



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Obtención de un concentrado de proteína de frijol negro,
caracterización fisicoquímica y efecto en la concentración
de insulina y expresión génica de SREBP-1**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

María Alejandra Quiñones Peña



TUTOR: Dra. Amelia Farrés González-Saravia AÑO:2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Reconocimiento y agradecimiento

Al Instituto de Ciencia y Tecnología de DF por el financiamiento al Proyecto PICS 08-33: "Producción y aprovechamiento de un aislado de frijol como alimento funcional con influencia en la expresión génica que afecta lipogénesis". Responsable del proyecto: Dra. Amanda Gálvez Mariscal. Facultad de Química UNAM. En colaboración con la Dra. Amelia Farrés, Dra. Maricarmen Quirazco, Dr. Armando Tovar y Dra. Nimbe Torres,

Al CONACYT, por el apoyo económico otorgado por medio de la beca al No. de Registro CONACYT 223397.

Agradecimientos especiales

Al Ing. Víctor Téllez por la variedad del frijol Negro 8025 del INIFAP de Celaya.

A la empresa ENMEX S.A. de C.V., por la donación de las enzimas Licuamil 1200 y Glucozyme 400.

Al Dr. Leobardo Serrano y al Jefe de Laboratorio Mario Alberto Caro, por su apoyo en la realización del proyecto en la planta piloto del IBT.

Al Dr. Alberto Tecante y a la Técnico Académico I.A. Mariana Ramírez Gilly, por su apoyo en para realizar los procesos de secado.

A la Dra. Carolina Peña por su apoyo y asesoría en todos los trámites y en el laboratorio 312 en general.

A los Doctores Nimbe Torres y Armando Tovar, por su apoyo, comprensión y cooperación.

Al Departamento de Alimentos y biotecnología, en especial a la Profesora Lucia Cornejo, la Profesora Lourdes Osnaya y el Profesor Agustin Reyo por su apoyo para la realización de las pruebas de proteína Kjeldhal en el laboratorio del A del cuarto piso en la Facultad.

Al Jurado de esta tesis que la revisó y ayudo a mejorarla para dar un resultado de calidad.

Al Posgrado en Ciencias Químicas por sus oportunos avisos y su clara información

Agradecimientos

A Dios, por darme esta oportunidad.

A mi familia, por acompañarme y apoyarme en cada momento, gracias por TODO, los amo.

A Miguel de la Torre, por caminar juntos en casi todo este proceso, en las buenas y mojadadas.

A mis amigas, por seguir ahí, aunque casi no las vi durante esta etapa.

A la Dra. Amelia Farrés, por su apoyo, comprensión y paciencia en cada momento.

A la Dra. Amanda Gálvez, por todo lo que aprendí al tratarla en este tiempo.

A la Dra. Maricarmen, por su apoyo en mis dudas en la experimentación.

A la M. en C. Mirna González por su apoyo en la realización del concentrado en planta piloto y todas sus asesorías durante las diversas partes del desarrollo del proceso, sabes que nada hubiera sido igual sin ti.

A mis compañeros Eduardo Tovar, Sonia, Claudia Márquez, Rosa Isela Huidobro y Guillermo Ordaz, por todas la aventuras juntos y todo lo que aprendí de cada uno de ustedes en este tiempo.

A todos los miembros del Lab 312 del conjunto E de la Facultad, por su apoyo y comprensión en los días de trabajo.

A todos los integrantes del Departamento de Fisiología de la Nutrición del INNCSZ, por su apoyo, comprensión, risas y opiniones para la realización de este proyecto y para mejorar día a día.

A los miembros de PUAL que me echaron la mano en diferentes momentos.

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología en edificio E de la Facultad de Química de la UNAM, así como en el Departamento de Fisiología de la Nutrición del INNCMSZ.

| | |
|---|----|
| Índice general | |
| Índice de figuras | 2 |
| Índice de tablas | 2 |
| Índice de Anexos | 2 |
| Resumen | 3 |
| Abstract | 4 |
| Introducción | 5 |
| Antecedentes..... | 6 |
| El frijol en México..... | 6 |
| Taxonomía, morfología y características del frijol | 7 |
| Composición química | 8 |
| <i>Composición de proteínas</i> | 9 |
| <i>Factores nutricionales del Frijol</i> | 11 |
| Sustancias antifisiológicas..... | 11 |
| Sustancias fisiológicas | 13 |
| <i>Solubilidad de las proteínas</i> | 14 |
| Papel de las proteínas dietarias | 14 |
| Estudios sobre los efectos del consumo de frijol..... | 20 |
| Justificación | 22 |
| Objetivos..... | 22 |
| Objetivo general..... | 22 |
| Objetivos específicos..... | 22 |
| Metodología..... | 23 |
| Obtención del concentrado de proteína de frijol negro cocido..... | 23 |
| Caracterización fisicoquímica..... | 26 |
| Evaluación del efecto de la proteína de frijol en un modelo animal | 28 |
| <i>Efecto de la ingesta de proteína de frijol en el crecimiento</i> | 28 |
| <i>Efecto de la ingesta de la proteína de frijol sobre las concentraciones de glucosa, colesterol, triglicéridos, insulina y glucagon</i> | 29 |
| <i>Efecto de la ingesta de la proteína de frijol sobre la expresión génica de SREBP-1 y FAS en hígado</i> | 30 |
| Resultados..... | 31 |
| Obtención del concentrado de proteína de frijol negro cocido | 31 |
| Caracterización fisicoquímica..... | 40 |
| Evaluación del efecto de la proteína de frijol en un modelo animal | 43 |
| <i>Efecto de la ingesta de proteína de frijol en el crecimiento.</i> | 44 |
| <i>Efecto de la ingesta de la proteína de frijol sobre las concentraciones de glucosa, colesterol, triglicéridos, insulina y glucagon</i> | 46 |
| <i>Efecto de la ingesta de la proteína de frijol sobre la expresión génica de SREBP-1 y FAS en hígado</i> | 50 |
| Conclusiones | 52 |
| Perspectivas | 53 |
| Bibliografía..... | 54 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 Morfología de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (Moreno, 1996) | 8 |
| Figura 2 Aminogramas de concentrado de proteína de frijol y de soya..... | 11 |
| Figura 3 Efecto del consumo de hidratos de carbono en humanos y modelos animales..... | 16 |
| Figura 4 Posible efecto del consumo de proteína de diferente fuente sobre la relación Insulina/glucagon | 16 |
| Figura 5 Esquema de acción de SREBP-1 | 18 |
| Figura 6 Efecto de la proteína de soya en Insulina y SREBP-1 mRNA..... | 19 |
| Figura 7 Ganancia de peso de animales alimentados con proteína de frijol | 21 |
| Figura 8 Disminución de Glucosa e Insulina por consumo de Frijol | 21 |
| Figura 9 Partículas de la harina de frijol presentes de tamaño mayor a malla 30, después de la molienda. | 31 |
| Figura 10 Electroforesis de las proteínas durante el proceso..... | 37 |
| Figura 11 Solubilidad de la proteína presente en el concentrado de proteína de frijol..... | 41 |
| Figura 12 Absorción de agua y aceite..... | 42 |
| Figura 13 Ganancia de peso de los animales | 45 |
| Figura 14 Curvas de crecimiento de los animales | 45 |
| Figura 15 Comparación del incremento de peso a los 21 días..... | 46 |
| Figura 16 Concentraciones de glucosa en suero de rata | 47 |
| Figura 17 Concentraciones de triglicéridos en suero de rata | 47 |
| Figura 18 Concentraciones de colesterol en suero de rata | 48 |
| Figura 19 Concentraciones de Insulina en suero..... | 49 |
| Figura 20 Concentraciones de Glucagon en suero de rata | 49 |
| Figura 21 Relación Insulina/Glucagon en suero de rata | 50 |
| Figura 22 Expresión de SREBP-1 en hígado de rata | 51 |
| Figura 23 Expresión de FAS en hígado de rata..... | 51 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1 Taxonomía del frijol (Allen, 1981) | 7 |
| Tabla 2 Composición química del Frijol Negro | 9 |
| Tabla 3 Estructura de los flavonoides | 13 |
| Tabla 4 Concentración de proteína en los sobrenadantes con tres lavados sucesivo..... | 32 |
| Tabla 5 Concentración de proteína en los sobrenadantes a diferentes concentraciones de NaCl. 33 | |
| Tabla 6 Concentración de proteína en los sobrenadantes con diferentes procedimientos de adición de NaOH..... | 33 |
| Tabla 7 Concentración de proteína en los sobrenadantes con un solo lavado | 34 |
| Tabla 8 Proceso de extracción en el laboratorio..... | 34 |
| Tabla 9 Proceso de elaboración del concentrado de proteína de frijol en planta piloto | 38 |
| Tabla 10 Dietas experimentales en gramos, base de 100g de dieta..... | 44 |

Índice de Anexos

| | |
|--|----|
| Anexo 1 Análisis proximal de la harina de frijol..... | 57 |
| Anexo 2 Procesos de extracción de proteína..... | 58 |
| Anexo 3 Análisis Físicoquímicos | 67 |
| Anexo 4 Descripción de Sondas | 70 |
| Anexo 5 Consideraciones para el diseño de las dietas | 70 |

Resumen

El frijol es la leguminosa más consumida en México. Aunque se conocen los efectos benéficos sobre el metabolismo humano de otras leguminosas, como de la soya, de la que se sabe que su aislado de proteína produce efectos dislipidémico, del frijol se conoce muy poco sobre sus efectos fisiológicos.

El presente trabajo tiene como objetivo general obtener un concentrado de proteína de frijol negro para conocer sus características fisicoquímicas, su efecto en el crecimiento en ratas, así como en los parámetros bioquímicos hormonales relacionados con lipogénesis.

La metodología para obtener el concentrado fue un proceso de solubilización de proteína en diferentes solventes. La caracterización del aislado se hizo por medio de un análisis proximal empleando métodos oficiales de AOAC. El concentrado de proteína de frijol presentó una composición de 60.92% de proteína, 23.96% de extracto libre de nitrógeno, 0.45% de fibra cruda y 0.12% de lípidos. Las propiedades funcionales evaluadas fueron solubilidad según Popineau *et al* (1988), absorción de agua y la absorción de aceite por la técnica de Quinn & Paton (1979). Se obtuvo una solubilidad máxima menor a 20% en el pH de mayor solubilidad que fue pH12, su capacidad de absorción de agua fue de 1.5mg/g de concentrado y su absorción de aceite de 0.5 mg/g de concentrado. Para evaluar su capacidad antioxidante se cuantificaron flavonoides por el método de Saura (1998) y se encontraron 149.88µg/g de concentrado. La evaluación del crecimiento en ratas se hizo por ganancia de peso de los animales, los parámetros bioquímicos evaluados fueron glucosa en suero por el método de la glucosa oxidasa, las concentraciones de colesterol y triglicéridos se midieron por un método enzimático colorimétrico y las concentraciones de insulina y glucagon en suero se determinaron por el método de Radioinmunoensayo marca Millipore. Y la evaluación de la expresión génica se realizó por medio de PCR-TR para los genes de interés.

En la evaluación del efecto de la proteína de frijol en un modelo animal se observó que la curva de crecimiento de ratas alimentadas con proteína de frijol no presenta diferencia significativa con la curva de crecimiento de las ratas alimentadas con proteína de soya. Con respecto a las concentraciones en suero de glucosa, colesterol, insulina, glucagon, así como la relación insulina/glucagon de ratas alimentadas con proteína de frijol presentan patrones similares al grupo de soya. Para los resultados de triglicéridos en suero basales de ratas alimentadas con proteína de frijol se observa un aumento y una tendencia similar al grupo de soya. Se observó una mayor expresión génica de SREBP-1 para el grupo alimentado con una fuente animal en comparación con el alimentado con proteínas vegetales. En el caso de FAS no se observa una tendencia clara, pero si se distingue que al minuto 60 en los grupos alimentados con proteína vegetal disminuye.

El concentrado de proteína de frijol generado y evaluado presenta características que pueden promover su utilización en productos donde no se busque solubilizar, no se desee una alta absorción de aceite y dándole un valor agregado por los flavonoides. Se debe promover su consumo por sus efectos dislipidémicos, que en general son similares al obtenido con aislado de proteína de soya.

Abstract

Bean is one of the leguminous vegetables most widely consumed in Mexico. However, little is known about its physiological effects, even if the benefits of other leguminosae, like soya bean, on human metabolism have been studied and the dislipidemic effect of protein isolates have been documented.

The aim of the present work is to obtain a protein isolate from black bean to have the raw material to study its physicochemical parameters, to assess its effect on growth in a rat animal model, as well as to study its effect on biochemical parameters related to lipogenesis.

The method to obtain the protein isolate was the solubilization of proteins in different solvents. The proximate composition was obtained following the AOAC standard methods and it was found to have a 60.92% protein, 23.96% nitrogen free extract, 0.45% crude fiber and 0.12% lipids. Its functional properties were also evaluated: solubility, according to Popineau *et al* (1988), water absorption and oil absorption, following the procedure described by Quinn & Paton (1979). The maximum solubility was less than 20% at pH12, 1.5mg water were absorbed per gram of concentrate, while 0.5 mg oil were absorbed per g of concentrate. Flavonoids were assayed according to Saura (1998) and 149.88µg per g of concentrate were found, which leads to the assumption it has an antioxidant capacity. Weight gain was quantified in the experimental lot of rats, as well as serum glucose (by the glucose oxidase method). Cholesterol and triglycerides were assayed enzymatically, coupled to a colorimetric assay. Glucagon and insuline in serum were evaluated by Radio Immuno Assay (Millipore). Gene expression was quantified using RT PCR.

The growth curves indicated that rat feds with bean protein isolate did not show a significant difference compared to rats fed with soybean protein. The serum glucose levels, cholesterol, insulin, glucagon, as well as the ratio insulin/glucagon are also similar between both groups. The triglyceride levels in rats fed with black bean protein there is a slight increase and a similar trend compared to the soya bean fed group. The expression of the SREBP-1 gene was higher in the group fed with animal protein when compared to the vegetable proteins one. There is no clear trend in the analysis of the FAS gene expression, but after 60 minutes its levels are reduced in the group fed with vegetable protein.

The above results indicate that the protein concentrate produced from blackbean shows some features that lead to consider its use in products where no protein solubilization or a high oil absorption is required. The presence of flavonoids would have an aggregate value. Blackbean consumption must be promoted because of its dislipidemic effects, which are similar to those shown by soybean protein isolates.

Introducción

El conocimiento de los mecanismos moleculares de acción de los nutrimentos está permitiendo ahora el utilizarlos como una estrategia para la prevención de diferentes anormalidades metabólicas que aquejan a la población. En las últimas dos décadas se ha desarrollado un gran interés por estudiar la interacción gen-nutrimento. Se han desarrollado dos grandes áreas de la denominada nutrición molecular que son la nutrigenómica y la nutrigenética. La primera estudia el mecanismo a través del cual los nutrimentos regulan la expresión de genes específicos, mientras que la segunda estudia cómo las variantes genéticas de cada individuo afectan la utilización de nutrimentos específicos provenientes de la dieta. Por ejemplo en el grupo de investigación de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Medicas Salvador Zubirán, INNCMSZ, se ha demostrado que la proteína de soya genera diversos beneficios sobre el metabolismo de lípidos y de hidratos de carbono. Se ha demostrado a través de diversos meta-análisis que el consumo de proteína de soya reduce las concentraciones de colesterol total y colesterol LDL. Además se ha demostrado que la ingestión de proteína de soya en animales de experimentación disminuye la acumulación de lípidos en el hígado, aun en modelos de obesidad inducida por dieta o en obesidad genética. También se ha demostrado que el consumo de la proteína de esta leguminosa previene la hiperinsulinemia a corto plazo y a largo plazo. Todos estos hallazgos indican que el consumo de proteína de soya tiene efectos benéficos para individuos obesos con síndrome metabólico. A través de la nutrigenómica se ha podido entender cómo es que el consumo de proteína de soya genera estos beneficios. Los resultados muestran que esta proteína disminuye la expresión del factor de transcripción SREBP-1 (por sus siglas en ingles sterol regulatory element binding protein – 1) , el cual se encarga de regular la expresión de los genes de la síntesis de ácidos grasos como el de la sintasa de los ácidos grasos, FAS (por sus siglas en ingles fatty acid synthase). De esta manera una disminución en la expresión de SREBP-1 se asocia con una disminución en la litogénesis lo que conlleva a una menor acumulación de lípidos particularmente en el hígado lo que ayuda en parte a disminuir la resistencia a la acción de la insulina.

Sin embargo, la leguminosa que se consume en el país en mayor cantidad es el frijol, y no existen en la actualidad estudios que utilicen las herramientas de la nutrigenómica para determinar si la proteína del frijol tiene las mismas propiedades antilipogénicas como las tiene la proteína de soya.

Para poder realizar estos estudios y entender los posibles beneficios del consumo de la proteína del frijol es necesario entender algunos aspectos generales de esta leguminosa como se muestra a continuación.

Antecedentes

El frijol en México

Para México el frijol es uno de los alimentos que reportan una importancia tanto cultural, como alimenticia, ya que “ha sido y sigue siendo ingrediente esencial en la dieta de los indígenas americanos, especialmente las variedades negras y rojas. Representan una de las fuentes proteínicas más importantes para ellos” (Jaffé, 2008). Las familias mexicanas son la unidad social por la cual los individuos conocen y adoptan su patrón de alimentación, lo que genera que dichos patrones sean repetidos por generaciones, lo que da una relevancia cultural a alimentos que se acostumbran en la zona (Quandt, 2002), En este aspecto, el consumo de frijol está arraigado desde hace miles de años y es altamente apreciado por los consumidores, por lo que su aceptación se coloca solo detrás del maíz (Bourges, 2001). Se puede reconocer que en cualquiera de los estratos sociales el frijol se encuentra dentro de los 20 productos de mayor frecuencia de consumo, según los datos del ENIGH (Martínez & Villezca, 2003). Su consumo en la población mexicana no depende del sector social.

Sin embargo, en 1990 cada mexicano comía en promedio 18 kilos 900 gramos de frijol al año mientras que en 2007 se consumieron 11 kilos 900 gramos al año, es decir 7 kilos menos (Carrillo, 2008). Aún con esta disminución del consumo nacional, económicamente el frijol en México es relevante, ya que a nivel internacional México fue el quinto productor de frijol con el 7.0% en 2006, producción que no cubre las necesidades del país, por lo que nuestro país se encuentra como el octavo importador a nivel internacional (FAOSAT, 2008).

Actualmente se cultivan alrededor de 30 variedades distintas de frijol en las diferentes regiones de México, de las cuales se pueden agrupar por preferencia de consumo en:

- Muy preferente: Azufrado, Flor de Junio, Flor de Mayo, Mayocabo, Negro Jamapa y Peruano.
- Preferente: Garbancillo, Manzano, Negro Querétaro, Negro San Luis y Pinto.
- No preferentes: Alubia blanca, Bayo Blanco, Bayo Berrendo, Negro Zacatecas y Ojo de Cabra.

(Marín, 2007)

Taxonomía, morfología y características del frijol

El frijol que se consume en México tiene el nombre científico de *Phaseolus vulgaris L.* Está ubicado taxonómicamente dentro de la familia de las leguminosas y la parte de dicha planta que se conoce como frijol es únicamente la semilla. La clasificación taxonómica se presenta en la tabla 1.

Tabla 1 Taxonomía del frijol (Allen, 1981)

| | |
|------------|------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Subclase | Rosidae |
| Orden | Fabales |
| Familia | Leguminosae |
| Subfamilia | Papilionoideae |
| Tribu | Phaseoleae |
| Subtribu | Phaseolinae |
| Genero | <i>Phaseolus</i> |
| Especie | <i>Vulgaris</i> |

La planta *Phaseolus vulgaris L.* es una angiosperma, que son quienes presentan las semillas encerradas, en este caso se encuentra dentro de una vaina; y esta semilla se ubica como dicotiledónea, por presentar 2 cotiledones. La morfología de la semilla de *Phaseolus vulgaris L.*, como se puede ver en la Figura 1, consiste de una testa que es la cobertura del óvulo, el hilo o hilium, que es la cicatriz que conectaba la semilla con la placenta, un micrópilo que es la apertura que permitirá la absorción de agua en caso de germinación, un lente o rafe que es el lóbulo generado por la soldadura de los tegumentos externos con el folículo y 2 cotiledones quienes absorben y almacenan los nutrimentos (Federacion nacional de cultivadoes de cereales y leguminosas, 2008).

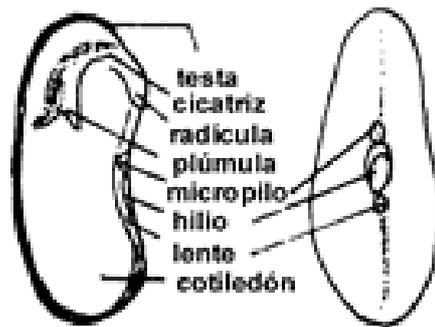


Figura 1 Morfología de *Phaseolus vulgaris* L. (Moreno, 1996)

Composición química

Una de las características principales de las leguminosas es su alto contenido de proteínas (20-30g por 100g) en relación a otros los productos de origen vegetal (Serrano & Goñi, 2004). Dichas proteínas por lo general son deficientes en aminoácidos azufrados, su contenido de hidratos de carbono es variado, pero su almidón por lo general es resistente a la digestión por las enzimas de los seres humanos por lo que su índice glicémico es bajo, y su contenido de lípidos es mínimo (Bourges, 2001).

