínez. (2003). Diversidad genética del germoplasma mejorado de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México. *Agric. Téc. Méx.* (29), 11-24.
74. Rosales-Serna, R., S. Hernández-Delgado, M. González-Paz, J. A. Acosta-Gallegos, and N. Mayek-Pérez. (2005). Genetic relationships and diversity revealed by AFLP markers in Mexican common bean bred cultivars. *Crop Sci.* (45), 1951-1957.
75. Saeed, M., y Cheryan, M. (1988). Sunflower protein concentrates and isolates low in polyphenols and phytate . *J. Food Sci.* (53) 1127-1131.

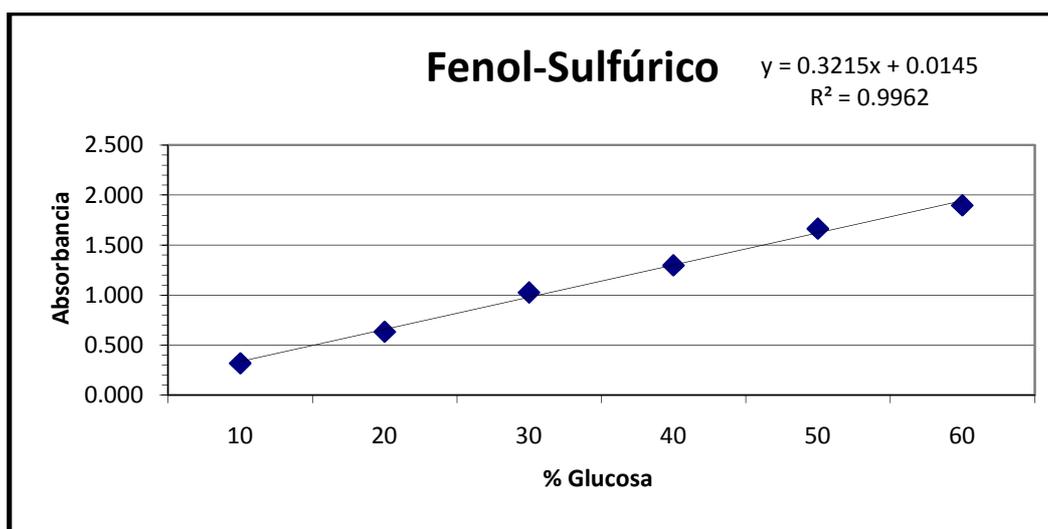
- 76.Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Vioque, J., Bautista, J. y Millán, F. (1999). Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chem.* (64) 237-243.
- 77.Saskia A.B.E., Van Accker y Bast, A.A.L.T. (1998) Structural Aspects of Antioxidant Activity of Flavonoids. En: *Flavonoids in health and Disease*. Ed Marcel Dekker, INC. New York, (9) 221-251
- 78.Sathe, S. K., Hamaker, B. R. Sze-Tao, K. W. C., Venkatachalam, M. (2002) Isolation, purification, and biochemical characterization of a novel water soluble protein from Inca peanut (*Plukenetia volubilis* L.). *J. Agric Food Chem.* 50 (17) 4906-4908.
- 79.Saura C., F., (1998) Effect of condensed tannins in the analysis of dietary fiber in carbo-pods *J. Food Chem.* (46) 4303-4306.
- 80.Sautier, C., Flament, C., Doucet, C., y Suquet, J.P. (1986). Effects of eight dietary proteins and their amino acid contents on serum, hepatic and fecal steroids in the rat. *Nutr. Rep. Internat* (34) 1051-1061.
- 81.Schägger H. y Von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. *Analyt. Biochem.* 166, 368-379.
- 82.Serrano J. y Goñi I. (2004) Papel del frijol *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca *Arch. Lat. Nut.* (54) 1 36-44.
- 83.Siddiq M., Ravi R., Harte J.B., y Dolan K.D. (2010) Physical and functional characteristics of selected dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. *Food Sci. and Tech.* (43) 232-237.
- 84.Sosulski, F.W. y col. (1976) Functional properties of rapessed flours, concentrates and isolates. *J. Food Sci.* (41) p.p. 1349-1352.
- 85.Tjahjadi, C., Lin, S., y Breene, W.M. (1988). Isolation and characterization of adzuki bean (*Vigna angularis* cv Takara) proteins. *J. Food Sci.* (5) 1438-1443.
- 86.Torres N., Palacios-González B., Noriega-López L., Tovar-Palacio, A. (2006). Índice glicémico, índice insulinémico y carga glicémica de