Las principales diferencias entre las variedades son de tipo organolépticas (color, forma, textura, brillo, etc.), y también existen diferencias en la composición química. Por ejemplo, en el caso de la proteína existen diferencias en la cantidad (Meiners *et al*, 1976). Este autor reporta que el frijol Pinto contiene un 18.8% de proteína y el frijol Red Kidney, 21.5%; en el resto de los macronutrientes, el agua, las cenizas y todos los compuestos también se presentan variaciones. En un estudio en México se encontró que el frijol negro Jamapa se encuentra entre los de mayor concentración de proteína (Jacinto-Hernández *et al*, 1996), con valores que van de 25.1 a 32.2%. Estos rangos dependen de la zona geográfica donde se cultive cada variedad, así como las condiciones de la misma, la época del año, precipitación, etc. Para el caso del frijol hay pocos estudios relacionados con este tema. Por ejemplo, los estudios de Tandon *et al.* (1957), muestran una variación de 20.1 a 27.9% en la proteína total, únicamente variando la localidad de la plantación. No se tienen datos precisos de qué factor influye más en la generación de las variaciones.

Las variedades de frijol en México son muchas: en el banco de Germoplasma del INIFAP se consideran doscientas variedades domesticadas de frijol común. Entre los criterios de clasificación

destaca el color, ya que pasa desde el negro, a distintas tonalidades de café, desde tonos oscuros hasta claros, por medio de algunos rojizos y llegando hasta una coloración blanca. La diversidad en el color es debida a los pigmentos de la semilla, entre los que están las antocianinas, los flavonoides y los ácidos fenólicos.

El presente trabajo se ceñirá solo al frijol negro. Los datos sobre su composición química difieren de acuerdo al lugar de producción. Por ejemplo, a continuación se presentan los datos del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) y la composición específica del frijol negro en México obtenida de las tablas de composición de alimentos mexicanos (Bourges, 1999).

Tabla 2 Composición química del Frijol Negro

| | USDA | Bourges. |
|-------------------------|---------|----------|
| Agua (g) | 10 | 10 |
| Proteína (g) | 17.9322 | 23.7 |
| Grasa, total (g) | 1.1856 | 1.47 |
| Hidratos de Carbono (g) | 51.7959 | 55.44 |
| Azúcares, total (g) | 1.7537 | |
| Fibra, total (g) | 12.597 | 4.39 |

Como se observa, en dicha tabla hay diferencias significativas en la cantidad de proteína que presenta el frijol, no así en el caso de las grasas totales. Para el caso de la fibra es clara la diferencia debido a que en las tablas de composición de alimentos mexicanos se reporta el contenido de fibra cruda, mientras que en los datos de la USDA está el de fibra dietética total. Por esto, y por la separación de los azúcares del total de hidratos de carbono, pareciera que el dato de las tablas de composición de alimentos mexicanos presenta más hidratos de carbono, y menos fibra.

Composición de proteínas

Las proteínas son un conjunto de aminoácidos, formando una cadena por medio de enlaces peptídicos entre el grupo amino de un aminoácido y el grupo carboxilo de otro, cadenas que dan a la proteína lo que se le conoce como estructura primaria. La disposición de la cadena en el espacio, ya sea como espiral u hojas, le da la estructura secundaria. De acuerdo a cómo se pliegue la estructura sobre ella misma debido a las interacciones provocadas por la estructura secundaria, se obtendrá una estructura espacial denominada estructura terciaria, regida por enlaces tipo puentes disulfuro, puentes de hidrógeno, e interacciones hidrofóbicas o hidrofílicas.

Algunos de los términos que permiten describir estas estructuras son globular o fibrilar. Por último la estructura que adopta la unión de varias subunidades en el espacio es la estructura cuaternaria, dicha estructura es la que les permite realizar en algunas proteínas diferentes funciones bioquímicas.

La concentración de proteínas del frijol negro cocido se encuentra en un rango ubicado entre un 17 – 23% y dentro de éstas se han observado que las más abundantes son faseolina, globulina y albumina. Otras proteínas que se encuentran en el frijol negro son los inhibidores de tripsina, lectinas, fosforilasas β , aldosas, lisozimas, triosa fosfato-isomerasas y seroalbúminas bovinas (BSA) (Mc Leester *et al*, 1973).

Se considera que los aminoácidos limitantes de la proteína de cualquier leguminosa y, por consiguiente, del frijol negro, son los aminoácidos azufrados, es decir, Metionina (MET) y Cisteína (CYS). Otros aminoácidos se encuentran por debajo del requerimiento, como se reporta en un estudio en Guatemala (Blanco & Bressani, 1991), quienes al evaluar la biodisponibilidad de los aminoácidos de la proteína del frijol negro comparados con el patrón de aminoácidos de la FAO/OMS, encontraron que los aminoácidos limitantes resultaron ser el Triptófano (TRP), la Valina (VAL) y la Treonina (THR) en este orden, ya que no se cuantificaron los aminoácidos azufrados por que se destruyeron en el proceso de hidrólisis utilizado en dicho experimento; se encontró también que los aminoácidos aromáticos y la Isoleucina rebasan los valores del patrón de referencia, así como también que la Valina resultó ser el aminoácido indispensable de menor disponibilidad biológica, lo que se puede deber al desequilibrio que se presenta, ya que existe un exceso de Isoleucina y Leucina con respecto a la Valina.

Para las muestras a estudiar de frijol y de soya se observa la siguiente porcentaje de aminoácidos, por cien gramos de muestra, obtenida por los laboratorios Silliker, los cuales son similares a los encontrados en la bibliografía.

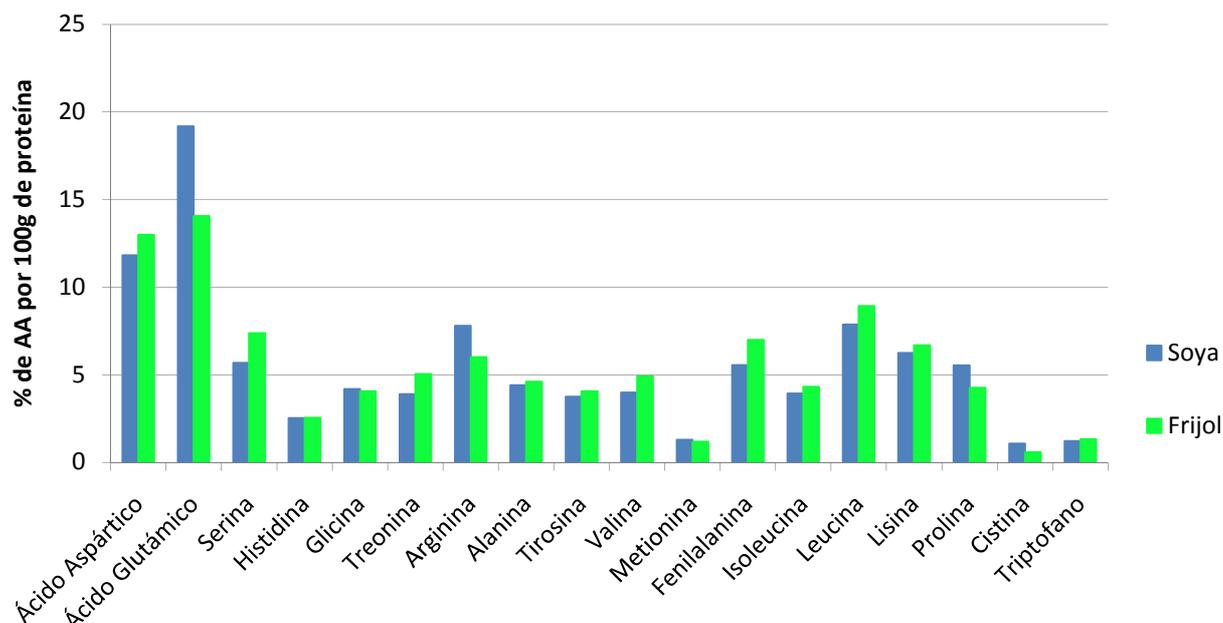


Figura 2 Aminogramas de concentrado de proteína de frijol y de soya

Factores nutricionales del Frijol

Las sustancias que se encuentran en el frijol son muy diversas, por lo que algunas pueden tener un efecto fisiológico positivo o deseado y otras presentan un efecto no deseado o antifisiológico, por lo que se deben eliminar para que el producto sea ingerido sin causar daño.

Sustancias antifisiológicas

El consumo del frijol, así como el de las leguminosas en general, necesita pasar por un proceso térmico que, normalmente, es un proceso de cocción, durante el que se eliminan ciertos factores antifisiológicos que son termolábiles.

Inhibidores de tripsina

Los inhibidores de tripsina son proteínas de bajo peso molecular que al asociarse con la tripsina y la quimiotripsina inhiben su actividad proteolítica, lo que genera múltiples afecciones como inhibición de crecimiento, reducción de la digestibilidad de la proteína, incremento en los requerimientos de los aminoácidos azufrados, entre otras. Pero aunque son estructuras estables a pH entre 1 y 12, con tratamiento térmico mayor a 80°C se logran eliminar (Badui, 1993). Para asegurar su inactivación es necesario aplicar un proceso térmico a 121°C, mayor a los 25 minutos como reportan algunos autores (Chiun-Chuang & Chang, 1988, Jourdan *et al*, 2007). Cuando se presentan valores mayores a 2000 unidades inhibitoras por gramo de muestra se ha observado

que los animales de laboratorio no presentan crecimiento adecuado, e incluso casos en donde no existe crecimiento sino disminución drástica y acelerada del peso, por lo cual son un parámetro importante a evaluar en cualquier dieta de animales de laboratorio.

Lectinas

Las lectinas son glicoproteínas que se enlazan de forma específica a hidratos de carbono o a ciertas proteínas glicociladas las cuales están presentes en los eritrocitos como consecuencia de su unión los aglutinan (Hernández *et al*, 1999). Estas sustancias promueven la formación de coágulos, por lo cual es deseable eliminarlos de la dieta, y esto se puede hacer por medio de un proceso de cocción (Jacinto-Hernández *et al*, 2002).

Otras lectinas presentes en el frijol son las inhibidoras de alfa amilasas, las cuales van a unirse a las alfa amilasas, impidiendo que degraden el almidón en monómeros que entren rápidamente al torrente sanguíneo, y cuando están presentes elevadas cantidades se genera molestia gástrica ya que no se hidroliza el almidón en el intestino y se fermenta de manera considerable en el recto, lo que genera un efecto excesivo de flatulencia o hasta diarrea. (Hernández *et al*, 1999). Estas lectinas se inactivan o pierden parte de su capacidad de inhibición por medio del tratamiento térmico.

Factores de flatulencia

Los oligosacáridos llamados rafinosa y estaquiosa generan flatulencias. Su consumo pasa casi inadvertido por el estómago, hasta llegar al intestino, donde son fermentados por la flora, lo cual es incómodo pero no genera un problema a la salud del individuo. Estos factores disminuyen en forma considerable en los frijoles, principalmente gracias al tratamiento acuoso y la cocción (Belmar & Nava, 2009), conocidos en México como el remojo que se les da previamente y el proceso de cocción que llevan como alimento.

Taninos

Los Taninos son compuestos fenólicos de peso molecular variable que se encuentran principalmente en las plantas, son compuestos capaces de asociarse y precipitar con las proteínas mediante interacciones hidrofóbicas y por puentes de hidrógeno; así como reducir la biodisponibilidad de vitaminas y minerales (Del Pino & Lalojo, 2003), En el caso de alimentación en animales se ha observado disminuciones en el crecimiento cuando el consumo es muy elevado (Torres-Acosta *et al*, 1996). Para la eliminación de estos compuestos no se aplican técnicas

especiales, ya que la mayoría se encuentran en la vaina, la cual no se ocupa en consumo humano.

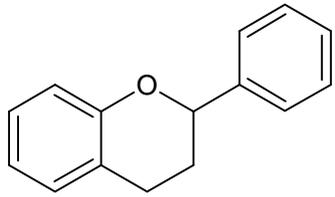
Sustancias fisiológicas

En el frijol negro se encuentran algunos compuestos que generan una acción protectora para los humanos, como se mencionan a continuación.

Flavonoides

Los Flavonoides son productos naturales que presentan una estructura base C6-C3-C6, la cual se presenta a continuación.

Tabla 3 Estructura de los flavonoides

| Descripción | Estructura base de los Flavonoides |
|---|--|
| <p style="text-align: center;">C6-C3-C6</p> <p>El benzopirano que contiene la parte de C6-C3 y el O característico y la posterior unión del benceno C6, que dependiendo de su lugar de unión generara diferentes nombres.</p> |  |

Se encuentran como pigmentos principalmente en vegetales y protegen de los agentes oxidantes. Debido a su estructura química, que presenta diversos grupos hidroxi-fenólicos y su capacidad de quelación de metales de transición, se les considera como agentes antioxidantes; su capacidad protectora ante radicales libres se debe a su estructura, protegiendo principalmente de los grupos hidroxilo y superóxido. Los Flavonoides se clasifican por su estructura, dependiendo de la unión del ciclo aromático al benzopirano en 3 grandes grupos: flavonoides, isoflavonas y neoflavonoides (Grotewold, 2006). El frijol presenta principalmente los flavonoles Quercetina y Kaemferol (Díaz-Batalla *et al*, 2006).

Fibra

La fibra dietaria es un conjunto de polisacáridos, que no se absorben en el tracto digestivo, y son fermentados por el intestino. Se subdivide en soluble e insoluble, conocida también como fibra cruda y algunos ejemplos de la fibra dietaria son la celulosa, lignina, las gomas y los mucilagos. Su consumo presenta beneficios ya que mejora la calidad de las heces, controla la velocidad del tránsito intestinal, produce ácidos grasos de cadena corta y promueve el buen desarrollo de la flora intestinal (Valencia & Román, 2004).

Solubilidad de las proteínas

Las proteínas se clasifican de diversas maneras de acuerdo a las características a considerar. Con respecto a su solubilidad la clasificación más aceptada hasta nuestros días es la clasificación de Osborne, quien desde el siglo pasado las clasificó según los solventes en los que observó la solubilización, generando los siguientes grupos:

Albúminas: Proteínas solubles en agua y soluciones salinas diluidas exclusivamente.

Globulinas: Proteínas solubles en soluciones salinas exclusivamente.

Glutelinas: Proteínas solubles en ácidos y bases exclusivamente.

Prolaminas: Proteínas solubles en soluciones con 70-80% de etanol exclusivamente.

Posteriormente se ha reconocido que esta clasificación no actúa de forma exclusiva, si no de forma mayoritaria, ya que existe preferencia de las proteínas para su solubilización pero no se limita por completo su solubilidad en otros solvente.

Una vez que se extraen las proteínas de la materia prima, dependiendo de la cantidad de proteína que presente en porcentaje el producto, se puede considerar un aislado o concentrado proteico, se estipula por lo general que un aislado proteico es un producto con una concentración mínima del 90% de proteína en base seca y un concentrado presenta concentraciones menores, por lo general alrededor de 70% de proteína en base seca (Vega, 2004).

Papel de las proteínas dietarias

El ser humano consume proteínas en su dieta, conocidas como proteínas dietarias, las cuales están en los alimentos, se hidrolizan en el intestino por proteasas liberando aminoácidos y péptidos que son absorbidos por los enterocitos. Los aminoácidos tienen diferentes destinos metabólicos, como ser oxidados para generar energía, para la formación de nuevas proteínas o la formación de compuestos nitrogenados. En el momento en que los aminoácidos se encuentran en bajas cantidades el cuerpo mismo sintetiza algunos de ellos ya que el cuerpo humano no es capaz de sintetizar los 20 aminoácidos que ocupa en la formación de proteínas. Por esta razón los aminoácidos se dividen en dispensables e indispensables, los dispensables son Ácido aspártico, Ácido glutámico, Alanina, Asparagina, Arginina, Cisteína, Glicina, Glutamina, Prolina, Serina y Tirosina, y los indispensables o que el cuerpo humano no puede sintetizar por sí mismo a partir de otros compuestos son Fenilalanina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Treonina, Triptofano, Valina e Histidina.

A diferencia de los lípidos e hidratos de carbono, la estructura fundamental de los aminoácidos presenta Nitrógeno, el cual debe ser eliminado durante su oxidación como urea; otro de los papeles de las proteínas es como fuente de Nitrógeno para la síntesis de compuestos nitrogenados, como en la síntesis de bases púricas y pirimídicas. El papel principal de los aminoácidos en el ser humano es la síntesis de proteínas.

Las funciones de las proteínas que el mismo cuerpo genera son muy diversas, debido a que sus estructuras son muy variables. En general se les conoce por su aporte como elementos estructurales en los diferentes órganos del ser humano, pero una gran parte de las proteínas en el cuerpo son enzimas, las cuales permiten o facilitan reacciones biológicas como catalizadores. Aparte de esta función existen otras funciones importantes de las proteínas en el organismo como son la contracción muscular, el transporte de oxígeno u otros elementos, receptores de hormonas, etc. Cabe mencionar que la función de la proteína no tiene que ser una, ya que la misma proteína de membrana, que da estructura, puede ser una enzima. (Develin, 2004)

El estudio de las proteínas en el cuerpo humano ha permitido conocer que intervienen en prácticamente todos los procesos metabólicos y, en años más recientes, se ha observado que existen proteínas que generan o reciben señales, transformando la información de las condiciones del medio en señales que pueden activar o reprimir genes. Un ejemplo de estos estudios está relacionado con el receptor de insulina, que reconoce las concentraciones circulantes de insulina en el medio, con lo cual genera una señal, al interior de la célula para generar una respuesta específica. (Jimenez & Merchant, 2003).

Efectos del consumo de proteína de soya en la lipogénesis

El consumo de un alimento tiene diversos efectos según su composición en macronutrientes. Al ingerirse un alimento con una cantidad de hidratos de carbono, se eleva la glucosa en sangre, lo que genera un aumento de insulina para permitir el paso de glucosa a la célula, pero cada fuente de carbohidratos produce diferentes grados de elevación de los niveles de insulina, lo cual se representa en la figura 3.



Figura 3 Efecto del consumo de hidratos de carbono en humanos y modelos animales

No se conoce exactamente qué es lo que pasa con el consumo de las proteínas. Hasta el momento se propone que el consumo de proteínas, dependiendo de los aminoácidos que la conforman, que se genera un cambio en la secreción de insulina y glucagon, modificando la relación insulina/glucagon, lo que influye en la regulación de la expresión de ciertos factores de transcripción, esenciales para el control del metabolismo de lípidos e hidratos de carbono.

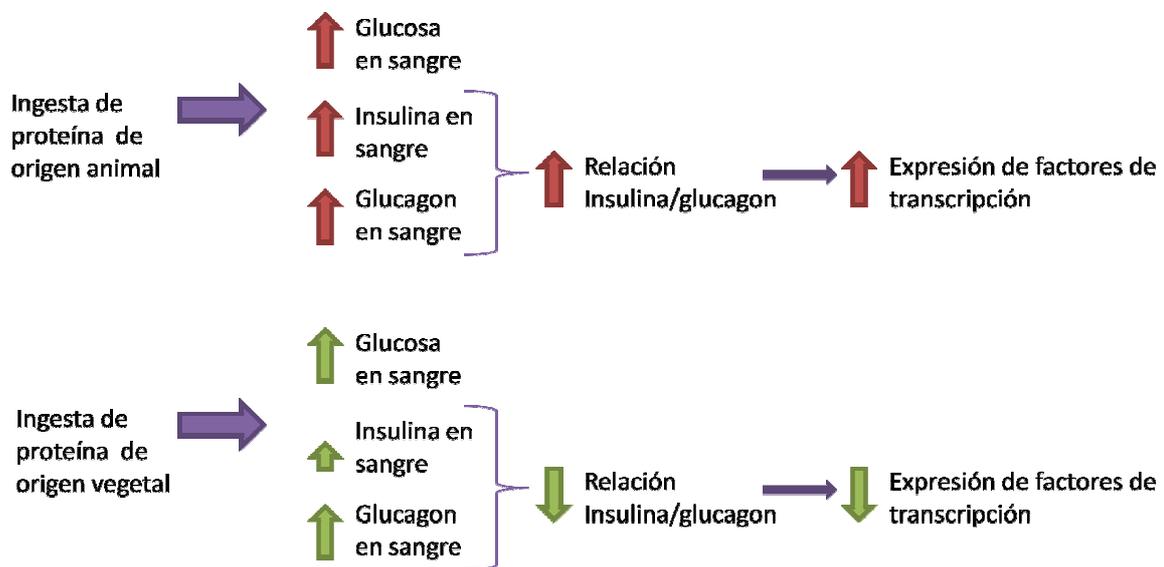


Figura 4 Posible efecto del consumo de proteína de diferente fuente sobre la relación Insulina/glucagon

La proteína de leguminosas más estudiada es la proteína de soya. En términos metabólicos, una de las líneas de investigación ha sido su efecto sobre la lipogénesis, principalmente sobre el factor de transcripción SREBP-1. Este forma parte de un familia de 3 factores de transcripción que tienen su efecto en la regulación de componentes lipídicos del organismo, ya que controlan la expresión de enzimas necesarias para generar la síntesis de los ácidos grasos, los fosfolípidos, los triglicéridos y el colesterol. Uno de los miembros de la familia es SREBP-2 que regula principalmente la expresión de genes de la síntesis de colesterol; otro miembro de la familia es SREBP-1a que controla tanto a genes de la síntesis de ácidos grasos, como de colesterol, pero que por lo general su expresión es muy reducida. El tercer miembro de esta familia es SREBP-1c,

conocido comúnmente como SREBP-1 que presenta un efecto sobre genes de la síntesis de ácidos grasos. La insulina regula los niveles de SREBP-1c a dos niveles, primeramente a nivel transcripcional la insulina estimula la transcripción del gen SREBP-1c a través de una vía de señalización que involucra a la Proteína Cinasa C (PKC) y al factor de transcripción LXR. Se ha demostrado que existen elementos de respuesta en el gen de SREBP-1c para LXR. Por otro lado se ha demostrado que el glucagón reprime la expresión del gen de SREBP-1c . El segundo nivel es a nivel de procesamiento de la proteína SREBP-1c. SREBP-1c se encuentra anclada en la membrana del retículo endoplásmico (RE), para su procesamiento se requiere que la insulina al interactuar con su receptor active su vía de señalización fosforilando a la proteína INSIG2a. El papel de esta proteína es la de mantener a SREBP-1 en el RE. Cuando INSIG2a se fosforila, la proteína SCAP (por sus siglas en inglés SREBP cleavage activating protein, es decir proteína anclada de activación de SREBP) interactúa con SREBP-1 y la escolta para que viaje al aparato de golgi en donde es activada proteolíticamente por medio de las proteasas S1P y S2P. Como consecuencia, se libera a el citoplasma el fragmento amino terminal de la SREBP-1, el cual se transloca a el interior del núcleo funcionando como factor de transcripción. SREBP-1c se une a las regiones promotoras de genes que contengan los elementos de respuesta para este factor de transcripción. Dentro de estos genes se encuentran los genes lipogénicos ACC (Acetil Co-Carboxilasa), FAS, Citrato Oleasa, entre otros. Además, estimula la expresión de algunos genes de la glucólisis, como la Glucocinasa y la Piruvatocinasa. Esto se esquematiza en la figura 5 (Shimano, 2001)

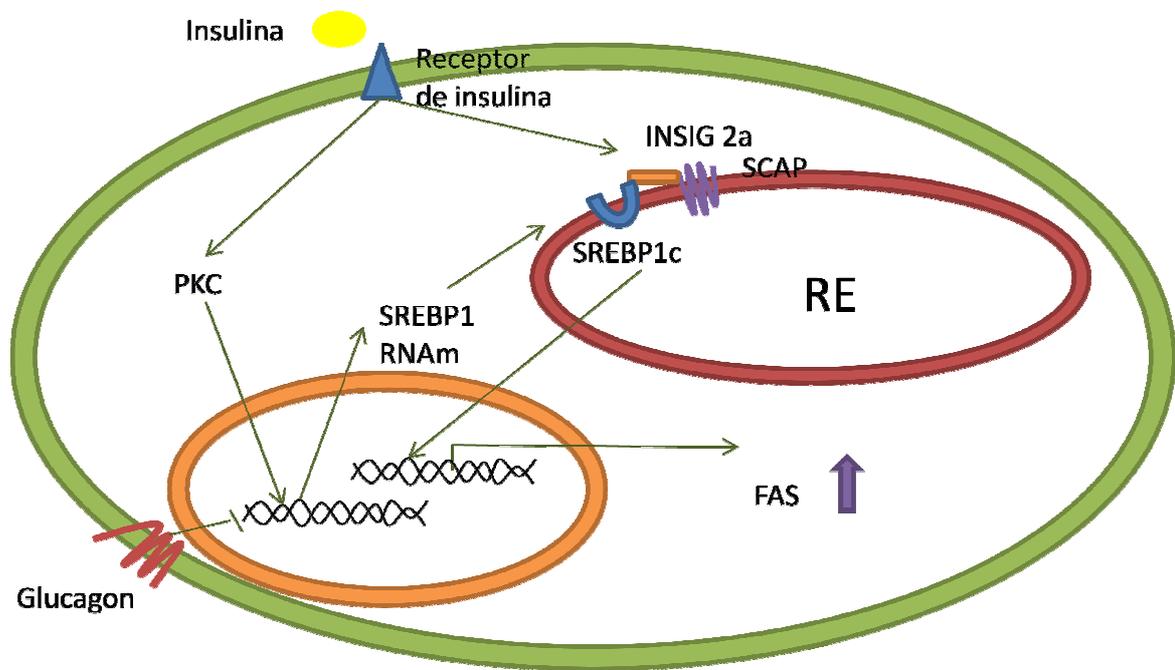


Figura 5 Esquema de acción de SREBP-1

Esquema de la acción de la insulina sobre el receptor de la misma induciendo la señalización vía PKC para la transcripción del RNAm de SREBP-1 y la capacidad del glucagon de reprimirla. Así como la señalización de la insulina por otra vía a través de su receptor para que la proteína SREBP-1 madura viaje hasta el núcleo en donde genera la transcripción de otras proteínas como es el caso de FAS

Al conocer la regulación de SREBP-1 se realizó un estudio con proteína de soya (Asencio *et al*, 2004) donde se observa claramente que la insulina sérica disminuye en comparación de los animales alimentados con caseína (proteína control de las dietas en ratas), así como una clara diferencia en la expresión del mRNA de SREBP-1, lo cual se observa en la Figura 6 tomada de dicho artículo.

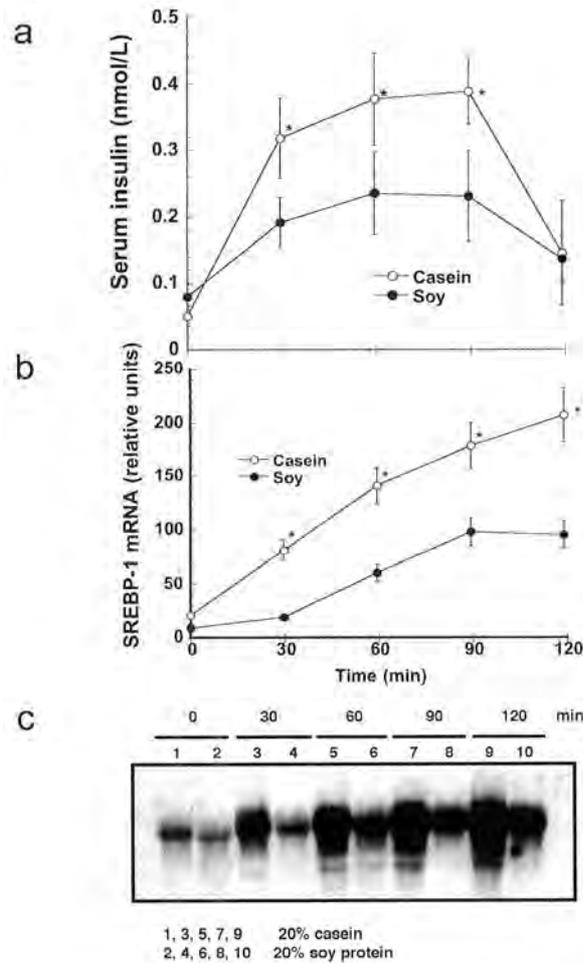


FIGURE 1 Serum insulin concentration (a), relative mRNA abundance (b), and hepatic SREBP-1 expression (c) in rats fed casein or soy protein 0, 30, 60, 90, and 120 min after they started to eat their meal. Values are means \pm SEM, $n = 5$. *Different from the soy group at that time, $P < 0.05$.

Figura 6 Efecto de la proteína de soja en Insulina y SREBP-1 mRNA

Los datos anteriores sugieren que la proteína de soja disminuye los niveles de insulina en sangre, así como la expresión génica de SREBP-1. Se ha propuesto que la menor relación Insulina/glucagon en sangre para el consumo de proteína de soja tiene relación con la disminución de la expresión de SREBP-1 (Asencio *et al*, 2004)

Velasques & Bahathena (2007) reconocen que el efecto del consumo de proteína de soja no solo se debe a su perfil de aminoácidos, sino de la acción conjunta con sus componentes como son saponinas, fosfolípidos e isoflavonas. Por su parte Noriega- López *et al* (2007) observan directamente en estímulos en páncreas como la respuesta es una acción conjunta tanto del perfil

de aminoácidos como las isoflavonas presentes. Otro estudio que soporta estos resultados es el de Takahashi, *et al* (2009) donde se observa que la expresión de SREBP-1 en hígado de rata se ve disminuida por el efecto de las isoflavonas presentes en los aislados de proteína de soya que son la Genisteína y Diadzeína. Al hablar de flavonoides, Peluso (2006) observa que diferentes tipos de flavonoides *in vitro* presentan un claro efecto dislipidémico, pero que en la mayoría de los casos no se ha observado el efecto *in vivo*.

Algunos ejemplos que encontramos de efecto dislipidémico por flavonoides son:

- la *Garcinia cambogia* o tamarindo malabar de la India (Koshy *et al*, 2001) cuyos flavonoides disminuyeron los niveles de ácidos grasos libres, colesterol y triglicéridos en animales.
- Los flavonoides, específicamente las proantocianidinas de la semilla de la uva (Baiges *et al*, 2010). generan una disminución en la lipogénesis a través de diversos factores de transcripción.
- El consumo de la narangina (Mulvihill *et al*, 2009), provoca una disminución de LDL y de los niveles de insulina en ratones.
- Las Catequinas del Té Verde (Velayutham *et al*, 2008) no solo generan un efecto de dislipidémico, sino que también disminuye la absorción intestinal de éstos.
- El Kaempferol del Ginkgo Biloba (Zhang *et al*, 2008) promueve la apoptosis de las células cancerígenas en el páncreas, lo cual se ha relacionado con la disminución de la sintasa de los ácidos grasos.

Estudios sobre los efectos del consumo de frijol

La calidad de la proteína de frijol ha sido cuestionada ya que tiene como aminoácidos limitantes a aminoácidos azufrados. Sin embargo, Morales-de León *et al* (2007) observaron claramente cómo después del tratamiento térmico el aumento de peso de las ratas alimentadas con proteína de frijol era adecuado, indicando que su calidad es aceptable (Figura 7).

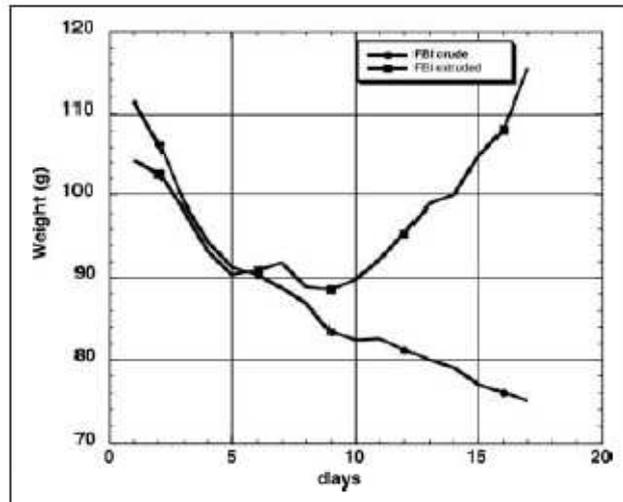


Figure 3—Changes in body weight of animals fed a diet containing 20% of isolated protein of fresh black bean treated with heat and animals fed a diet of 20% of isolated protein of fresh black bean without heat treatment for a period of 17 d. N = 10 in each group.

Figura 7 Ganancia de peso de animales alimentados con proteína de frijol

Thompson *et al* (2008) realizó un estudio donde alimentó a los animales con frijol entero cocido y seco, ajustando los demás componentes de la dieta para que fuera isocalórica. Al evaluar el efecto en glucosa e insulina, se observa claramente una disminución en los mismos conforme se incrementa la cantidad de frijol en la dieta, como se presenta en la Figura 8 extraída de dicho artículo.

TABLE 3 Effect of dry bean diets on rat plasma analytes¹

| Dietary beans, % | Glucose | Insulin | IGF-1 | CRP | IL-6 ² |
|------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | mmol/L | nmol/L | nmol/L | mmol/L | ng/L |
| 0 Bean | 6.96 ± 0.30 ^a | 0.47 ± 0.02 ^a | 0.21 ± 0.01 ^a | 1.33 ± 0.04 ^a | 48.8 ± 1.2 ^a |
| 7.5 Bean | 6.23 ± 0.16 ^b | 0.38 ± 0.02 ^b | 0.19 ± 0.01 ^a | 1.36 ± 0.04 ^a | 46.6 ± 2.4 ^a |
| 15 Bean | 5.33 ± 0.14 ^{bc} | 0.35 ± 0.02 ^b | 0.17 ± 0.01 ^b | 1.25 ± 0.05 ^b | 45.3 ± 2.1 ^a |
| 30 Bean | 5.47 ± 0.22 ^{bc} | 0.35 ± 0.02 ^b | 0.17 ± 0.01 ^b | 1.18 ± 0.04 ^b | 42.6 ± 1.9 ^b |
| 60 Bean | 4.98 ± 0.14 ^c | 0.33 ± 0.01 ^b | 0.16 ± 0.01 ^b | 1.20 ± 0.04 ^b | 42.3 ± 1.6 ^b |
| P-linear trend | , 0.001 | , 0.001 | , 0.001 | 0.005 | 0.01 |

¹ Values are means ± SEM, n = 10. Means in a column without a common letter differ, P < 0.05.

² Expressed as ng/L due to variable molecular weight (21.5–28 kDa).

Figura 8 Disminución de Glucosa e Insulina por consumo de Frijol

Justificación

El frijol negro es un alimento tradicional de la dieta mexicana, que en los últimos años ha presentado una disminución en su consumo, aunque culturalmente es bien aceptado y reconocido.

La elaboración de concentrados o aislados proteínicos contribuiría a diversificar su uso y ampliar el mercado, por lo que el diseño de un proceso de elaboración de los mismos y su caracterización en términos funcionales para determinar sus posibles usos en la industria alimentaria son de interés. Las principales características fisicoquímicas a estudiar son la composición en macronutrientos del producto, la solubilidad, absorción de agua, absorción de aceite.

Es necesario profundizar en el conocimiento del efecto del mismo sobre la lipogénesis, ya que tanto por su similitud en la composición de aminoácidos con el frijol de soya, y con base en estudios previos se puede suponer que presente un potencial dislipidémico.

El estudiar y analizar diversos efectos del concentrado de proteína del frijol sobre el metabolismo permitirá conocer mejor sus propiedades. Por lo tanto, se llevarán a cabo pruebas con ratas para observar su efecto metabólico, utilizando el concentrado de proteína de frijol negro cocido como única fuente de proteína. Se utilizarán caseína y proteína de soya como referencias, ambos estudiados ampliamente como controles de este tipo de estudios. Se propone estudiar su efecto sobre insulina y glucagón en suero. Por medio de técnicas moleculares se evaluará el efecto sobre la expresión génica de SREBP-1 y FAS que es una de las proteínas cuya transcripción estimula SREBP-1.

Objetivos

Objetivo general

Obtener un concentrado de proteína de frijol negro para conocer sus características fisicoquímicas, su efecto en el crecimiento en ratas, así como en los parámetros bioquímicos hormonales relacionados con lipogénesis.

Objetivos específicos

Obtener un concentrado de proteína del frijol negro cocido.

Realizar la caracterización fisicoquímica del concentrado de proteína de frijol en su composición y en sus propiedades de solubilidad, absorción de agua, absorción en aceite y cuantificación de flavonoides.

Describir el efecto en el crecimiento en ratas alimentadas con una dieta balanceada en la cual su proteína sea el concentrado de proteína de frijol negro.

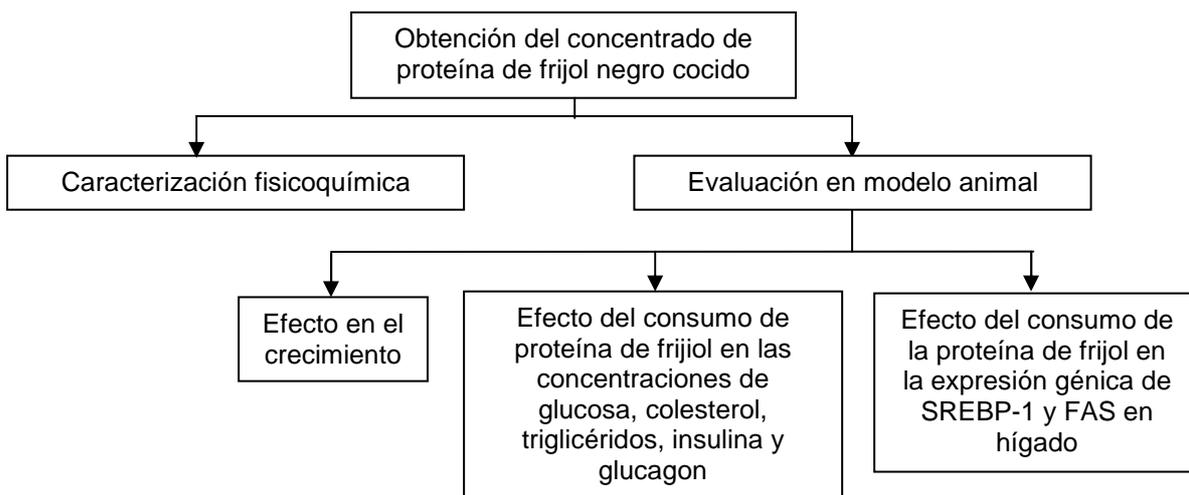
Describir el efecto en las concentraciones de glucosa, insulina y glucagon en ratas alimentadas con una fuente balanceada en la cual su proteína sea el concentrado de proteína de frijol negro.

Describir el efecto en las concentraciones de colesterol y triglicéridos en sangre en ratas alimentadas con una fuente balanceada en la cual su proteína sea el concentrado de proteína de frijol negro.

Describir el efecto en la expresión génica del SREBP-1 y una de las proteínas estimuladas por el mismo (FAS) en ratas alimentadas con una fuente balanceada en la cual su proteína sea el aislado de la proteína de frijol negro.

Metodología

Diagrama general de bloques



Obtención del concentrado de proteína de frijol negro cocido.

1. Se utilizó la variedad de Frijol Negro 8025, adquirida del INIFAP (Celaya, Gto).
2. Este se limpió por medio de la eliminación de partículas, pasándolos en contraflujo a una corriente de aire generada por una Aspiradora Rainbow con 1.5 caballos de fuerza, en la modalidad de expulsión de aire y colectando así los granos sin las impurezas que se encontraban en el costal, como polvo, ramas y hojas.
3. Posteriormente se molió dos veces en un molino de cuchillas (Fitz Patrick Company) ubicado en el establecimiento "El Faro Molino para maquila: granos especies, venta de

abarrotes y café” (Casco de Santo Tomás, Tacuba, D.F.). La harina obtenida fue la utilizada durante las diferentes etapas de este trabajo.

4. Composición. Se realizó en colaboración con Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ)
5. Caracterización física. Se determinó la cantidad que se retiene en tamiz malla 30 de una muestra, y a las partículas de mayor tamaño, que se quedaron sobre la malla del tamiz, se les midió el ancho y el largo, haciendo un promedio.
6. Solubilización de proteínas y elaboración de concentrado. Se realizaron diversas pruebas que se describen en el anexo 2. El proceso seleccionado se basó en Gómez-Brenes *et al* (1983), quien realizó una extracción consecutiva con NaCl, NaOH, H₂O y etanol al 70%, con tres extracciones de cada uno de los solventes. Se colocaron las mezclas según lo propuesto por dicho autor, donde el mínimo es una relación 1:5 (p/v) de harina de frijol y la solución correspondiente, con agitación durante 40 minutos. Posteriormente se centrifugó a 8500 RPM y se recolectó el sobrenadante. Al precipitado se le realizó el lavado consecutivo, hasta hacer los 12 lavados. Para determinar las concentraciones de proteína de los sobrenadantes se precipitó con TCA al 100% (Novagen), se colocó una muestra de 900 µl con 100 µl de TCA al 100%, se dejó reposar y se centrifugó. El precipitado se lavó con acetona para eliminar las impurezas que pudiera acarrear y se resuspendió en una solución de NaOH 0.1 N.
7. Se utilizaron 800 µl de esta última solución y se añadieron 200 µl del reactivo de Bradford, se mezclaron en vórtex y se dejó reposar 5 minutos. Transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia a 595 nm, en el espectrofotómetro Lambda3A marca Perkin-Elmer.

Caracterización del aislado proteínico

8. Se cuantificó proteína por método de Kjeldhal (AOAC 976.05). Ocupando el valor de 6.25 para el factor de conversión.
9. Se obtuvo perfil de proteínas por electroforesis SDS PAGE, (Laemmli 1970), en el sistema Bio-Rad (Mini-Protean II®). El gel separador fue de 0.1 mm y se preparó con una concentración de 10% de acrilamida para lo cual se mezclaron agua destilada, 1665 µl de Acrilamida, 1250 µl de Buffer separador, 50 µl de SDS y 25 µl de APS y se le agregaron

2.5 ml de TEMED para inicializar la polimerización. Se vertió en el molde (formado por vidrios) y se dejó polimerizar por 35 minutos, después se colocó el peine para muestras en la parte superior del molde y se mezcló el gel concentrador en un vaso de precipitados. Este último se preparó con 1530 μ l de agua destilada, 320 μ l de acrilamida, 625 μ l de Buffer concentrador, 25 μ l de SDS y 12.5 μ l de APS. Una vez terminada la mezcla y listo el molde con el peine se le agregaron 2.5 μ l de TEMED y se mezcló para vertir su contenido sobre el otro gel en el molde y nivelando el peine, se dejó polimerizar y después de esto se le retiró el peine. Se colocaron muestras con 0.005 mg de proteína solubilizada en cada uno de los pozos y el marcador de peso molecular. Se introdujo en la cámara, la cual se llenó con el amortiguador y se corrieron a 80 mV por 10 minutos y después a 120 mV en refrigeración hasta que el azul de bromofenol llegó al borde inferior. El gel se extrajo y se mantuvo en agitación leve con azul de Coomassie por 12 horas, tapado, para que se tiñera y luego se eliminó el exceso de color, por medio de 3 lavados solución desteñidora 1.