- bebidas de soya con un contenido bajo y alto en hidratos de carbono. Revista de investigación clínica (58) 487-497.
87. Torres-Torres, N. y Tovar Palacio, A. (2009) La historia del uso de la soya en México, su valor nutricional y su efecto en la salud. Salud Pública México (51) 246-254.
88. Vargas Vázquez P. *et al.* (2000) Evaluación de la resistencia a la roya (*Uromyces appendiculatus*) en poblaciones silvestres y cultivadas de frijol, mediante el empleo de marcadores genéticos moleculares Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Texcoco México
89. Vega M. y Bontoux, L., Aplicaciones alimentarias de las nuevas tecnologías en polisacáridos, Institute Prospective Technological Studies, <http://ipts.jrc.ec.europa.eu/home/report/spanish/articles/vol20/FOO1S206.htm> Consultado el 10 de enero del 2010.
90. Voysest, V. O. (2000). Mejoramiento Genético del Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Legado de Variedades de América Latina 1930–1999. CIAT, Cali, Colombia. 195 p.
91. Vrijsen R, Everaert L y Boeté A. (1988) Antiviral activity of flavones and potentiation by ascorbate. J Gen Virol 69, 1749-1751
92. Wagner, J.R., y Añon, M.C. (1990). Influence of denaturation, hydrophobicity and sulfhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolate . J. Food Sci. 55, 765-770.
93. Wanasundara P.K.J.P.D., y Shahid, F. (1997). Functional properties of acylated flax protein isolate . J. Agric. Food Chem. 45, 2431-2441.
94. Xu, L., y Diosady, L.L (1994). Functional properties of chinese rapeseed protein isolates . J. Food Sci. 59, 1127-1130.
95. Zhou, B., He, Z., Yu, H., y Mukherjee, K.D. (1990). Protein from double-zero rapeseed. J. Agric. Food Chem. 38, 690-694.

## 13. ANEXOS

### I. MEDICIÓN DE LA CANTIDAD DE CARBOHIDRATOS TOTALES

#### CURVA PATRÓN DEL MÉTODO COLORIMÉTRICO DE FENOL-SULFÚRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES EXPRESADO EN % DE GLUCOSA.