Obtención del concentrado proteínico a nivel piloto

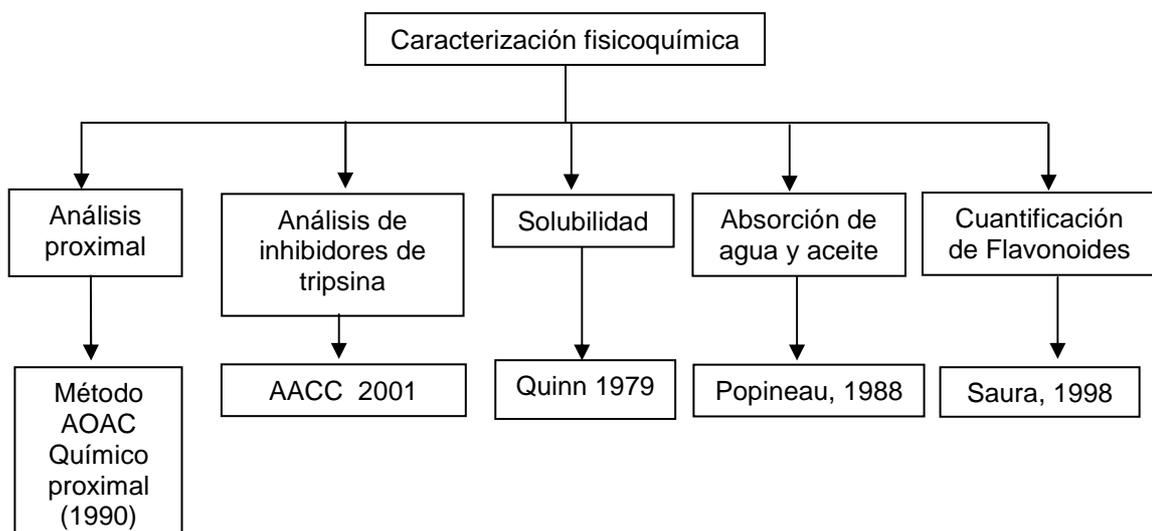
10. Una vez delimitadas las condiciones en el laboratorio se procedió a realizar el proceso en la planta piloto del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM. Se hicieron lotes de 12 kg de harina de frijol negro 8025 en un contenedor, se aforó a 65 litros el recipiente para mezclar, con agua, se le adicionaron 360 g de NaCl y se mezcló con un agitador de propela Mixing Equipment Co. Inc; (Avon, N.Y) modelo 14414 a 1725 rpm durante 40 minutos. Al terminar se realizó una primera separación de la mezcla con un tamiz maya 30 y posteriormente la centrifugación se realizó en una centrífuga Sharpless Type AS-16 a una velocidad de 15000 rpm, de alimentación continua hasta separar la pasta del sobrenadante. Para la alimentación se usó una bomba peristáltica Cole-Parmer, El sobrenadante se colectó para su utilización posterior y el precipitado se colocó en el recipiente para mezclar, el cual se aforó a 65 litros con agua y se le ajustó el pH a 8 con 90 ml de una solución NaOH 20%, se mantuvo en agitación durante 40 minutos, posteriormente se separó y se centrifugó en las mismas condiciones. El sobrenadante se colectó para su posterior utilización y la pasta se reutilizó para el tercer lavado, de nueva

cuenta en el recipiente para mezclar, aforando a 65 litros con agua y mezclando durante 40 minutos. Al terminar se realizó la separación y centrifugación, y la pasta resultante se desechó. Los 3 sobrenadantes colectados se juntaron y se colocaron en un reactor con instrumentación y control de pH y temperatura en línea, marca Baldor, con agitación de 1758 rpm. Se elevó la temperatura a 90 °C y una vez alcanzada dicha temperatura se le adicionó 300 ml de ácido muriático, una forma comercial del ácido clorhídrico, para ajustar la mezcla a un pH de 4, se dejó enfriar para que pudiera ser manejable la muestra y se centrifugó en las mismas condiciones; el sobrenadante fue desechado y la pasta se llevó a proceso térmico en la autoclave IMMSA, durante 30 minutos en condiciones de esterilización, a una temperatura de 121°C con una presión entre 18 y 22 Psi.

11. Una vez obtenido el producto se secó en un secador de charolas marca APEX Construction LTD. Tipo SSE70 a 60°C, hasta que el producto estuviera seco, evaluado por el cambio de color morado a café y por la textura de pasta que se convirtió en un producto quebradizo. Posteriormente se molió en la licuadora MX1000XT Waring Comercial, hasta que pasara por malla 30 (0.6 milímetros) todo el producto.
12. Finalmente, se humectó el producto en una relación 1:2 producto:agua y se le realizó otro proceso térmico en autoclave por 30 minutos, al término de éste, se secó y molió en las mismas condiciones.

Caracterización fisicoquímica

Diagrama de bloques de la caracterización fisicoquímica



1. Análisis proximal. Se llevó a cabo en el Laboratorio certificado de la Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, en el que se siguieron los métodos AOAC mencionados a continuación:
 - Humedad: método 934.01. Se colocaron las muestras húmedas, previamente pesadas en una estufa a 60 °C hasta llegar a peso constante
 - Proteína, método 976.05 para proteína antes explicado
 - Extracto etéreo, método 920.39 (Soxhlet), se extrajo la grasa con éter etílico como solvente
 - Cenizas, método 942.05 para cenizas, en el cual se colocó la muestra en una mufla hasta calcinar la muestra y obtuvo por diferencia de peso la cantidad de cenizas de la muestra
 - Fibra cruda, método 962.09, se le dio un tratamiento para simular la digestión y luego los compuestos no degradados se consideraron la fibra y la materia libre de nitrógeno se obtuvo por diferencia.
2. Factores antinutricionales: (en colaboración con el departamento de Tecnología de Alimentos del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán). Se evaluaron Inhibidores de Tripsina según el método del AACC (2001). Se determinó el efecto del concentrado proteínico sobre la actividad de la enzima tripsina espectrofotométricamente (410 nm) y se comparó contra un blanco (sin el concentrado) y una solución con el concentrado. Se determinó la diferencia entre estas dos condiciones y el resultado se expresó como UIT/g de muestra, que significa Unidad de inhibidor de tripsinas por gramo de muestra.

Determinación de las propiedades funcionales del concentrado proteico

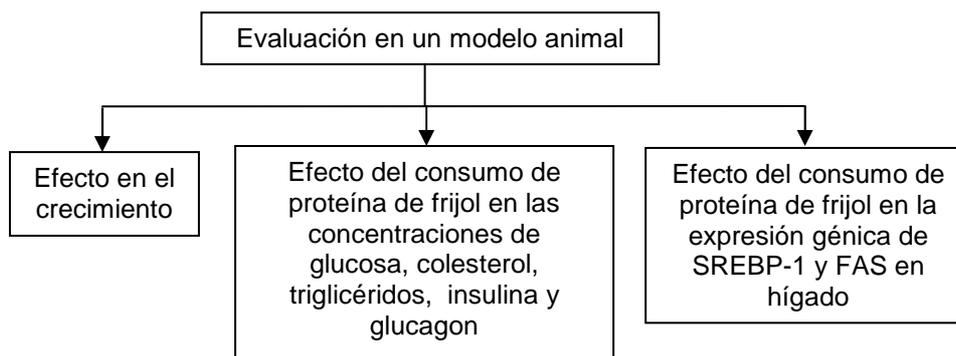
3. Solubilidad: se realizó la curva de solubilidad de las proteínas del producto según Popineau *et al* (1988), en donde se colocó 1 gramo de proteína a valores de pH de 2 a 12, los cuales se mantuvieron en agitación por 2 horas y se ajustaron dichos valores de pH cada 30 minutos. Al terminar este paso, se centrifugaron las muestras y se midió la proteína soluble en el sobrenadante, para dicha medición primero se precipitó la proteína por TCA para evitar interferencias y posteriormente se midió por Bradford (1976).
4. Absorción de agua y la absorción de aceite: se llevaron a cabo por la técnica de Quinn & Paton (1979). Se colocaron 3 tubos cónicos graduados de 15 ml, se les añadió 1 ml de

agua destilada o aceite, según fue el caso, después para el agua se necesitaron agregar 0.5 ml para hacer una pasta en el tubo 1, 1 ml en el tubo 2 y 1.5 ml en el tubo 3; y para el caso del aceite no fue necesario aumentar agua para hacer pasta en el tubo uno, así que al tubo dos se le aumentaron 0.5 ml y al tubo tres 1 ml del líquido a evaluar, después se centrifugaron a 2000 x g por 10 minutos.

5. Cuantificación de flavonoides: se realizó a partir de una extracción inicial en metanol y en acetona, se filtraron los residuos, y el producto no soluble en etanol se disolvió en agua, para extraer los polifenoles. Los flavonoides totales se determinaron por el método de Saura (1998), donde la absorbancia a 415 nm permite obtener la cantidad al compararla con el blanco que contenía ácido acético y como referencia la rutina.

Evaluación del efecto de la proteína de frijol en un modelo animal

Diagrama de bloques



Los animales fueron ratas macho de la cepa Sprague Dawley de 200 a 240 g.

Se utilizaron 3 grupos de ratas que se alimentaron con el correspondiente tipo de proteína 1) caseína, 2) proteína de soya, 3) proteína de frijol. Se utilizaron 25 animales en cada grupo y se sacrificaron 5 en cada tiempo. 0, 30, 60, 90 y 120 min después del consumo de alimento. En total se utilizaron 75 ratas.

Efecto de la ingesta de proteína de frijol en el crecimiento

1. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales con un ciclo luz/oscuridad de 12 horas con un horario restringido de 6 horas para la sincronización del consumo de alimento y disminuir en lo más posible las variaciones en las concentraciones de insulina y glucagón, en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador

Zubirán. El estudio tuvo una duración de 21 días por grupo, durante los cuales se registró diariamente el consumo de alimento y cada dos días, la ganancia de peso.

2. Se administró una dieta purificada en polvo a los animales de cada grupo. Las dietas experimentales tuvieron el mismo contenido energético y solo se ajustó la proteína conforme a la pureza del producto a utilizar. Las dietas se administraron *ad libitum* los tres primeros días en comederos de acero. A partir del día 4 y hasta el término del estudio se alimentaron en un horario restringido de 8:00hrs a 14:30 hrs., introduciendo la comida a las 8:00hrs y retirándola de la jaula a las 14:30 hrs. Los animales tuvieron agua potable, en bebederos de 500mL las 24 horas, todos los días. Para la eutanasia el día 22 del estudio, por grupo de 5 ratas, se trasladaron al Departamento de Fisiología de la Nutrición para la obtención de muestras y tejidos. La eutanasia se realizó colocando los animales en una cámara saturada con CO₂.
3. Para la obtención de muestras las ratas se desangraron por decapitación previa eutanasia por saturación con CO₂. Se colectó la sangre en tubos para la determinación de parámetros bioquímicos (glucosa, insulina y glucagon). A los animales se les realizó necropsia para obtener el hígado para la extracción de RNA total. Todos los tejidos se colocaron en tubos de microcentrífuga Eppendorf, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C.

Efecto de la ingesta de la proteína de frijol sobre las concentraciones de glucosa, colesterol, triglicéridos, insulina y glucagon

1. La glucosa en suero se midió con el Glucose Analyzer II (Beckman). Por medio del método de la glucosa oxidasa. Se introdujeron muestra de 10 µl de suero, descongeladas y se le permitió al aparato delimitar la concentración de glucosa, por medio de conocer el consumo de oxígeno mientras se utilizó glucosa oxidasa.
2. La medición de las concentraciones de colesterol y triglicéridos se realizó por el método enzimático colorimétrico, descongelando las muestras en hielo, ya que se descongelaron las muestras se tomaron alícuotas de 10 µl de cada muestra y el blanco con agua destilada, se mezclaron con 1000 µl del reactivo del kit correspondiente y se incuban por 20 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 546 nm. Esto se hizo con

Kits para cuantificación de triglicéridos y colesterol de la marca Diagnostic Systems Internacional.

3. Las concentraciones de insulina y glucagon en suero se determinaron por el método de Radioinmunoensayo con el antígeno específico marcado radioactivamente del RIA kit de insulina y glucagon para rata, marca Millipore. Se descongelaron las muestras en hielo y una vez descongeladas se tomaron alícuotas de 100 µl, las cuales se mezclaron con 100 µl de insulina marcada, después se le agregaron 100 µl del anticuerpo de insulina, se mezclaron, se cubrieron y se dejaron a 4 °C por 24 horas, se les adicionó el precipitante del kit, se mezclaron y se incubaron por 20 minutos a 4°C y se centrifugaron las muestras por 20 minutos a 2500 x g, al terminar se decantaron las muestras y se midieron en un contador gama.

Efecto de la ingesta de la proteína de frijol sobre la expresión génica de SREBP-1 y FAS en hígado

1. La extracción del RNA total de los tejidos se llevó a cabo por el método de Chomczynski & Sacchi (1987). Posteriormente 5 µg de RNA se sometieron a electroforesis en un gel de formaldehído 37% agarosa al 1% para comprobar su integridad. El RNA se cuantificó espectrofotométricamente a 250 nm.
2. El RNA se sometió a un análisis de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de dos pasos. El primer paso consistió en la obtención de DNA complementario mediante su retrotranscripción usando el kit de marca Invitrogen. Para esto en un volumen final de 22 µl se preparó una mezcla de reacción que contenía 300 ng de RNA, lo cual fueron 2 µl de la muestra, se le añadió 4 µl de Buffer para la transcriptasa reversa (50 mM de Tris HCl pH 8.3, 75 mM de KCl y 3 mM de MgCl₂), 0.4 mM del reactivo dNTPs, 2 ul oligonucleótido dT en una concentración 1:5 en agua sigma, 0.5 µL de inhibidor de RNAasa y 0.5 µL de la transcriptasa reversa M-MULV, ajustando con 7 µl de agua sigma para el volumen final. La retrotranscripción se llevó a cabo por 1 hora a 42°C y la inactivación de la enzima se realizó por 5 minutos a 94°C. En el segundo paso se llevó a cabo la amplificación de los genes antes mencionados en una mezcla de reacción que contenía 300 ng de cDNA del producto de retrotranscripción, 6 µL de la mezcla maestra, 0.4 µL del oligonucleótido

respectivo y lo restante de agua ultra filtrada marca Sigma para un volumen final de 11 μ L. La mezcla se colocó en una placa termocicladora del sistema de detección mencionado. La detección se realizó utilizando sondas Taqman para SREBP-1, FAS y para Ciclofilina como control endógeno para normalizar los valores de expresión. Sus especificaciones se encuentran en el Anexo 4

Los resultados se expresaron como el promedio de cada grupo \pm error estándar de la media (SEM). La diferencia entre los valores de ganancia de peso, consumo de alimento, así como los valores obtenidos de los parámetros bioquímicos y hormonales ser evaluaron por un análisis de varianza (ANOVA) para tratamientos múltiples, con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Resultados

Obtención del concentrado de proteína de frijol negro cocido

1. La harina de frijol negro 8025 presentó una composición de 17.84% de proteína, 1.69% de lípidos, 3.76% de fibra cruda y 64.84% de extracto libre de nitrógeno, es decir hidratos de carbono. Estos resultados se asemejan a los encontrados en la bibliografía por la USDA antes mencionados.
2. La primera etapa en la obtención del concentrado de proteína consistió en la obtención de una harina, que fue caracterizada en términos de tamaño de partícula tras someterse a tamizado en mallas de diferente diámetro. La harina utilizada presentó el 78.77% de retención en malla 30 y el 21.23% mayor a malla 30.

Las muestras mayores a malla 30 tuvieron un tamaño promedio de 15.29 ± 0.99 mm de ancho y 19.7 ± 1.45 mm de largo. Algunas de las muestras se presentan en la Figura 9



Figura 9 Partículas de la harina de frijol presentes de tamaño mayor a malla 30, después de la molienda.

3. El siguiente paso consistió en la extracción de proteínas empleando diferentes solventes. Se emplearon solubilizaciones consecutivas con NaCl, NaOH, H₂O y etanol al 70%, con tres extracciones de cada uno de los solventes, y se obtuvo una preparación con contenido variable de proteína, tal y como se ilustra en la tabla 3.

Tabla 4 Concentración de proteína en los sobrenadantes con tres lavados sucesivo

| Lavado | Solución | Porcentaje de proteína del total de masa | Error estándar |
|--------|------------------|--|----------------|
| 1 | NaCl 0.6% | 17.68 | 0.82167 |
| 2 | NaCl 0.6% | 1.34 | 0.02600 |
| 3 | NaCl 0.6% | 0.25 | 0.00656 |
| 1 | NaOH 0.01M | 10.82 | 1.07640 |
| 2 | NaOH 0.01M | 0.49 | 0.02377 |
| 3 | NaOH 0.01M | 0.10 | 0.01369 |
| 1 | H ₂ O | 0.09 | 0.00074 |
| 2 | H ₂ O | 0.04 | 0.00009 |
| 3 | H ₂ O | 0.02 | 0.00051 |
| 1 | Etanol al 70% | 0.04 | 0.00019 |
| 2 | Etanol al 70% | 0.006 | 0.000004 |
| 3 | Etanol al 70% | 0.006 | 0.00027 |

Según los resultados de la tabla anterior, se decidió no utilizar el etanol al 70% ya que sólo se obtuvo el 0.04% de proteína en el mejor de los casos, por lo cual se eliminó este solvente del proceso, se decidió conservar la fracción en agua, por la posible diversidad que apareciera en ésta.

Los resultados mostrados indican que el uso de NaCl 0.6% permite recuperar la mayor concentración de proteína en el primer lavado. Por lo tanto, se hicieron pruebas con diferentes concentraciones de esta sal para seleccionar la concentración idónea, y los resultados se presentan en la tabla 4. Al utilizar el método de Bradford (1976), el cual es muy sensible, se sobreestimó la cantidad de proteína, ya que fue necesario en algunos casos diluir hasta 1:10,00 para poder obtener los resultados. Pero las tendencias son claras para reconocer que en cada pasos se logran obtener mayores cantidades de proteína.

Tabla 5 Concentración de proteína en los sobrenadantes a diferentes concentraciones de NaCl

| Solución | Porcentaje de proteína obtenida | Error estandar |
|------------|---------------------------------|----------------|
| NaCl 0.44% | 65.17% | 0.194 |
| NaCl 0.5% | 95.51% | 0.067 |
| NaCl 0.6% | 100% | 0.232 |
| NaCl 0.7% | 93.26% | 0.221 |
| NaCl 0.8% | 96.63% | 0.084 |

Con esto se confirmó que la concentración NaCl 0.6% es la idónea para el proceso.

Para decidir si se colocaba la solución de NaOH 0.01 M ó si se agregaba NaOH 1N para alcanzar un pH de 8, procedimiento que según estudios previos (Dergal, 2010), genera la mayor solubilidad de proteínas (Globulinas), se realizó la experimentación con ambos procedimientos y los resultados se observan en la tabla 5.

Tabla 6 Concentración de proteína en los sobrenadantes con diferentes procedimientos de adición de NaOH

| Solución | Porcentaje de proteína del total de masa | Error estándar |
|-------------|--|----------------|
| NaOH 0.01M | 7.79 | 0.022 |
| NaOH 1N pH8 | 8.27 | 0.218 |

Con estos resultados se decidió utilizar el NaOH 1N para ajustar el pH8, aunque los valores sean muy cercanos.

Se realizó una prueba en el laboratorio con dichas condiciones y se evaluaron los sobrenadantes de la misma manera, dando los resultados que se observan en la tabla 6.

Tabla 7 Concentración de proteína en los sobrenadantes con un solo lavado

| Solución | Porcentaje de proteína del total de masa | Error estándar |
|------------------|--|----------------|
| NaCl 0.6% | 17.4 | 0.229 |
| pH 8 con NaOH 1N | 8.27 | 0.218 |
| H ₂ O | 0.37 | 0.004 |

Caracterización del aislado

- Una vez delimitadas las condiciones para el proceso de extracción, se llevó a cabo todo el proceso de extracción en el laboratorio. Posteriormente se recupero la proteína de los sobrenadantes realizando una precipitación con HCl 1N hasta llegar a un pH 4 (punto isoeléctrico de la mayoría de las proteínas de nuestra materia prima). La pasta producida por la precipitación se sometió a un proceso de autoclave, para eliminar los factores antifisiológicos presentes en la harina de frijol que no permiten un buen crecimiento en animales, tomando las condiciones de 30 minutos a 121°C propuestas por Chiun-Chuang & Chang (1988) y Jourdan *et al* (2007). Este producto se sometió a un proceso de secado a 60 °C para evitar que las temperaturas altas generasen reacciones en el mismo, así como para poder obtener un material más fácil de almacenar, manejar y con mayor vida de anaquel. A continuación se presenta una tabla y posteriormente el diagrama del proceso completo.

Tabla 8 Proceso de extracción en el laboratorio

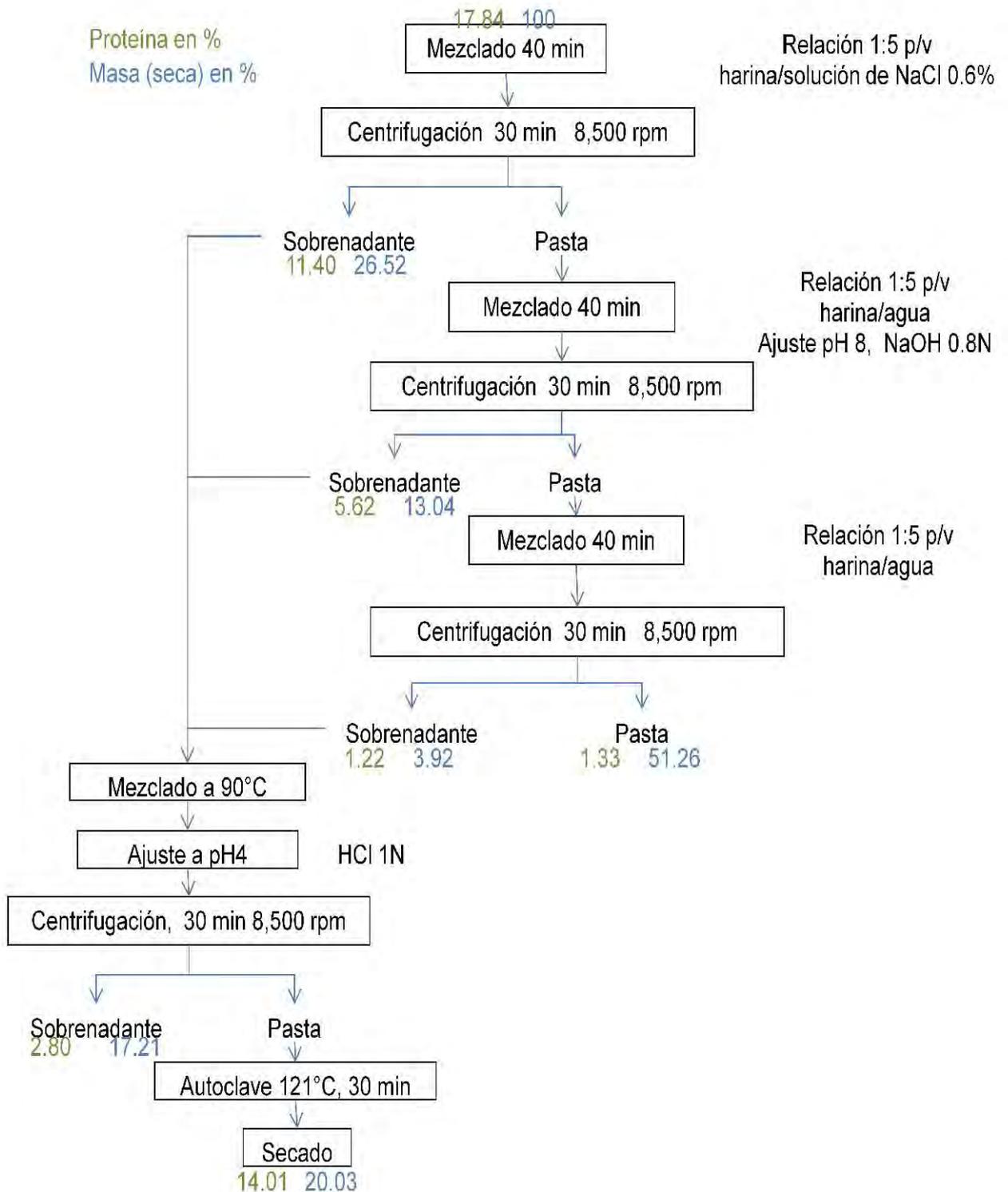
| Paso | Materia | Porcentaje de proteína del total de masa | Porcentaje de masa seca |
|--------------------|--------------|--|-------------------------|
| Mezclado | Harina | 17.84% | 100% |
| Centrifugación (1) | Sobrenadante | 11.40% | 26.52% |
| Centrifugación (2) | Sobrenadante | 5.62% | 13.04% |
| Centrifugación (3) | Sobrenadante | 1.22% | 3.92% |
| | Pasta | 1.33% | 51.26% |
| Balance | | -1.73% | 5.26% |

| Se reúnen todos los sobrenadantes y con ellos se trabaja | | | |
|---|---------------|--------|--------|
| Materia prima que entra al proceso | | 17.84% | 43.48% |
| Centrifugación (4) | Sobrenandante | 2.80% | 17.21% |
| Secado | Pasta final | 14.01% | 20.03% |
| Balance | | 1.03% | 6.24% |
| Se realizaron las evaluaciones de proteína por el método Kjeldhal, en cada uno de los pasos del proceso. Se secaron muestras de cada uno de los pasos para obtener la cantidad de materia. Se presenta el porcentaje obtenido, de la masa en cada uno de los pasos en función del total introducida al proceso; y el porcentaje de proteína del total de masa introducida al proceso. | | | |

Para los resultados de este proceso que se realizó con mayor materia prima se analizó la proteína por el método Kjeldahl para evitar la sobrestimación que antes se presentaba, por los resultados observados se la tabla, los valores de concentración de proteína se sobre estiman menos, una vez que se tienen todos los sobrenadantes existe una ligera sobre estimación, mucho menor a las anteriores. Con respecto a la masa se presentó una pérdida del 5.26% durante los 3 lavados, lo cual puede deberse a la manipulación de la materia prima en estas partes del proceso y posteriormente una nueva pérdida de 6.24% por la misma razón, principalmente en la recuperación del precipitado después de la centrifugación, ya que su consistencia viscosa dificulta el manejo.

De esta manera encontramos que el proceso en el laboratorio tiene un rendimiento en masa de 20.03% y un 14.01 % de proteína, lo cual representa que el producto tiene un 70% de proteína y eso indica que se recuperó el 59.3% de la proteína total de la harina utilizada.

Diagrama del proceso de la obtención del concentrado de proteína en el laboratorio.



- Con el fin de observar el perfil de solubilización de proteínas en las diferentes etapas del proceso, se realizó un perfil electroforético para poder reconocer las fracciones presentes, lo que se presenta a continuación Figura 10

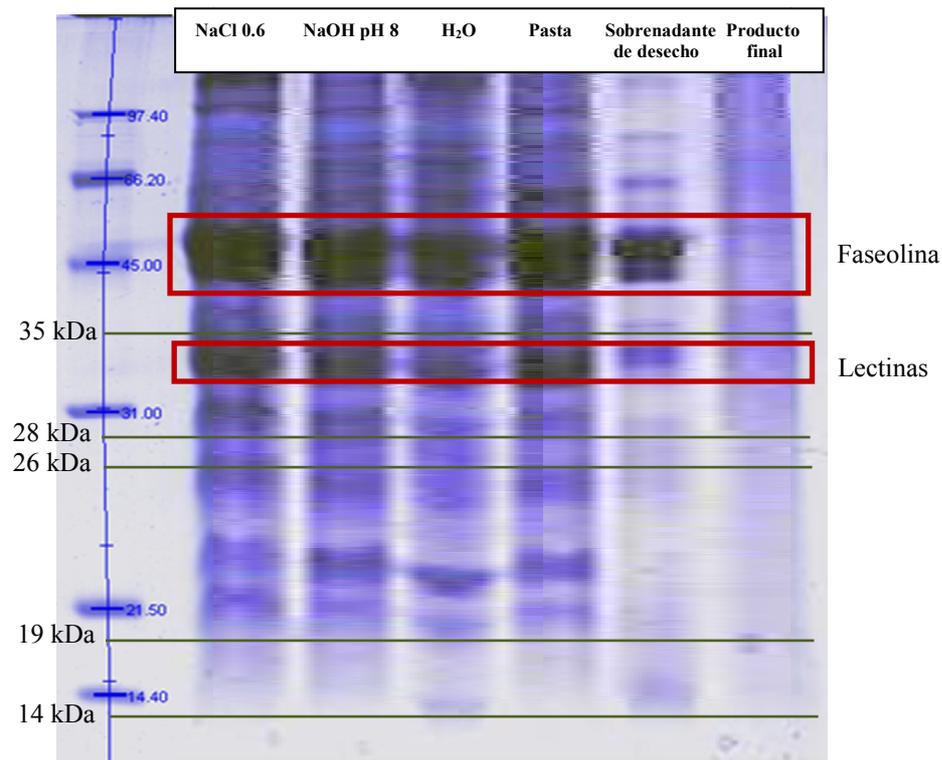


Figura 10 Electroforesis de las proteínas durante el proceso Gel SDS PAGE. Se introdujeron 5µg de proteína, según la muestra, en cada carril, en el primer carril el sobrenadante de la extracción con una solución de NaCl 0.6%, en el segundo carril el sobrenadante de la extracción con NaOH hasta llegar a un pH 8, en el tercer carril el sobrenadante de la extracción con agua, en el cuarto carril la pasta antes de someterse al proceso de autoclave, en el quinto carril el sobrenadante de desecho y en el último carril el producto después del proceso de secado.

Se distingue que en el carril del producto terminado es clara la posible degradación de la proteína y posiblemente mayores pérdidas en estructura. Se observa que las principales proteínas obtenidas durante el proceso son la Faseolina y las Lectinas marcadas claramente.

En la figura se aprecia que las proteínas solubilizadas en todas las condiciones presentan en su mayoría el mismo patrón. Sin embargo nuestras evaluaciones anteriores indican que, el rendimiento de esta solubilización sí se ve afectada por los diversos solventes utilizados. Las proteínas perdidas en el sobrenadante de desecho muestran las bandas 35, 28, 26, 19 y 14 kDa durante este proceso

Obtención del concentrado proteínico a nivel piloto

6. En el proceso en planta piloto del concentrado de proteína de frijol negro se presentaron en rendimiento los resultados según la siguiente tabla:

Tabla 9 Proceso de elaboración del concentrado de proteína de frijol en planta piloto

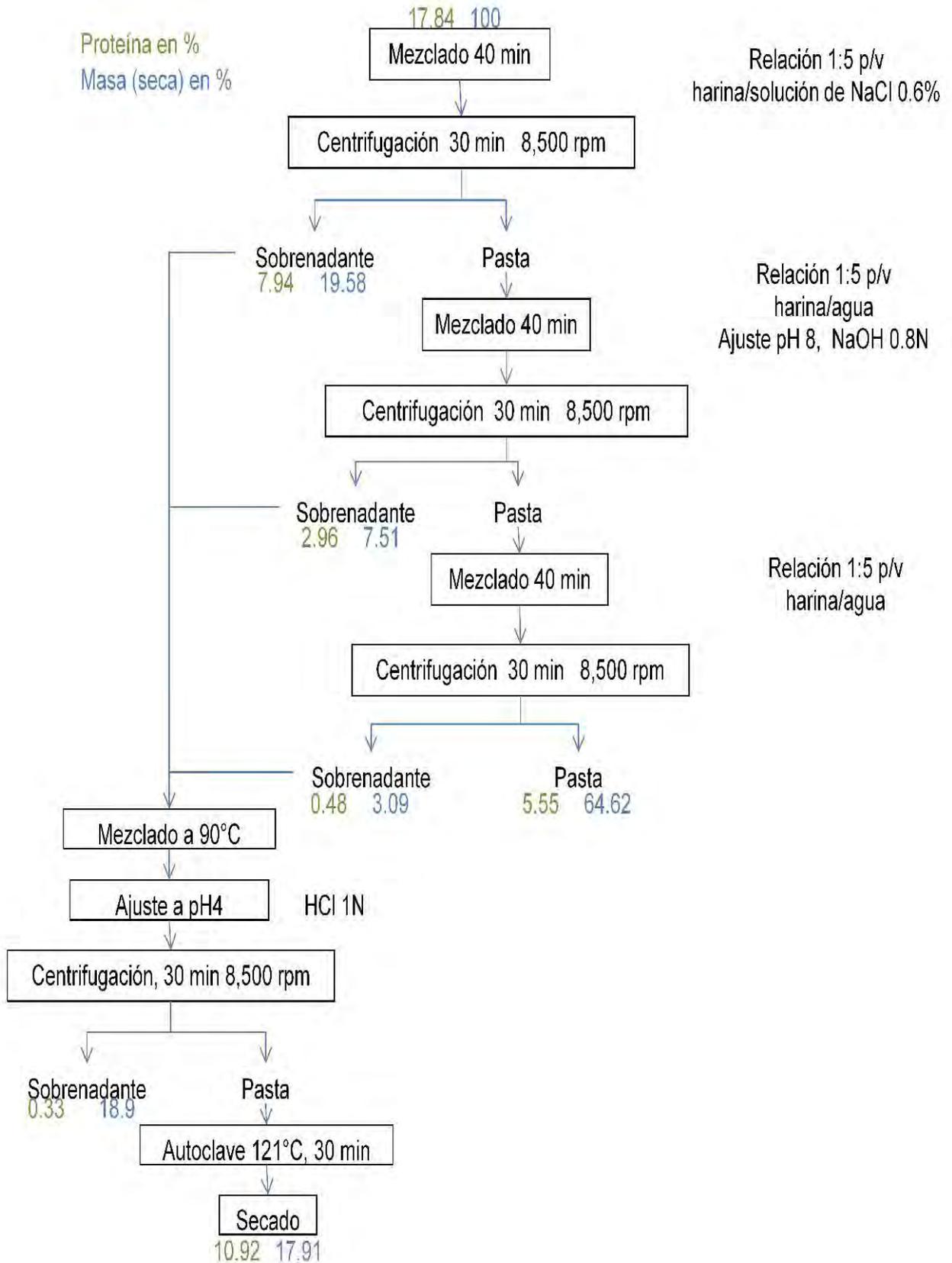
| Paso | Materia | Porcentaje de proteína del total de masa | Porcentaje de masa seca |
|---|--------------|--|-------------------------|
| Mezclado | Harina | 17.84% | 100% |
| Centrifugación (1) | Sobrenadante | 7.94% | 19.58% |
| Centrifugación (2) | Sobrenadante | 2.96% | 7.51% |
| Centrifugación (3) | Sobrenadante | 0.48% | 3.09% |
| | Pasta | 5.55% | 64.62% |
| Balance | | 0.91% | 5.20% |
| Se reúnen todos los sobrenadantes y con ellos se trabaja | | | |
| Materia prima que entra al proceso | | 11.38% | 30.18% |
| Centrifugación (4) | Sobrenadante | 0.33% | 18.90% |
| Secado | Pasta final | 10.92% | 17.91% |
| Balance | | 0.13% | -6-63% |
| Se realizaron las evaluaciones de proteína por el método Kjeldhal, en cada uno de los pasos del proceso. Se secaron muestras de cada uno de los pasos para obtener la cantidad de materia. Se presenta el porcentaje obtenido, de la masa en cada uno de los pasos en función del total introducida al proceso; y el porcentaje de proteína del total de masa introducida al proceso. | | | |

La recuperación de proteína en planta piloto fue menor a la obtención en laboratorio, como era de esperarse ya que el manejo en planta presenta un rango del 20% de variación, en laboratorio se obtuvo un 14.01% y en planta un 10.92%.

Los rendimientos en masa en planta mantuvieron una relación similar a la proteína y presentan al final un balance negativo, lo cual se puede deber a que las muestras de planta, principalmente el sobrenadante de la Centrifugación (4), presentó dificultad en el proceso de secado, debido a que en el transporte generó una consistencia viscosa antes de poder empezar a secarlo.

El diagrama del proceso en la planta piloto del IBT se encuentra a continuación.

Diagrama del proceso de la obtención del concentrado de proteína en la planta piloto del IBT



Caracterización fisicoquímica

1. La composición final del concentrado es la siguiente: 60.92% de proteína, 0.12% de lípidos, 0.45% de fibra cruda y 23.96% de extracto libre de nitrógeno, es decir de hidratos de carbono. Estos resultados presentan un concentrado a diferencia de los aislados comerciales, donde la principal diferencia se encuentra con la proteína y los hidratos de carbono. En los aislados comerciales de proteína de soya y caseína encontramos por lo general valores de 80% o mayores de proteína y valores menores para hidratos de carbono, por lo que al comparar el producto con los comerciales encontramos que esta diferencia modificará propiedades del concentrado y por lo mismo sus posibles usos. El reporte obtenido por la Facultad de MVZ se encuentra en el Anexo 3.
2. El concentrado presentó un valor de 16422.09 UIT/g de muestra, para el análisis de inhibidores de tripsina, lo cual es un valor muy alto, con el cual los animales no pueden tener un crecimiento adecuado (Rackis & McGhee, 1975), por lo cual se decidió humectar el producto para realizar otro proceso térmico en autoclave. Para la humectación se hizo en una relación 1:2 producto:agua y el proceso en autoclave tuvo las mismas condiciones. El producto después de este proceso presentó 1866.77UIT/g de muestra, lo cual es un valor que permite un adecuado crecimiento en los animales.
Los reportes de estos resultados se encuentran en el Anexo 3

Determinación de las propiedades funcionales del concentrado proteico

3. En virtud de que algunos autores consideran que la solubilidad es un factor determinante en la funcionalidad de un preparado proteico, se determinó inicialmente la curva de solubilidad de las proteínas del producto según Popineau *et al* (1988). Los resultados que dan la curva de solubilidad se presentan en la figura 11.

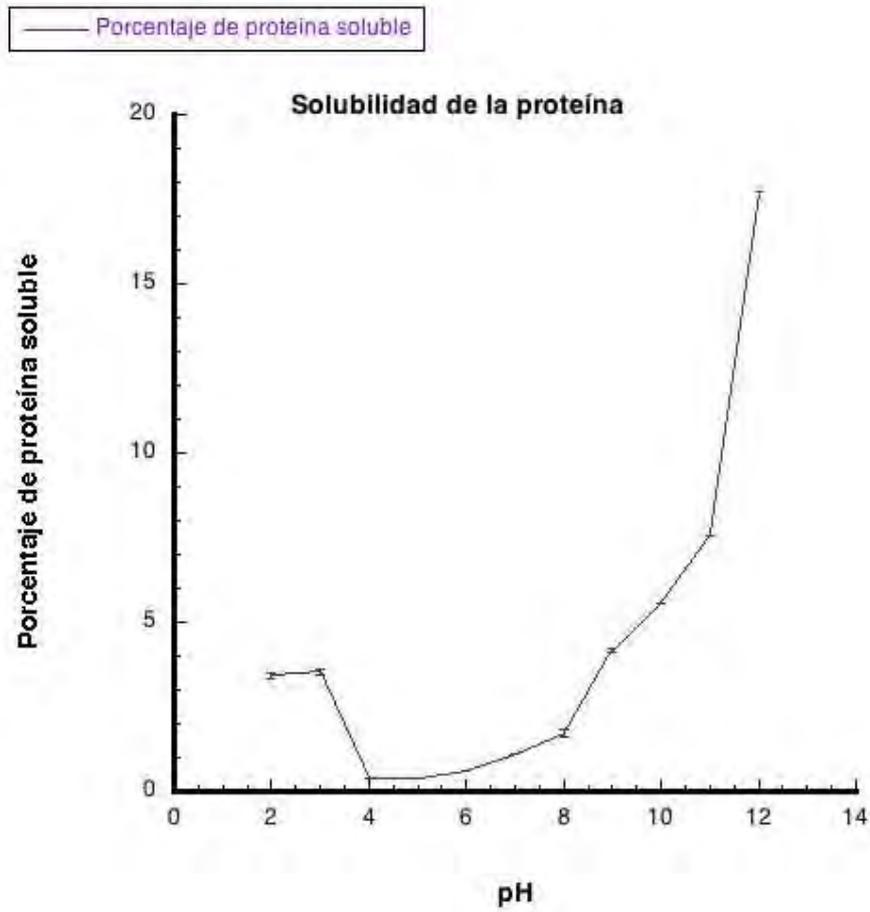


Figura 11 Solubilidad de la proteína presente en el concentrado de proteína de frijol

Se observa que la mayor solubilidad se presenta en un pH alcalino, y la mínima está entre 4 y 6.5. La mayoría de los alimentos tienden a un pH ácido. Por lo cual no se espera una aplicación donde se solubilice el producto, sino en productos donde se pueda agregar a la mezcla como barras de cereal o galletas.

4. A continuación se evaluaron la capacidad de absorción de agua y de aceite, para lo que se siguió la metodología de Quinn & Paton (1979). Se observaron los resultados que se presentan en la siguiente Figura.

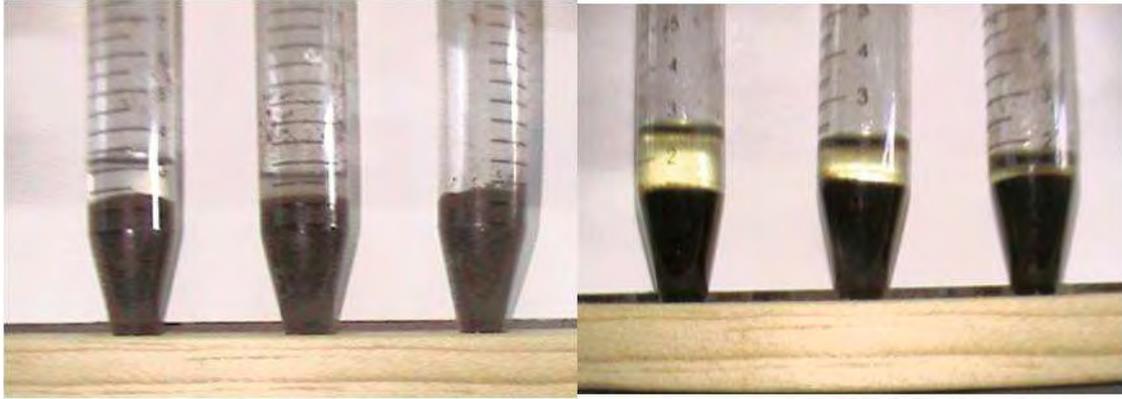


Figura 12 Absorción de agua y aceite

En la imagen de la izquierda se presenta la absorción de agua, donde a un gramo de concentrado se le agregaron 2.5 ml de agua, 2 ml de agua y 1.5 ml de agua respectivamente. En la imagen de la derecha se observa la absorción de aceite donde se agregaron 1.5 ml, 1 ml y 0.5 ml de aceite respectivamente a un gramo de concentrado.

Para los cálculos se define a esta absorción como la cantidad de líquido retenido por gramo de producto, y se obtienen los siguientes resultados.

Absorción de agua

$$\frac{\text{ml de agua retenida}}{\text{gramos de producto}} = \frac{1.5}{1} = 1.5 \text{ ml/g}$$

Absorción de aceite

$$\frac{\text{ml de aceite retenido}}{\text{gramos de producto}} = \frac{0.5}{1} = 0.5 \text{ ml/g}$$

La absorción de agua del producto es similar a lo antes reportado para la harina de frijol por Sangronis *et al* (2004), por lo cual el concentrado presentó características similares a la harina de frijol crudo. En comparación con aislados de proteína de soya esta absorción de agua es baja, ya que en algunos casos se logran valores hasta de 5 ml/g. (Aislado de proteína de la marca Makymat).

La absorción de aceite se ve sumamente disminuida en comparación con lo reportado para harina de frijol negro por Sangronis *et al* (2004), ya que en ese estudio se reportaron valores de 1.9 ml/g. En comparación con los aislados de proteína de soya no se encuentra tan distante, ya que dichos productos se encuentran en intervalos de 0.5-0.9 ml/g, Una de las mayores aplicaciones a esta propiedad ya que se busca evitar una elevado absorción de aceite de en los alimentos.

5. El consumo del frijol negro se ha promovido por la presencia de flavonoides y antocianinas, considerados antioxidantes, lo que le daría una característica nutracéutica o funcional al producto. En este caso, se llevó a cabo la cuantificación de flavonoides para determinar si están presentes en el concentrado, y se obtuvo un valor de 149.88µg/g de concentrado, con error estándar de ± 0.017 .