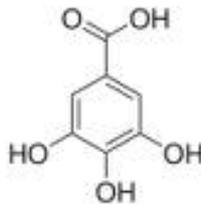


### II. TRATAMIENTO DEL ALMIDÓN QUE SE OBTIENE COMO RESIDUO EN LA EXTRACCIÓN DE LA PROTEÍNA

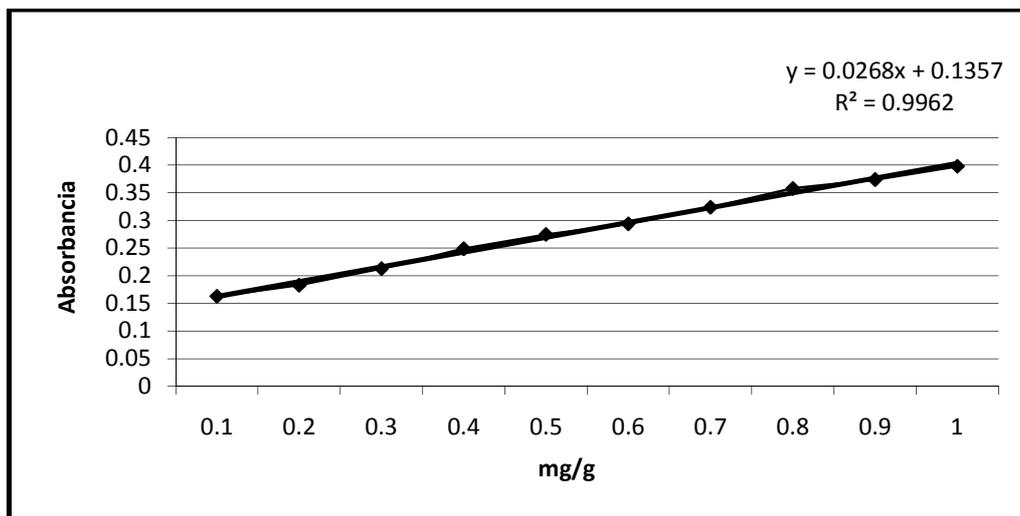
En las leguminosas el almidón y otros polisacáridos (fibra dietética) son los principales constituyentes, con cantidades pequeñas pero significativas de oligosacáridos (Bravo et al., 1998) por lo que el principal residuo obtenido en la obtención del aislado es una masa hinchada lo que podemos pensar que sea el almidón del frijol. La propuesta teórica para que este residuo sea aprovechado es ajustar el pH a 7, secar la muestra y molerla para posteriormente usarla en la industria panadera o como aditivo gelificante en sopas o en alimentos para bebés. Sin embargo esto se tendría que estudiar más meticulosamente ya que puede presentar tendencia a formar texturas granulosas y apelmazadas en el producto final.

### III. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

El ácido gálico es un ácido orgánico también conocido como 3,4,5-trihidroxibenzoico, que se encuentra en las agallas, en las hojas de té, en la corteza de roble y otras plantas. La fórmula química es  $C_6H_2(OH)_3COOH$ . Y su estructura es:

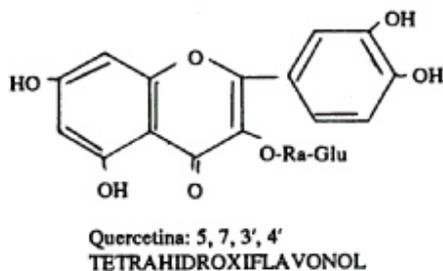


#### CURVA PATRÓN DE ÁCIDO GÁLICO PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES (MÉTODO FOLIN-CIICALTEU, 1989).