Estos resultados son muy similares a los valores obtenidos en otros concentrados realizados en el laboratorio 312 del departamento de alimentos y biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM (Dergal, 2010), donde los valores van de 145.6 a 153.3 µg/g de muestra, en donde no se llevó a cabo tratamiento térmico, por lo cual se puede decir que el tratamiento térmico no afecta de manera considerable a estos compuestos y que se acarrearon en proporción similar durante la extracción de proteína, ya que en el otro concentrado el rendimiento fue menor, pero el porcentaje de proteína de los productos terminados fue similar. La materia prima presentó 1.35mg/g, por lo cual podemos observar que dicha relación no se presenta en el concentrado, es decir que la mayor cantidad se quedó en el resto del proceso en las fracciones no ocupadas para este proceso. En los aislados de proteína de frijol se mencionan valores que van desde los 2083.33 µg/g hasta los 16.28 µg/g para harinas desgrasada (Ludueña B *et al*, 2007) que no se pueden considerar valores despreciables.

Evaluación del efecto de la proteína de frijol en un modelo animal

La evaluación de la calidad biológica de una proteína se realiza al determinar si es capaz de sostener el crecimiento de un modelo animal. Se suelen emplear proteínas de referencia y, de acuerdo a la FAO se emplea caseína. Se procedió a diseñar dietas y en función de los resultados del análisis proximal del concentrado de proteína de frijol, y sabiendo que para la caseína se tiene 90.5% de proteína y 9.5% de hidratos de carbono, mientras que el aislado de proteína de soya que se empleó con fines de comparación presenta un 86% de proteína y un 14% de hidratos de carbono. Las dietas calculadas se presentan en la tabla 9

Tabla 10 Dietas experimentales en gramos, base de 100g de dieta

| Componente | Caseína | Soya | Frijol |
|----------------------|---------|--------|--------|
| Fuente de proteína | 22.08 | 23.28 | 32.83 |
| Almidón | 39.75 | 39.75 | 37.13 |
| Malto dextrinas | 12.16 | 11.56 | 10.58 |
| Sacarosa | 8.96 | 8.36 | 7.38 |
| Aceite de soya | 7 | 7 | 6.96 |
| Fibra | 5 | 5 | 4.85 |
| Mezcla de Minerales | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| Mezcla de vitaminas | 1 | 1 | 1 |
| L-Metionina | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| Citrato de Colina | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| Terbutilhidroquinona | 0.0014 | 0.0014 | 0.0014 |

Las consideraciones para el diseño de estas dietas se explican en el Anexo 5.

Efecto de la ingesta de proteína de frijol en el crecimiento.

1. En los animales utilizados para la experimentación un primer punto a evaluar es la tasa de crecimiento a partir de lo suministrado en la dieta, en este caso específico en función del concentrado de proteína que es la única variable que se modificó directamente. A continuación se presenta la gráfica de ganancia de peso de los animales durante el experimento.

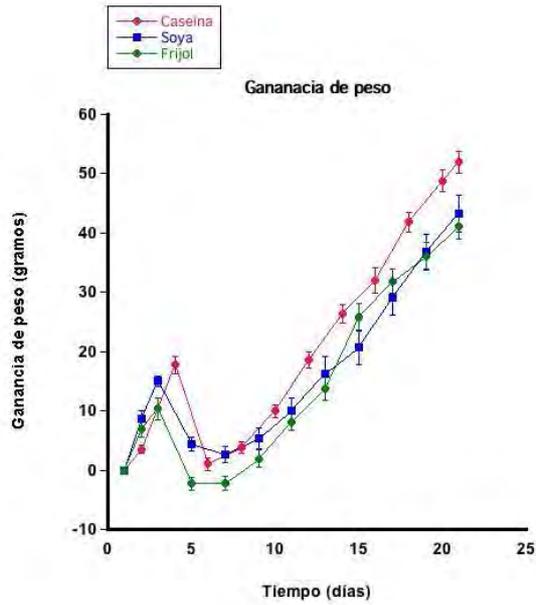


Figura 13 Ganancia de peso de los animales
 Ganancia de peso para cada uno de los grupos señalados, durante los 21 días que duro el estudio, con barras que corresponden al error estándar

Para poder ocupar los datos de forma comparativa se tiene que delimitar la recta de crecimiento de los animales con su ecuación, según la fuente de proteína, lo cual se presenta en la siguiente gráfica.

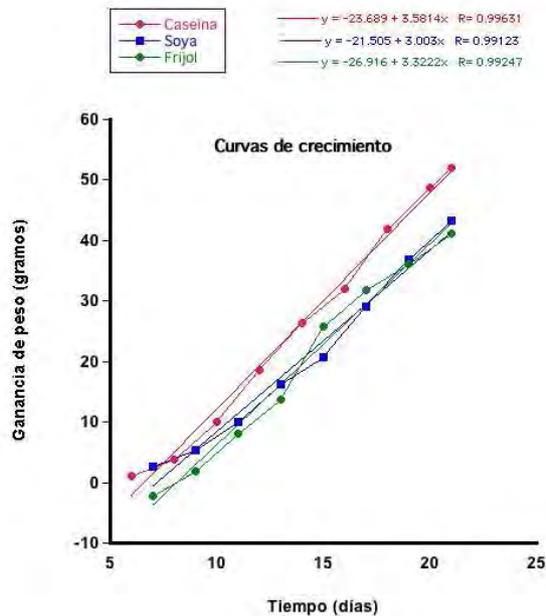


Figura 14 Curvas de crecimiento de los animales

Y para confirmar si existe diferencia significativa en el crecimiento se realizó un ANOVA el cual dio los resultados de la figura 15.

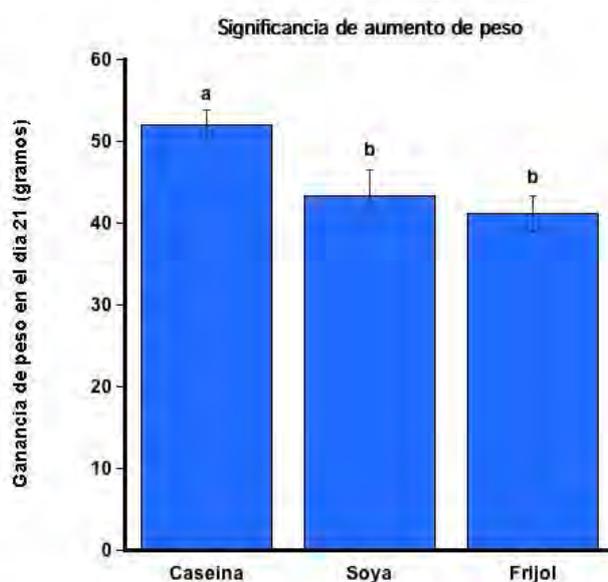


Figura 15 Comparación del incremento de peso a los 21 días

Con estos resultados observamos que las ratas alimentadas con proteína de frijol presentan una pérdida mayor de peso al acostumbrarlas al horario restringido, pero una vez habituadas al mismo, las gráficas son muy similares. Al comparar la ganancia de peso con el grupo alimentado con caseína se observa claramente que no se presenta un periodo estacionario para subir de peso con el horario restringido y por lo demás la tendencia de las rectas es la misma. En las curvas de crecimiento se observa claramente que la de mayor pendiente es la del grupo de caseína con un valor de 3.57, y que el grupo alimentado con el concentrado de proteína de frijol negro como única fuente de proteína presenta una pendiente de 3.322, lo cual es inferior a la de caseína pero mayor a la del grupo alimentado con proteína de soya que presentó una pendiente de 3.05. Estas pendientes significan la ganancia de peso en gramos por día.

Efecto de la ingesta de la proteína de frijol sobre las concentraciones de glucosa, colesterol, triglicéridos, insulina y glucagon

El problema original planteado en este proyecto consiste en saber si la naturaleza de la fuente de proteína afecta el metabolismo de lípidos y carbohidratos.

1. En primera instancia se evaluó el efecto sobre los niveles séricos de glucosa en el suero de los animales, a los diferentes tiempos del sacrificio. Los resultados se presentan en la figura 16

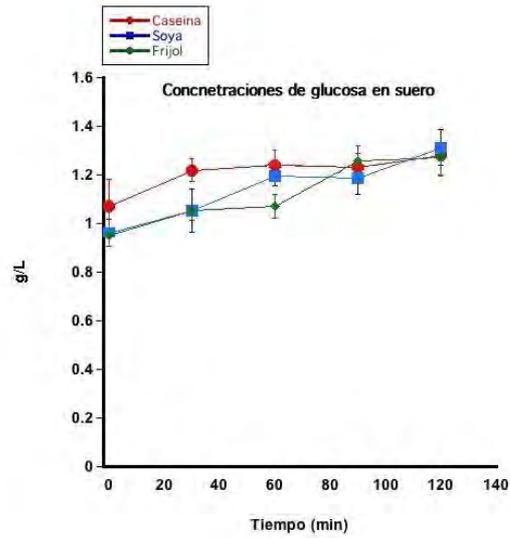


Figura 16 Concentraciones de glucosa en suero de rata

Se observa que la proteína de frijol genera un menor aumento en los valores de glucosa al principio, aun más marcado que lo que ocurre con la soya, pero que en todos los casos los valores alcanzados al final no presentan ninguna diferencia significativa.

2. Las concentraciones de colesterol y triglicéridos obtenidas se presentan en la figura 17

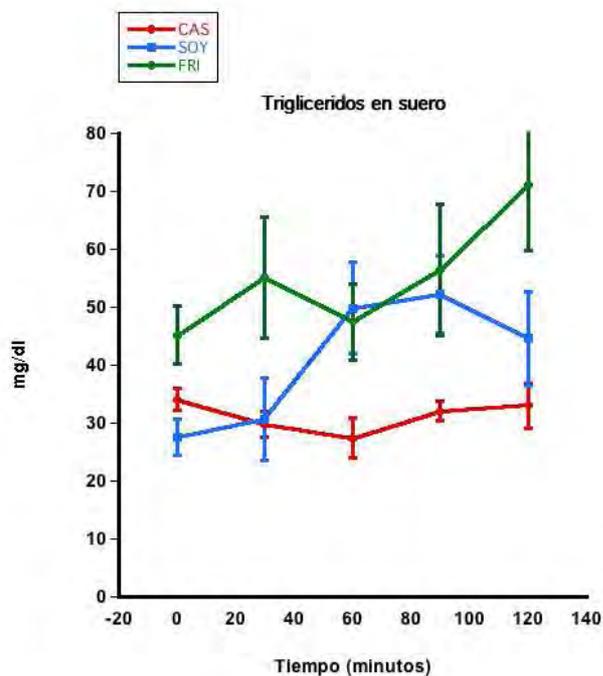


Figura 17 Concentraciones de triglicéridos en suero de rata

Para el caso concreto de los triglicéridos en suero se observa con la proteína de frijol un aumento mayor que el observado con la proteína soya. Es importante enfatizar que las concentraciones de triglicéridos en ayuno entre los diferentes grupos varia siendo las concentraciones en el suero de ratas alimentadas con proteína de frijol mayores que en los grupos de soya o caseína.

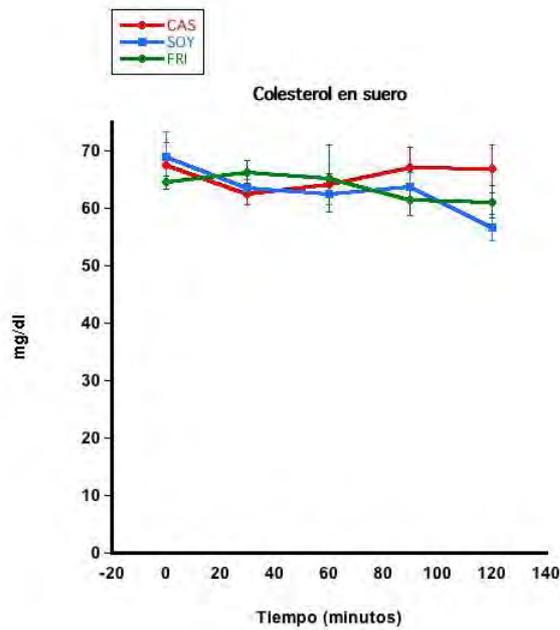


Figura 18 Concentraciones de colesterol en suero de rata

Para el caso del colesterol, se observa una tendencia a valores menores en los grupos de soya y frijol pero sin una diferencia significativa con respecto a la caseína.

3. El resultado obtenido para los últimos parámetros bioquímicos que son los niveles de insulina, glucagon y su relación se presentan en la figura 19

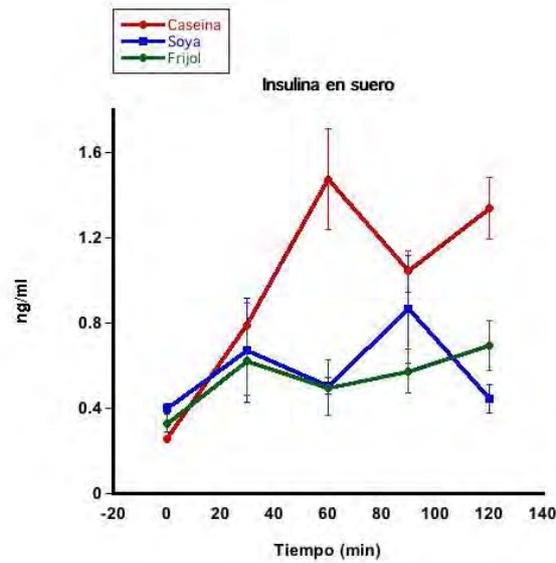


Figura 19 Concentraciones de Insulina en suero

Los resultados de los valores de insulina presentan una clara disminución para el caso de el concentrado de proteína de frijol, aun mayores en algunos puntos que para la proteína de soya y con clara diferencia en el último tiempo. A diferencia, los niveles de glucosa no mostraron este patron de respuesta. Por lo que resulta que el uso de proteína de frijol o de soya, producen una disminución en los niveles de insulina en sangre evitando picos, como es el caso de el consumo de caseína. Pero en todos los casos las concentraciones de insulina se encuentran dentro de los rangos normales en rata, que son menores a 2ng/ml

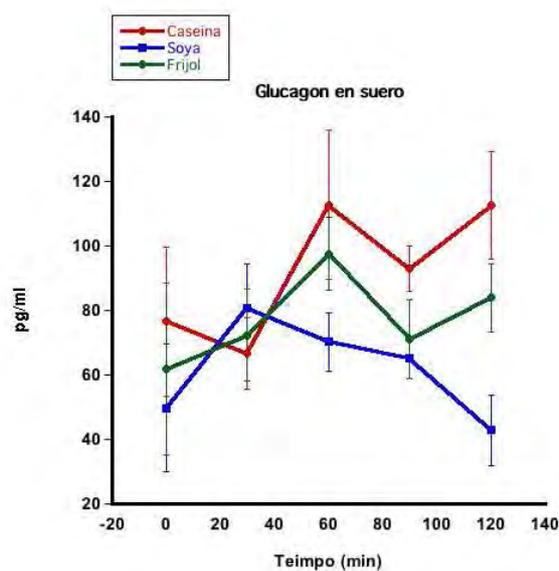


Figura 20 Concentraciones de Glucagon en suero de rata

Las concentraciones de glucagon en suero si presentan diferencia significativa, principalmente para los últimos tiempos. Soya es la proteína que induce menores niveles, le sigue el concentrado de proteína de frijol que presenta una tendencia más parecida a los resultados obtenidos para caseína, pero con valores significativamente menores. Con la proteína láctea se observaron las concentraciones mas elevadas. La respuesta de glucagon e insulina sigue un patrón diferente.

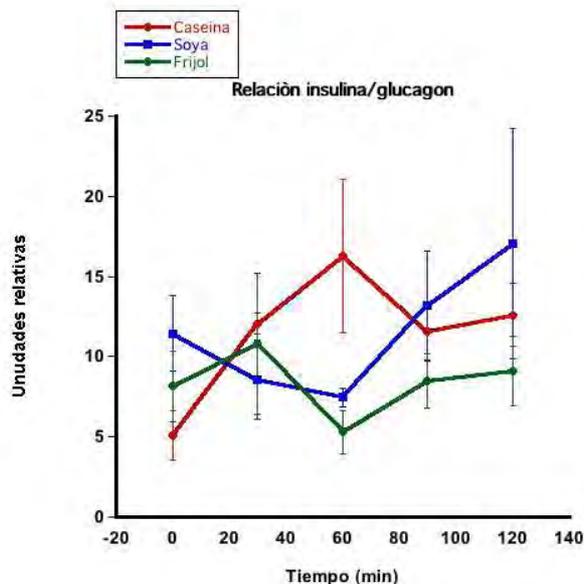


Figura 21 Relación Insulina/Glucagon en suero de rata

Si se analiza la relación insulina/glucagon se obtienen 3 curvas muy diferentes. Para el caso de la caseína es un aumento claro en los primeros 60 minutos, y después solo una disminución; en el caso de la proteína de soya se observa un patrón opuesto al observado con la caseína. Finalmente para la proteína de frijol no se muestra una tendencia importante, sin embargo se asemeja a la de la proteína de soya. Los datos sugieren que existe un efecto de la fuente de proteína sobre la relación insulina/glucagon en donde las proteínas de origen vegetal generan una disminución de la relación para el tiempo 60 del estudio, lo cual no se observa en la caseína, que es una proteína de origen animal.

Efecto de la ingesta de la proteína de frijol sobre la expresión génica de SREBP-1 y FAS en hígado

1. Los resultados de los análisis de PCR-TR para el gen SREBP-1 son los siguientes

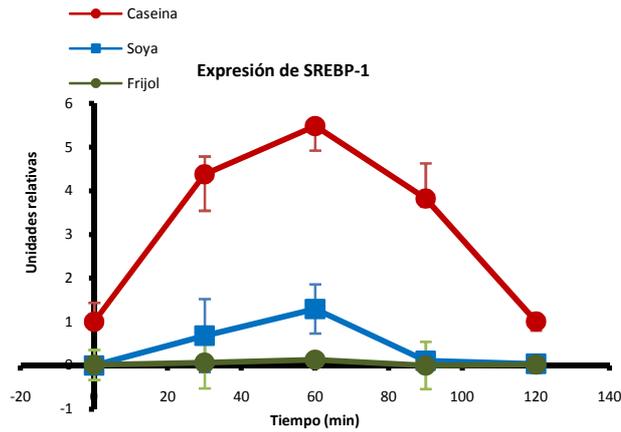


Figura 22 Expresión de SREBP-1 en hígado de rata

Como se observa en la figura 22 la expresión de SREBP-1 está claramente influenciada por el consumo de caseína, y en menor medida para la proteína de soya y el concentrado de proteína de frijol, en donde prácticamente no se alteran sus niveles de expresión.

Sin embargo la expresión de la FAS, que es un gen blanco de SREBP-1, no siguió las mismas tendencias, aunque al minuto 60, a semejanza de SREBP-1, FAS mostró una mayor expresión cuando las ratas consumieron caseína con respecto a aquéllas que consumieron proteínas de origen vegetal. De hecho las proteínas vegetales a los 60 minutos no indujeron una expresión mayor a la basal observada con caseína, lo cual se presenta en la figura 23.

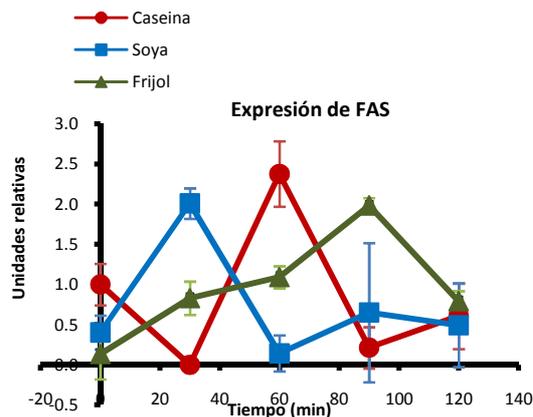


Figura 23 Expresión de FAS en hígado de rata

Conclusiones

Se obtuvo un concentrado de proteína de frijol negro cocido con 60.92% de pureza. El producto presenta una solubilidad muy baja, siendo la proteína soluble menor al 10% de la proteína total en un rango de pH de 2 a 11 y menor al 20% a pH 12. Por esto se propone su utilización en productos como barras de cereales principalmente que no necesitan de un producto muy soluble, donde mejoraría su perfil de aminoácidos dando un valor agregado a los productos desde el punto de vista nutricional. Con respecto a su capacidad de absorción tiene un valor de 1.5 ml/g para el agua y 0.5 ml/g para el aceite. Lo cual refleja una oportunidad en la baja absorción de aceite para evitar que los productos en donde se utilice contengan grandes cantidades de aceite. El contenido de flavonoides del concentrado es de 149.88 μ g/g con error estándar de \pm 0.017. Lo cual lo refleja como una fuente no muy alta de flavonoides, pero que si es un factor a considerar.

Los animales alimentados con una dieta balanceada en la cual la fuente de proteína fue únicamente el concentrado de proteína de frijol crece a la par de la proteína de soya y que la caseína, ya que no presenta diferencias significativas entre la proteína de soya y el concentrado de proteína de frijol, pero si presentan diferencia con respecto a la proteína control estándar que es la caseína. Con respecto a la pendiente de ganancia de peso en las ratas estudiadas, la proteína de frijol se encuentra por debajo del valor encontrado para caseína y por encima de la pendiente encontrada para proteína de soya, por lo cual se puede considerar de tan buena calidad como la proteína de soya, la cual es una de las proteínas vegetales consideradas con mejor calidad.

Las concentraciones de glucosa evitan picos tempranos como en el caso de caseína por lo cual puede promoverse un beneficio para evitar esta condición. Por su parte, con respecto a los triglicéridos hasta el momento no se puede aconsejar su consumo ya que parece presentarse un aumento, pero para los niveles de colesterol si genera una disminución.

Las concentraciones de insulina y glucagon en suero de rata para el grupo alimentado con proteína de frijol presentan una disminución en ambos, y su relación también presenta dicha disminución con respecto a la caseína y de manera similar al grupo alimentado con proteína de soya.