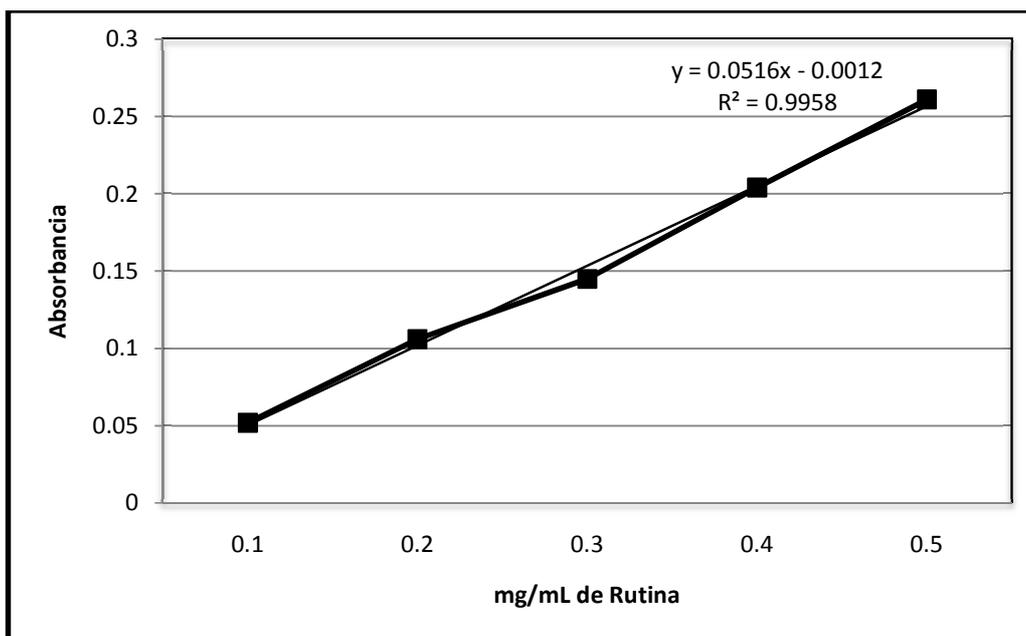


#### IV. DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES

La rutina es también un glucósido flavonoide encontrado en algunas plantas, conocido como rutósido, quercetin-3-rutinósido y sophorina. Su estructura es:



#### CURVA PATRÓN DE RUTINA PARA LA DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES (FARMACOPEA, 1989)



## **V. FUNDAMENTO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE LA ELECTROFORESIS**

### **Fundamento**

La electroforesis es un método analítico en el cual se separan biomoléculas según su tamaño y su carga eléctrica utilizando una corriente eléctrica controlada.

El fundamento consiste en una migración de los solutos iónicos hacia el cátodo (el polo negativo) o ánodo (el polo positivo) bajo la influencia de un campo eléctrico.

El desplazamiento de las moléculas también depende de la carga, el peso molecular y la estructura tridimensional de la molécula, así como de la fricción que se presente con el solvente.

Los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, son versátiles y sirven como medio de separación de mezclas complejas. Además son útiles para determinar el peso molecular y el punto isoeléctrico de las proteínas.

La velocidad de migración electroforética depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga/peso), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel. Es de suma importancia no aplicar un voltaje muy alto para no generar un calor excesivo, ni un voltaje muy bajo por que el resultado sería una separación mínima de los componentes (Chávez, et. al., 1990).

El pH influye sobre la velocidad de migración de las moléculas ya que la carga neta de la partícula está dada por el pH del medio y puede ser modificada por la interacción con pequeñas partículas de iones u otras macromoléculas (Nochumson, 1985).

Los métodos electroforéticos zonales son útiles para lograr la separación de componentes de mezclas complejas. Cantidades pequeñas de la solución de proteína se aplican en un soporte (que generalmente son polímeros que forman un gel poroso como el almidón, la celulosa o la poliacrilamida) que se impregna con una solución tampón.

La poliacrilamida es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Además, forma geles

transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua y que permite una buena visualización de bandas durante tiempo prolongado (Campell, 1995).

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización del monómero acrilamida  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$  y del monómero entrecruzador  $N,N'$ -metilen-bis-acrilamida  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ . La polimerización se inicia con la formación de radicales libres del monómero, que se producen por radicales libres de oxígeno, por la acción de los iones persulfato (Chávez, 1990). Las aminas terciarias como el  $N,N,N,N'$ -tetametilen-diamina (TEMED) se emplean como catalizadores de esta reacción, ya que causan la formación de radicales libres persulfato (Garfin, 1990).

La polimerización se lleva a cabo con la adición del persulfato de amonio (agente oxidante) y TEMED como agente reductor el cuál acelera la polimerización.

La electroforesis con SDS es un método excelente para identificar y monitorear proteínas durante un proceso de purificación., así como para determinar el peso molecular de éstas comparado con un patrón que se conocen como marcadores.

La estructura del detergente SDS es  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2 = \text{SO}_3^- \text{Na}^+$ ; donde el anión se une a las proteínas por absorción no específica. El SDS desnaturaliza por completo a las proteínas y rompe las interacciones no covalentes (estructura terciaria y cuaternaria).

Las proteínas que tienen color natural como la mioglobina, hemoglobina, ferritina y citocromo C, pueden ser observadas directamente en los geles, sin embargo la visualización de la mayoría requiere el uso de un colorante para poder ser vistas.

Una rápida tinción, distinción y fijación son esenciales los colorantes de origen natural. La tinción con Coomassie puede emplearse para la determinación de proteínas cuando éstas son abundantes (Schägger H, et. al.,1987).

## Preparación de muestras

### Bradford

- Dilución 1:3000

	MUESTRA 1		MUESTRA 2	
Muestra	Abs	$\mu\text{g/mL}$	Abs	$\mu\text{g/mL}$
Sobrenadante pH 8	_____	_____	0.540	9.705
Sobrenadante pH 4	0.111	1.782	_____	_____
Aislado	0.110	1.764	0.127	2.078

- Dilución 1:3500

	MUESTRA 1		MUESTRA 2	
Muestra	Abs	$\mu\text{g/mL}$	Abs	$\mu\text{g/mL}$
Sobrenadante pH 8	0.290	5.088	_____	_____
Sobrenadante pH 4	_____	_____	0.158	2.650
Aislado	_____	_____	_____	_____

Las muestras se prepararon de la siguiente manera:

Muestra	$\mu\text{L}$ de proteína (0.015 $\text{mg/mL}$ )	Agua destilada ( $\mu\text{L}$ )
Sobrenadante pH 8 F1	6.73	14.27
Sobrenadante pH 4 F1	22.44	0
Concentrado F1	22.67	0
Sobrenadante pH 8 F2	4.12	16.88
Sobrenadante pH 4 F2	12.94	8.06
Concentrado F2	19.25	1.75

## **VI. USOS DEL FRIJOL COMO PLANTA MEDICINAL**

Algunos usos del fríjol común como planta medicinal y que pueden ser estudiados utilizando un concentrado proteico son:

- a) Auxiliar para mantener las concentraciones de glucosa, insulina, triglicéridos y colesterol en los intervalos adecuados.
- b) Acción diurética e hipoglicémica, para emplearse de manera complementaria en afecciones renales, cardíacas, reumáticas y diabetes.
- c) En enfermedades reumáticas ya que se recomienda como un acuarético obteniendo una capacidad anti-discrática.
- d) Como antitumoral. De acuerdo a la compilación realizada por Duke y col. (2002) es antiagregante, antiangiogénico, anticáncer, antidepresivo, antileucemia, antimelanómico, antiprostático, apoptósico, cardioprotector, estrogénico, hepatoprotector, quimiopreventivo, hipocolesteronémico, hipotensivo, lipolítico, lipotrópico, además de antibacteriano, antidiabetes, diurético, antiviral y mutagénico, antipirético, carminativo, depurativo, diaforético, emenagogo, fungicida y resolverte, emoliente e hipoglicémico.
- e) Anti-cancerígeno. El frijol común, al igual que el de soya contienen cantidades importantes de isoflavonoides.

Por todo esto el consumo del frijol, especialmente de la proteína y sus fenoles aumenta su importancia no solo por su valor nutricional, si no porque podrían dar un valor agregado con usos de medicina tradicional.

## VII. FOTOS DEL PROCESO Y DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES ESTUDIADAS



**FOTO No. 1**

Muestra 1 frijol negro  
(*Phaseolus vulgaris*)

**FOTO No. 2**

Muestra 2 frijol negro  
(*Phaseolus vulgaris*)



**FOTO No. 3**

Harina de frijol negro (*Phaseolus  
vulgaris*) tamizada





**FOTO No. 4**

Suspensión a pH 8  
Solubilización de la proteína

**FOTO No. 5**

Residuo de la suspensión a pH 8  
posterior a la centrifugación.



**FOTO No. 6**

Solución a pH 4  
Precipitación de la proteína

**FOTO No. 7**

Concentrado húmedo



**FOTO No. 8**

Concentrado seco

PRODUCTO FINAL

**FOTO No. 9**

Capacidad de absorción de agua





**FOTO No. 10**

Capacidad de absorción de aceite

**FOTO No. 11**

Espumado



**FOTO No. 12**

Emulsificación

**FOTO No. 13**

Gelificación

pH 3

Concentración proteica 20%