La expresión de SREBP-1 y de su gen blanco FAS se ven reducidas con el consumo de proteína de frijol. No es claro por qué las concentraciones de triglicéridos séricos en ayuno están elevadas, aunque estas concentraciones se encuentran dentro de lo que se considera niveles normales.

En el presente trabajo de investigación se obtuvo un concentrado de proteína de frijol negro cocido, el cual presentó un efecto aceptable para el crecimiento de animales experimentales. Los resultados de concentración de insulina, glucagon y su relación insulina/glucagon fueron menores en el grupo de animales alimentados con proteína de frijol con respecto al grupo control de caseína y similares al grupo de soya, por lo cual estas 2 fuentes proporcionan propiedades similares; para el caso del grupo alimentado con proteína de frijol la expresión de SREBP-1 y FAS se ve una tendencia de disminución para las proteínas de origen vegetal.

Perspectivas

Con respecto al proceso de aislamiento, se podrían realizar diversas pruebas buscando disminuir la cantidad de hidratos de carbono del producto para que se generara un aislado y no un concentrado de proteína; también se podrían evaluar las variables de tiempo de agitación de las mezclas harina/solución, para ver si de esa manera se pudieran disolver mayores concentraciones en plante piloto, mas similares a las obtenidas en el laboratorio.

En función de su baja solubilidad el concentrado de proteína de frijol se podría promover para elaborar productos tipo galletas o incluirlos en coberturas, por su color similar al chocolate, pero sería necesario evaluar el desarrollo de dichos productos.

Ante los resultados del crecimiento de ratas se puede promover el consumo de este tipo de proteína en la dieta así como se ha realizado para la soya, ya que no presenta diferencias estadísticas significativas en condiciones de crecimiento.

Ya que el concentrado presenta otros compuestos a parte de la proteína, una de las grandes líneas de futuras investigación sería el determinar y cuantificar los compuestos fenólicos, entre ellos flavonoides presentes, de manera específica, para investigar si los efectos observados se deben a una interacción proteína-flavonoide.

Este proyecto presenta un antecedente para explorar el metabolismo de las proteínas para reconocer como pueda generar el perfil de aminoácidos, diferencias en la expresión génica de

factores de transcripción ya que anteriormente se vio en el consumo de soya y con este proyecto se observa una tendencia similar para SREBP-1, y FAS.

Bibliografía

- Allen, O. A. (1981). *The Leguminosae. A source book of characteristics, uses and nodulation*. USA: University of Wisconsin Press.
- Asencio, C., Torres, N., Isoard-Acosta, F., Gómez-Pérez, F., Hernández-Pando, R., & Tovar, A. (2004). Soy Protein Affects Serum Insulin and Hepatic SREBP-1 mRNA and reduces Fatty Liver in Rats. *The Journal of Nutrition*, 134 (3), 522-529.
- Badui, D. (1993). *Química de los alimentos*. México: Pearson educación.
- Baiges, I., Palmfeldt, J., Bladé, C., Gregersen, N., & Arola, L. (2010). Lipogenesis is decreased by grape seed proanthocyanidins according to liver proteomics of rats fed a high fat diet. *Molecular and Cellular Proteomics*, 9, 1499-1513.
- Belmar, R., & Nava, M. (2009). *Factores antinutricionales*. Recuperado el 12 de Agosto de 2009, de Sistema de Información Agrícola Nacional, Venezuela:
http://www.sian.info.ve/porcinos/publicaciones/encuentros/viii_encuentro/roberto.htm.
- Blanco, A., & Bressani, R. (1991). Biodisponibilidad de aminoácidos en el frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 41 (1), 38-52.
- Bourges, R. (1999). *Composición de Alimentos Mexicanos*. México: INNSZ.
- Bourges, R. H. (2001). Los Alimentos y La Dieta. En E. e. Casanueva, *Nutriología Médica* (pág. 484). México: Panamericana.
- Bourges-Rodríguez, H. (1999). *Composición de Alimentos Mexicanos*. México: INNSZ.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Carrillo, P. C. (27 de Enero de 2008). El mexicano consume cada vez menos frijoles. *Vanguardia, Excelsior*.
- Casanueva, E., Kaufner-Horwitz, M., Pérez-Lizaur, A. B., & Arroyo, P. (2001). *Nutriología Médica*. México: Panamericana.
- Chiun-Chuang, R., & Chang, K. C. (1988). Effect of Selected Canning Methods on Trypsin Inhibitor Activity, Sterilization Value, and Firmness of Canned Navy Beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36 (5), 1015-1018.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159.
- DelPino, V. H., & Lajolo, F. M. (2003). Efecto inhibitorio de los taninos del frijol carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre la digestibilidad de la faseolina por dos sistemas multienzimáticos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23 (1), 49-53.
- Dergal, Z. (2010). Obtención y caracterización de la proteína de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*). México: Tesis UNAM.
- Develin, M. T. (2004). *Bioquímica*. España: Reverse S. A.
- Díaz-Batalla, L., Widholm, J. M., Fahey, G. C., Castaño-Tostado, E., & Paredes-López, O. (2006). Chemical Components with Health Implications in Wild and Cultivated Mexican Common Bean Seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (6), 2045-2052.
- FAOSAT. (2008). *Avance preliminar del mes de Mayo*. México: FAOSAT.
- Federación nacional de cultivadores de cereales y leguminosas. (2008). *Frijol*. Recuperado el 15 de Agosto de 2008, de Fenalce: http://fenalce.net/pagina.php?p_a=51
- Gomez Brenes, R. A., Nunez, E. I., Bressani, R., & Braham, J. E. (1983). Efectos de varios solventes sobre la extracción de las fracciones proteínicas del frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 33 (3), 503-518.
- Grotewold, E. (2006). *The Science of flavonoids*. Ohio, USA: Springer Columbus.
- Hernández, D. P., Martín, G. O., Rodríguez, P. V., & Ganeme, B. F. (1999). Aplicaciones de las lectinas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*, 15 (2), 91-5.
- Jacinto-Hernández, C., Hernández-Sánchez, H., Azpiroz-Rivero, H. S., & Acosta-Gallegos, J. A.-L. (2002). Caracterización de una población de líneas endogámicas de frijol común por su calidad de cocción y algunos componentes nutrimentales. *Agrociencia*, 36 (4), 451-459.
- Jaffé, W. (2008). Los Alimentos que América dió al mundo. En R. Bourges, *Historia de la Nutrición en América Latina* (pág. 41). México: SLAN.
- Jimenez, L., & Merchant, H. (2003). *Biología celular y molecular*. México: Pearson Educación.

- Jourdan, G., Noreña, C. P., & Brandelli, A. (2007). Inactivation of Trypsin Inhibitor Activity from Brazilian Varieties of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Science and Technology International*, 13 (3), 195-198.
- Koshy, A. S., & al, e. (2001). Flavonoids from *Garcinia cambogia* lower lipid levels in hypercholesterolemic rats. *Food Chemistry* (72), 289-294.
- Ludueña, B., Mastandrea, C., Chichizola, C., & Franconi, M. (2007). Isoflavonas en soja, contenido de daidzeína y genisteína y su importancia biológica. *Bioquímica y patología clínica*, 71 (1), 54-66.
- Mahan, & Escott-Stump. (2004). *Nutrición y Dietoterapia de, Krause*. México: Mc Graw-Hill.
- Mahan, E.-S. (2004). *Nutrición y Dietoterapia de, Krause*. México D.F.: McGRAW-HILL.
- Marin, T. M. (2007). *Monografía del frijol*. México: SDR Puebla.
- Martínez, J. I., & Villezca, B. P. (2003). La alimentación en México: Un estudio a partir de la encuesta nacional de ingresos y gastos de los hogares. *Revista de información y análisis* (21), 26-37.
- Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, J., & Tuñón, M. (2002). Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 6, 271-278.
- Mataix, J., Serra, L., & Aranceta, J. (2006). *Nutrición y Salud Publica*. Barcelona: Masson.
- Mc Leester, R. C., Hall, T. C., Sun, S. M., & Bliss, F. A. (1973). Comparison of globulin proteins from *Phaseolus vulgaris* with those from *Vicia faba*. *Phytochemistry*, 12 (1), 85-93.
- Meiners, C. R., Lau, H. C., Ritchey, S. J., & Murphy, E. W. (1976). The content of nine mineral elements in raw and cooked mature dry legumens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24 (6), 1126-1130.
- Morales-de León, J. C., Vázquez-Mata, N., Torres, N., Gil-Zenteno, L., & Bressani, R. (2007). Preparation and Characterization of Protein Isolate from Fresh and Hardened Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science*, 72 (2), C96-C102.
- Moreno, C. P. (1996). Estructura y formación de las semillas. En C. P. Moreno, *Vida y obra de granos y semillas*. México: Fondo de Cultura Económica.
- Mulvihill, E. E., Allister, E. M., Sutherland, B. G., Telford, D. E., Sawyez, C. G., Edwards, J. Y., y otros. (2009). Naringenin Prevents Dyslipidemia, Apolipoprotein B Overproduction, and Hyperinsulinemia in LDL Receptor-Null Mice With Diet-Induced Insulin Resistance. *Diabetes Journal*, 58 (10), 2198-2210.
- Múzquiz, M. (2008). *Las leguminosas en la nutrición*. Recuperado el 2 de Septiembre de 2008, de http://leguminosas.cesga.es/secciones/Documentacion/Las_leguminosa_sen_la_nutricion.pdf
- Noriega-López, L., Tovar, A., Gonzalez-Granillo, M., Hernandez-Pando, R., Escalante, B., Santillán-Doherty, P., y otros. (2007). Pancreatic Insulin Secretion in Rats Fed a Soy Protein Hig Fat Diet Depends en the Interaction between the Amino Acid Pattern and Isoflavones. *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (28), 20657-20666.
- Peluso, M. R. (2006). Flavonoids Attenuate Cardiovascular Disease, Inhibit Phosphodiesterase, and Modulate Lipid Homeostasis in Adipose Tissue and Liver. *Experimental Biology and Medicine*, 231 (8), 1287-1299.
- Popineau, Y., Bollecker, S., & Thebadin. (1988). Caractérisation biochimique et fonctionnelle des proteines de gluten desamodées partillement en conditions ménagées. *Sciences des aliments*, 8 (4), 411-430.
- Quandt, S. A. (2002). Influencias sociales y culturales sobre el consumo de alimentos y el estado nutricional. En Shils, *Nutrición en salud y enfermedad* (págs. 2067-2078). México: Mc Graw-Hill.
- Quinn, J., & Paton, D. (1979). A practical Measurement of Water Hydration Capacity of Protein Materials. *Food Research Institute, Agriculture*, 56 (1), 39-39.
- Rackis, J., & McGhee, J. (1975). *Biological Threshold Levels of Soybean Trypsin Inhibitors by Rat*. Mennesota: American Association of Cereal Chemists. Inc.
- Rivera, D. e. (1999). *Encuesta Nacional de Nutrición 1999*. México: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Rivera, D. e. (2001). *Encuesta Nacional de Nutrición 1999*. México: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Sangronis, E., Machado, C., & Cava, R. (2004). Propiedades funcionales de las harinas de leguminosas (*Phaseolus vulgaris* y cajan cajn) germinadas. *Interciencia*, 29 (2), 80-85.
- Satterlee, L. D. (1978). *Patente n° 4111927*. US.
- Saura, C. F. (1998). Effect of condensed tannins in the analysis of dietary fiber in carbo pods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6, 4303-4306.
- Serrano, J., & Goñi, I. (2004). Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional en la población guatemalteca. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54 (1), 36-44.
- Shellhorn, C., & Valdés, V. (1995). *Manual de la Lactancia para Profesionales de la Salud*. Chile: UNICEF.
- Shimano, H. (2001). Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Progress in Lipid Research*, 40 (6), 439-452.
- Takahashi, Y., Odbayar, T., & Takashi, I. (2009). A comparative Analysis of Genistein and Diadzein in Affecting Lipid Metabolism in Rat Liver. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 44 (3), 223-230.
- Tandon, O. B., Bressani, R., Scrimshaw, N., & LeBeau, F. (1957). Nutritive value of beans. Nutrients in Central America beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5 (2), 137-142.

- Thompson, M. D., Brick, M. A., McGinley, J. N., Jiang, W., Zhu, Z., & Wolfe, P. (2008). Mechanisms Associated with Dose-Dependent Inhibition of Rat Mammary Carcinogenesis by Dry Bean (*Phaseolus vulgaris*, L.). *The Journal of Nutrition* , 138 (11), 2091–2097.
- Torres-Acosta, J. F., Alonso-Diaz, M. A., Hostes, H., Sandoval-Castro, C. A., & Aguilar_Caballero, A. J. (2008). Efectos negativos y positivos del consumo de forrajes ricos en taninos en la producción en caprinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* , 9 (1), 83-90.
- Valencia, G., & Román, M. (2004). La fibra dietaria como un alimento funcional. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* , 11 (2), 12-17.
- Vega, T. (2004). *Guía para la elaboración de aceites comestibles, caracterización y procesamiento de nueces* . Bogotá: Convenio Andres Bello.
- Velasquez, M. T., & Bhatena, S. (2007). Role of Dietary Soy Protein in Obesity. *Intenational Journal of Medical Sciences* , 2 (4), 72-82.
- Velayutham, P., Babu, A., & Liu, D. (2008). Green Tea Catechins and Cardiovascular Health: An Update. *Current Medicinal Chemistry* , 15 (18), 1840-1850.
- Zhang, Y., Chen, A., Li, M., Chen, C., & Yao, Q. (2008). Ginkgo Biloba Extract Kaempferol Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. *Journal of Surgical Research* , 148 (1), 17-23.

Anexo 1 Análisis proximal de la harina de frijol



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN ANIMAL Y BIOQUÍMICA

LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS PARA ALIMENTOS

Av. Universidad No. 3000 México D.F. Tel. 5622-5907 y 5622-5879 Fax: 5622-5906

Constancia: DNAB-MV-127/10

Hoja 01/01

MA. ALEJANDRA QUIÑONES PEÑA
CERRO DE LOS REMEDIOS 102
COL. CAMPESTRE CHURUBUSCO
C.P. 04200
MÉXICO, D.F.

Muestra.: DNAB-MV-127
HARINA DE FRIJOL

Fecha de recepción: 16.06.10

Análisis Químico Inmediato*

| | |
|---------------------------------|--------|
| Materia seca | 92.26% |
| Humedad | 7.74% |
| Proteína Cruda (Nitrógeno*6.25) | 17.84% |
| Extracto Etéreo | 1.69% |
| Cenizas | 4.13% |
| Fibra Cruda | 3.76% |
| Extracto Libre de Nitrógeno | 64.84% |

Los resultados se expresan en Base Húmeda

*Método AOAC Químico Proximal (1990)

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria 23 de junio de 2010

Q. A. Águeda García Pérez
Responsable del Laboratorio

MPA, MVZ. Sergio C. Angeles Campos
Jefe del Depto. de Nutrición Animal y
Bioquímica

Esta constancia ampara únicamente la muestra analizada. Se prohíbe la reproducción total o parcial de la misma sin previa autorización escrita del responsable del laboratorio. La presente constancia no podrá ser utilizadas para fines legales.

FRP-DNAB-MV-002 Rev. 1

Anexo 2 Procesos de extracción de proteína

Proceso de Solubilización de proteínas a partir de frijol cocido.

Para conocer las condiciones de un proceso en autoclave similares al proceso culinario tradicional se realizaron pruebas a 20, 30, 40 y 50 minutos a 121°C con una relación 1/2, v/v, frijol/agua, y se observó que la consistencia y textura más similares a los frijoles cuando se consumen fue la que se obtuvo con 30 minutos. Para la elaboración del concentrado se utilizó como base la harina de frijol pasada por tamiz malla 40 para evitar los inconvenientes de tener que moler el producto después del proceso térmico.

Se tomó como punto de partida la cocción del frijol, en una relación 1/2, v/v, frijol/agua, la cual se realizó en autoclave a 121°C por 30 minutos. Posteriormente se llevó a pH 8 con NaOH 0.8N, ya que estudios anteriores (Dergal, 2010) se observó que se solubilizaba la mayor cantidad de proteína en función del pH, luego se centrifugó a 10,000 RPM, por 20 minutos a 4°C, el sobrenadante se llevó a pH 4 con HCl 1N y se centrifugó a 10,000 RPM por 20 minutos a 4°C y se seco el precipitado, y se obtuvo una cantidad de 0.5% de rendimiento.

Proceso de Solubilización de proteínas de frijol con enzimas

A partir de lo observado en el experimento anterior, se supuso que el almidón gelatinizado, presente en el frijol, después de su cocción pudiera estar evitando la solubilización de las proteínas a pH8, por lo cual se recurrió a la realización de un proceso enzimático, con las enzimas Licuamil 1200 y Glucozyme 400 donadas por la empresa ENMEX S.A. de C.V.

Para la utilización de las enzimas primero se realizaron pruebas de hidrólisis de almidón de cada una de ellas. El proceso empezó con la utilización de la enzima Licuamil 1200 y continuó con la enzima Glucozyme 400 así que las pruebas para obtener los valores óptimos se realizaron en el mismo orden.

Para poder medir los resultados de la hidrólisis se utilizó la siguiente curva patrón de DNS, hecha a partir de glucosa a concentraciones conocidas.

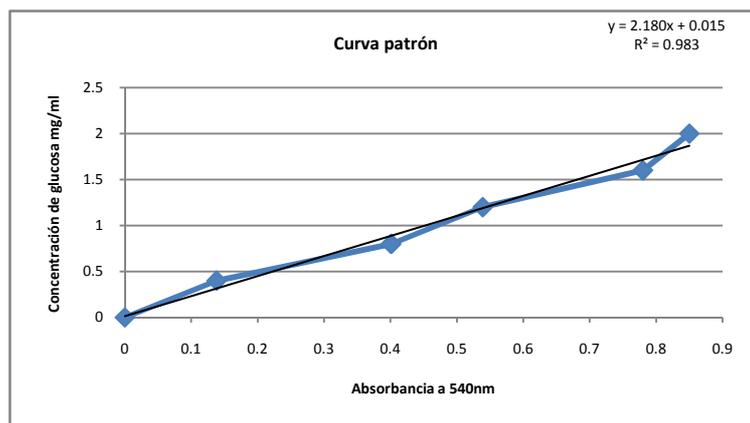


Figura A Curva patrón para DNS (glucosa)

Para la enzima Licuamil 1200 se utilizó almidón de maíz (Maizena®) gelatinizado por cocción en autoclave a 121°C por 30 minutos, en una relación 1 :10 p/v de almidón de maíz/agua destilada; posteriormente se realizó un proceso de mezclado con una licuadora a velocidad alta, adicionando una tercera parte del volumen de agua ocupado para el proceso de cocción. Una vez que se obtuvo la solución se hicieron pruebas a 70°C, con un pH6 a diferentes concentraciones, con agitación, por 30 minutos, que son las condiciones que recomienda el proveedor; a cada resultado se le hizo la prueba de DNS para ver el grado de hidrólisis del almidón, teniendo como base la curva patrón para DNS de glucosa. Los resultados obtenidos se observan en la siguiente Figura.

Figura B Curva de hidrólisis por Licuamil 1200 a diferentes concentraciones en 30 minutos

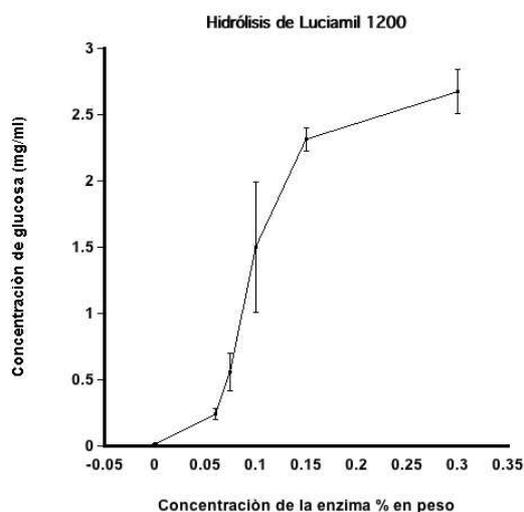


Figura B Curva de Hidrólisis por licuamil 1200)

A partir de la cual se considera que el punto a seleccionar es la concentración 0.15% de enzima con respecto al peso total del almidón.

La enzima Licuamil 1200 necesita la presencia de iones calcio, por lo cual se hicieron pruebas a diferentes concentraciones de este ión, para poder saber por cual optar, se realizaron los experimentos en las mismas condiciones, 0.15% de enzima con respecto al peso total del almidón, a 70°C, a pH 6, por 30 minutos, con la única variable de los iones de calcio, para lo cual se observó un comportamiento como se presenta en la Figura siguiente.

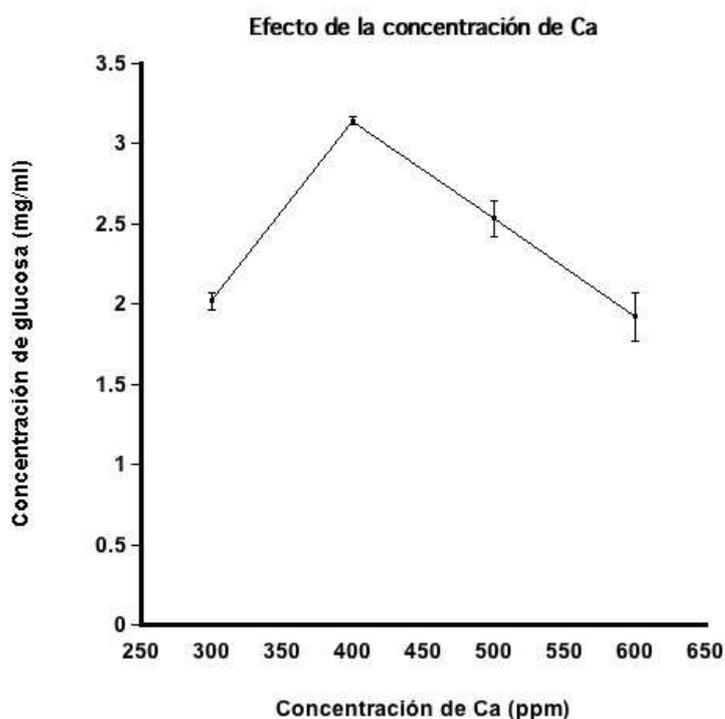


Figura C Efecto de la concentración de iones Ca con la enzima Licuamil 1200

De estos resultados se decidió que para esta enzima en 30 minutos la concentración a utilizar fue 0.15% del peso de la solución de Licuamil 1200 con respecto al peso del almidón en base seca, con una concentración de calcio de 400ppm en el medio.

Una vez definido el proceso de la enzima Licuamil 1200 se precedió a definir las condiciones para la utilización de la enzima Glucozyme 400. Se realizó el proceso de la enzima Licuamil 1200 a las muestras y posteriormente se llevaron a una temperatura de 60°C, con un pH 4.2, como recomienda el productor, y se realizaron pruebas a diferentes concentraciones de Glucozyme 400, tomando muestras a diferentes tiempos para poder evaluar el desarrollo de la actividad. Como se

presenta en la Figura D se hicieron muestreos en las 3 primeras horas y se observó una tendencia clara de aumento.

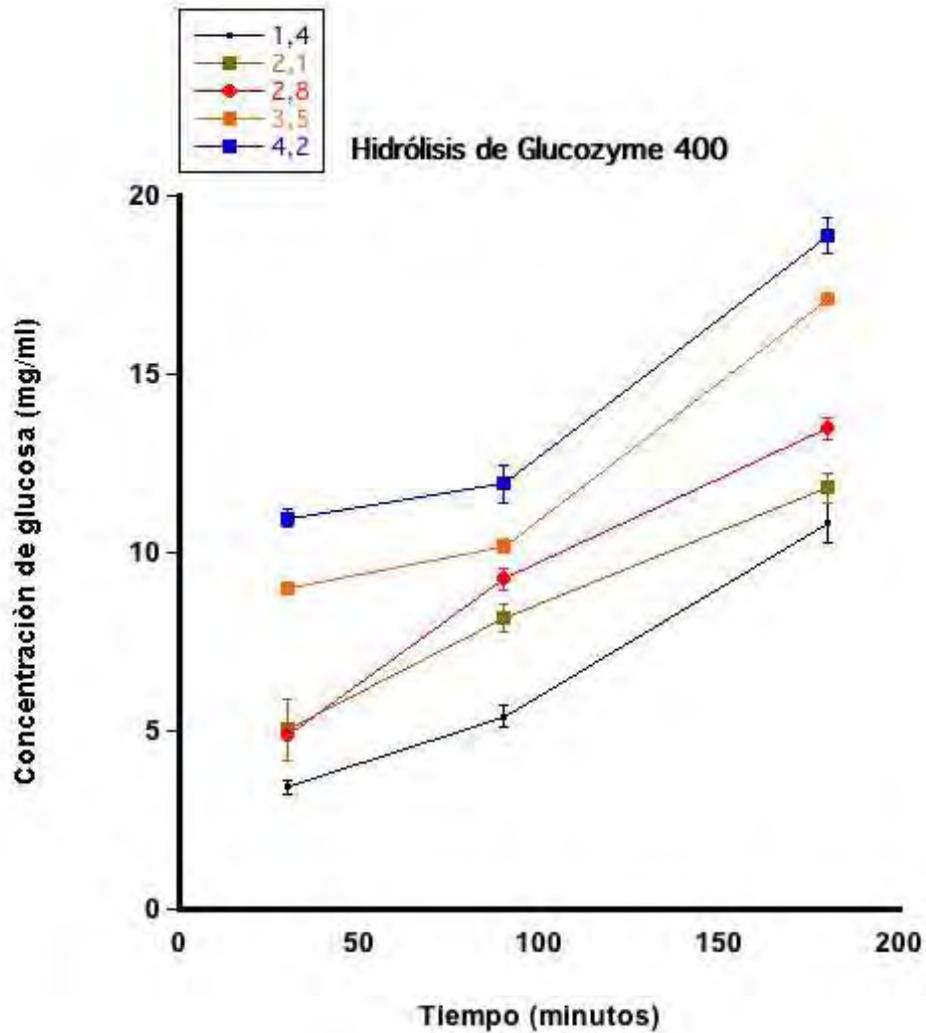


Figura D Hidrólisis de almidón con la enzima Glucozyme 400 a diferentes concentraciones por 3 horas

Una vez que se tuvieron estos resultados se decidió realizar otra prueba con concentraciones mayores y con un tiempo máximo de 4 horas, para lo cual se obtuvo lo que observamos en la Figura E

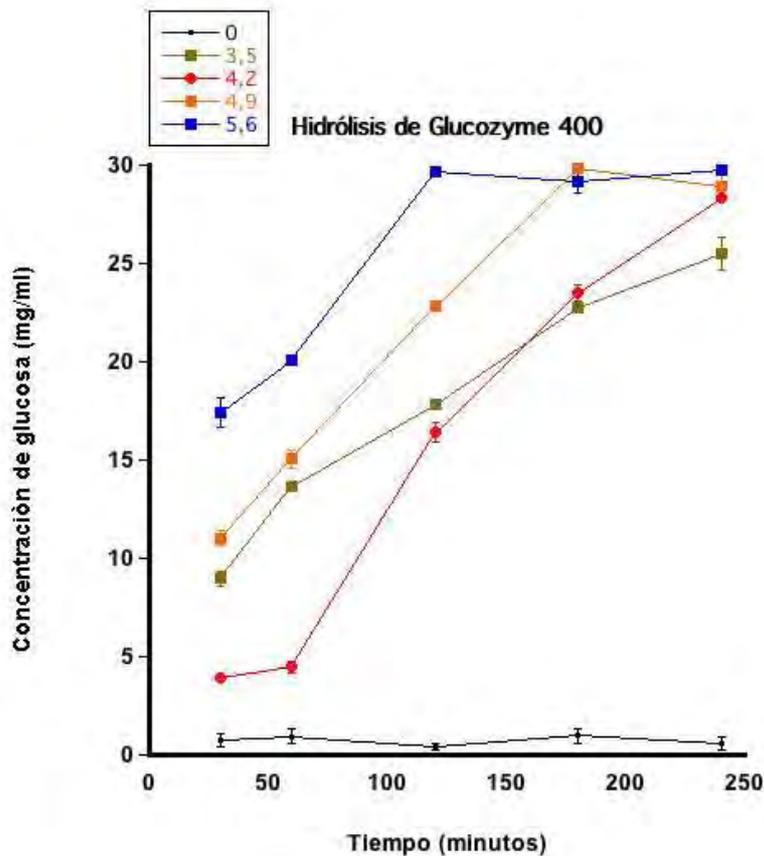


Figura E Hidrólisis de almidón con la enzima Glucozyme 400 a diferentes concentraciones por 4 horas

A partir de estos resultados se decidió utilizar una concentración de 5.6 $\mu\text{g/g}$ de almidón durante 2 horas para la hidrólisis en las condiciones de pH y temperatura recomendadas como óptimas de la enzima, antes mencionadas y provistas por la fuente de donación. Por último, la inactivación de las enzimas se hizo según sus indicaciones a 91°C por 30 minutos.

Una vez definido el proceso de hidrólisis del almidón, se hicieron las pruebas con harina de frijol, y agua destilada en una relación de 1:6 p/p respectivamente, utilizando una temperatura de 121°C durante 30 minutos en autoclave para la cocción de la harina. Posteriormente se realizó el proceso enzimático planteado y el resultado se llevó a pH 8 con NaOH 0.8N para solubilizar la proteína, lo cual se centrifugó a 10,000 RPM, durante 20 minutos a 4°C , Se desechó la pasta y al sobrenadante se le llevó a pH 4 con HCl 1N, buscando la precipitación de las proteínas. Posteriormente se centrifugó en las mismas condiciones, el sobrenadante se desechó y la pasta

residual se secó a 50°C en estufa por 12 horas, Se obtuvo un rendimiento en función del total de harina un 0.49%.

Al observar el bajo rendimiento se decidió realizar primero el proceso enzimático a la harina y después, en el momento de la inactivación, realizar la cocción. Se hizo una mezcla 1:7.5 gramos de harina : ml de agua destilada, para facilitar su manejo, con 400 ppm de Ca. Se mantuvo a 70°C, a pH 6, se añadió la enzima Licuamil 1200 a 0.15% y se dejó en agitación durante 30 minutos. Después se ajustó a un pH 4.2, y 60°C para agregar la enzima Glucozyme 400 en una proporción de 5.6 µl/g de almidón y se dejó actuar durante 2 horas. Una vez terminado el proceso enzimático se llevó a proceso térmico, simulando el proceso de cocción en autoclave a 121°C durante 30 minutos, con lo cual se inactivaron las enzimas. Al resultado de la cocción se le llevó a pH 8 con NaOH 0.8N para solubilizar la proteína, se centrifugó a 10,000 RPM durante 20 minutos a 4°C, se desechó la pasta y al sobrenadante se le llevó a pH4 con HCl 1N, se centrifugó en las mismas condiciones, el sobrenadante se desechó y la pasta residual se secó a 50°C en estufa por 12 horas. Se obtuvo un rendimiento en función del total de harina un 0.72%.

Al obtener en ambos casos rendimientos tan bajos se planteo la duda de ¿qué le estaría pasando a la proteína?, Ya que en otros experimentos se puede aislar con rendimientos mayores a los obtenidos en estos casos (Dergal, 2010). Así que se realizó un proceso de separación como el que se encuentra en la tesis de Dergal (2010) y una vez obtenido el concentrado de proteína se realizó el tratamiento térmico, con el cual se observó claramente la precipitación de la proteína y su insolubilidad a diferentes valores de pH, por lo cual se decidió perfeccionar el proceso de separación de la proteína en crudo y una vez concentrada hacer el tratamiento térmico antes del proceso de secado.

Proceso Mejoramiento del proceso de solubilización de proteínas a pH8

Tomando como punto de partida el método propuesto por Dergal (2010) se realizaron las siguientes modificaciones para obtener mayores rendimientos.

En el proceso de solubilización de Dergal (2010) se realiza un solo lavado a la harina de frijol en una relación 1:5 ajustando el pH a 8 con NaOH 0.8N, se centrifuga la mezcla a 10,000 rpm durante 20 minutos a 4°C, se recolecta el sobrenadante y se acidifica con HCl 1N hasta llegar a pH 4, lo cual se centrifuga en las mismas condiciones y se recolecta el precipitado que se seca con un ventilador, y de esta forma se obtiene un resultado de 10% de rendimiento en masa, en

promedio. Se supuso que pudiera obtenerse mayor cantidad de producto al realizar lavados sucesivos, así que se realizaron pruebas con diferentes números de lavados, dando los resultados que se observan en la siguiente tabla, donde se observan los rendimientos en función de la masa original, por lo cual se decidió realizar 3 lavados sucesivos en el proceso experimental de este trabajo.

Tabla A Rendimiento en masa de lavados sucesivos

| Número de lavados | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------------|-------|--------|--------|--------|
| Rendimiento | 7.43% | 11.82% | 14.36% | 14.72% |

En la parte del proceso que corresponde a la separación de proteína precipitada en la centrifugación se decidió investigar si una segunda centrifugación permitiría la precipitación de proteínas que no se encontraran en la primera pasta residual, pero no se obtuvo ningún precipitado, por lo cual se mantuvo el proceso como estaba.

Para conocer la cantidad de proteína que se quedaba contenida en el sobrenadante de la última centrifugación, donde se busca precipitar la proteína, se realizó precipitación de proteína con TCA al 100%, ya que el método de Biuret no es sensible a concentraciones bajas, el método de Lowry presenta interferencia con hidratos de carbono, el método de BCA ó Ácido bicinconinico presenta interferencias con azúcares reductores, la Absorción UV a 280 nm presenta interferencia con los flavonoides, mismo problema que ocurre con el método de Bradford. Al realizar la precipitación con TCA se obtuvo una pasta que se resuspendió para poder leer su concentración por medio del método de Bradford, lo cual dio un total de 0.72g/100g de proteína con respecto al total de la harina utilizada, que tenía 17.84% de proteína, así que solo se queda un 4.15% de la proteína total.

Se indagó si el tiempo de agitación presentaría cambios en la cantidad de proteína soluble, así que se realizó un experimento con 30 minutos y otro con una hora de agitación, los resultados del cual se presentan en la tabla B.

Tabla B Rendimiento a diferentes períodos de agitación

| Agitación 30 minutos | Agitación 60 minutos |
|----------------------|----------------------|
| 14.36% | 14.5% |

En función de estos resultados se decidió realizar la agitación únicamente por 30 minutos, ya que mayor tiempo no registró una diferencia sustancial en el rendimiento obtenido.

Para poder utilizar este producto en alimentación es necesario realizar un proceso térmico, para eliminar factores antinutricionales, por lo que a este proceso de extracción de proteínas antes de la etapa del secado, se le realizó un proceso térmico, simulando el proceso de cocción, en la autoclave para eliminar las sustancias antifisiológicas. Al introducir el precipitado de la centrifugación al proceso térmico se le resustituyó el volumen del sobrenadante eliminado por agua destilada. Cuando se terminó el proceso térmico se eliminó el sobrenadante de la precipitación, al que se le determinó la cantidad de proteína por precipitación de TCA 100% y Bradford. Se obtuvo un resultado de 0.07% del total de la proteína con respecto al total de la harina utilizada, lo que se consideró no valía la pena de recuperar.

Se decidió utilizar una temperatura de 50°C para el secado de la pasta para evitar altas temperaturas y, por consiguiente, alteraciones en el producto.

Se confirmó la pureza del producto final cuantificando proteína por el método Kjeldahl, y se obtuvo un 68% de pureza. Este resultado con lo cual se obtiene (68% de pureza * 14.36% de rendimiento = 9.76 g. Tomando en cuenta que la proteína del frijol es el 17.84% del total del grano, quiere decir que se recuperó aproximadamente el 56.95% de la proteína total del frijol.

Se exploraron entonces los métodos descritos en una patente (Satterlee, 1978) y por Gómez-Brenes *et al* (1983). A continuación se presentan los resultados obtenidos, así como las modificaciones que se les hicieron, cuando fue necesario y su justificación.

Proceso Patente US 4111927

Siguiendo la metodología descrita en esta patente, se mezcló una relación 1:5 (p/v) de harina de frijol y una solución de NaCl al 0.6%, con agitación durante 40 minutos. Posteriormente se centrifugó a 8500 rpm y se recolectó el sobrenadante, al cual se le llevó a una temperatura de

90°C con agitación y se le acidificó hasta llegar a un valor de pH 4. Se centrifugó a 8500 RPM y el precipitado se secó, dando un rendimiento del 9.99% en masa. Al no tener un valor mayor a 10% no se consideró necesario realizar el análisis de proteína ya que no se ocuparía este proceso a futuro.

Proceso de Extracción con diferentes solventes (Gómez-Brenes *et al*, 1983).

Se explica detalladamente en el cuerpo de la tesis. En el proceso a escala laboratorio se obtiene un rendimiento de 20% y una pureza de 70%,. Se modificó para planta piloto.

En función de todos los resultados se presenta la siguiente tabla.

Tabla C Rendimiento y pureza de los procesos a evaluados

| Proceso | Rendimiento en masa | Porcentaje de proteína del producto |
|--|---------------------|-------------------------------------|
| Solubilización de proteínas a partir de frijol cocido | 0.5% | - |
| Solubilización de proteínas de frijol con enzimas | 0.72% | - |
| Dergal (2010) | 10% | 70% |
| Mejoramiento del proceso de solubilización de proteínas a pH8 | 14.36% | 68% |
| Patente US 4111927 | 9.99% | - |
| Extracción con diferentes solventes NaCl-NaOH-H ₂ O | 20% | 70% |

Al ver estos resultados se decidió realizar el proceso de Extracción con diferentes solventes propuesto por Gómez-Brenes *et al* (1983), con las modificaciones evaluadas. Se puede ver que el rendimiento en masa es significativamente mayor, y el porcentaje de proteína del producto es la cantidad más alta junto con el de Dergal (2010).

Anexo 3 Análisis Fisicoquímicos



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN ANIMAL Y BIOQUÍMICA

LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS PARA ALIMENTOS

Av. Universidad No. 3000 México D.F. Tel. 5622-5907 y 5622-5879 Fax: 5622-5906

Constancia: DNAB-MV-050/10

Hoja 01/01

MA. ALEJANDRA QUIÑONES PEÑA
CERRO DE LOS REMEDIOS 102
COL. CAMPESTRE CHURUBUSCO

Muestra No.: DNAB-MV-050
CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE FRIJOL

Fecha de recepción: 26.02.10

Análisis Químico Inmediato*

| | |
|---------------------------------|--------|
| Materia seca | 91.48% |
| Humedad | 8.52% |
| Proteína Cruda (Nitrógeno*6.25) | 60.92% |
| Extracto Etéreo | 0.12% |
| Cenizas | 6.04% |
| Fibra Cruda | 0.45% |
| Extracto Libre de Nitrógeno | 23.96% |

Los resultados se expresan en Base Húmeda

*Método AOAC Químico Proximal (1990)

NA = No analizado

NC = No calculado

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria 04 de marzo de 2010

Q.A. Águeda García Pérez
Responsable del Laboratorio

MPA. MVZ. Sergio C. Angeles Campos
Jefe del Depto. de Nutrición Animal y
Bioquímica

Esta constancia ampara únicamente la muestra analizada. Se prohíbe la reproducción total o parcial de la misma sin previa autorización escrita del responsable del laboratorio. La presente constancia no podrá ser utilizadas para fines legales.

FRP-DNAB-MV-002 Rev. 1



"2010, Año de la Patria. Bicentenario del Inicio de la Independencia y Centenario del Inicio de la Revolución".

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

INFORME DE ENSAYO

Procedencia: **Departamento de Fisiología de la Nutrición**
Muestra: Muestra FR (INN-L12714)
Informe: 004/10/L
Recepción: 2010-02-10
Ensayo: 2010-02-10

| Toxicología: | Resultado | Referencia |
|---|-----------|--|
| Inhibidor de Tripsina (UIT/g de muestra) | 16422,09 | American Association of Cereal Chemists (AACC), 10ª Ed. 2001, 22-40 |

El resultado del ensayo se refiere exclusivamente a la muestra analizada.

A t e n t a m e n t e ,


Q.F.B. Silvia Ruiz Jiménez
Coordinadora del Área de
Laboratorios de Alimentos.


Dra. Josefina C. Morales de León
Jefe del Departamento de Ciencia y
Tecnología de los Alimentos.

Investigación
Tradición Servicio
Asistencia Docencia

- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C. P. 14000 México, D. F.
- Tel. 54-87-09-00

20007700



"2010, Año de la Patria. Bicentenario del Inicio de la
Independencia y Centenario del Inicio de la Revolución".

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

INFORME DE ENSAYO

Procedencia: **Departamento de Fisiología de la Nutrición**
 Muestra: Muestra F4 (INN-L12730)
 Informe: 004/10/L
 Recepción: 2010-02-24
 Ensayo: 2010-02-25

| Toxicología: | Resultado | Referencia |
|---|-----------|--|
| Inhibidor de Tripsina (UIT/g de muestra) | 1866,77 | American Association of Cereal Chemists (AACC), 10ª Ed. 2001, 22-40 |

El resultado del ensayo se refiere exclusivamente a la muestra analizada.

A t e n t a m e n t e ,

Q.F.B. Silvia Ruiz Jiménez
 Coordinadora del Área de
 Laboratorios de Alimentos.

Dra. Josefina C. Morales de León
 Jefe del Departamento de Ciencia y
 Tecnología de los Alimentos.

Investigación
 Tradición Servicio
 Asistencia Docencia

- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C. P. 14000 México, D. F.
- Tel. 54-87-09-00

20067700

Anexo 4 Descripción de Sondas

| Gen | Primers (5'-3') | Tamaño (pares de bases) | Producto | Especie | Número del banco de genes |
|-------------|---|-------------------------|--|---------|---------------------------|
| SREBP-1 | GGAGCCATGGATTGCACATT CGGCGCCAACAGTCGCA | 2868 | ADD1/SREBP-1c | Rata | AF286469 |
| FAS | AGAGAGACGGCAGCAGCGTC CTTGAGACTCTAG | 9143 | Fatty.acid synthase | Rata | X62888 |
| Ciclofilina | ACTTGCAATCAACCCCTTTC AAAAAAAAAAAAAAAA | 1325 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 1 | Rata | NM_001034188 |

Anexo 5 Consideraciones para el diseño de las dietas

Para la realización de las dietas se siguieron las indicaciones de la AIN-93 para animales en crecimiento. Este documento es el lineamiento internacional que especifica la cantidad, calidad y tipo de nutrimentos que se deben ocupar en las dietas experimentales para ratas.

Tomando en cuenta la fuente de proteína más compleja, que es el concentrado generado en este proyecto, son las siguientes.

Según la AIN-93 el 20% debe de ser de proteína, por lo cual si nuestro concentrado presenta un 60.92% de proteína se necesitan 32.83 gramos de concentrado para obtener 20 gramos de proteína, a partir de este dato, con los obtenidos en el proximal se puede estimar lo que se agregó de otros componentes. Composición de 32.83 gramos de concentrado: 20g de proteína / 7.86g de hidratos de carbono / 0.04g de lípidos / 0.15g de fibra. Para las fuentes de hidratos de carbono, como no se encuentran especificadas en el análisis proximal se divide entre la cantidad de fuentes de hidratos de carbono, es decir en este caso entre tres, lo que significa $7.86/3 = 2.62$ gramos que se restan a cada una de las fuentes, para almidón se requieren $39.75 - 2.62 = 37.13$ g de Malto dextrinas se requieren $13.2 - 2.62 = 10.58$ g y de Sacarosa se requieren $10 - 2.62 = 7.38$ g. Para realizara el cálculo de los lípidos, el requerimiento es de $7 - 0.04 = 6.96$ g; y por último para ajustar la fibra, el requerimiento es de $5 - 0.15 = 4.85$ g.