

**EFECTO DE VARIOS SOLVENTES SOBRE LA EXTRACCION
DE LAS FRACCIONES PROTEINICAS DEL FRIJOL
(*Phaseolus vulgaris*)¹**

***Roberto A. Gómez-Brenes², Elena Isabel Núñez³,
Ricardo Bressani⁴ y J. Edgar Brabam²***

**Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP),
Guatemala, C. A.**

RESUMEN

En el presente trabajo se informa de un estudio relacionado con el fraccionamiento por solubilidad de las proteínas del frijol negro (*Phaseolus vulgaris*), variedad S-19N, usando diferentes solventes: agua, hidróxido de sodio 0.01 M, cloruro de sodio 0.05 M, y etanol al 70^o/o.

Manuscrito modificado recibido: 5-7-83.

- 1 Este trabajo se llevó a cabo con fondos de la Research Corporation, Nueva York, N. Y., EUA (Subvención No. INCAP PN-740).**
- 2 Científicos de la División de Ciencias Agrícolas y de Alimentos del INCAP.**
- 3 Este trabajo se basa parcialmente en la tesis de graduación de la Licda. Núñez, egresada, en el grado de *Magister Scientifcae*, del Curso de Postgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, del Centro de Estudios Superiores en Nutrición y Ciencias de Alimentos (CESNA), Universidad de San Carlos de Guatemala/INCAP.**
- 4. Jefe de la citada División.**

Publicación INCAP E-1112.

La primera parte del ensayo consistió en establecer las condiciones más adecuadas para obtener el mayor porcentaje de extracción. Se encontró que para los solventes propuestos, éstas eran de una hora de agitación a temperatura ambiente, tres extracciones sucesivas con el mismo solvente, y una relación de peso de sólidos a volumen de solvente de 1:20.

Se estudió el efecto resultante de utilizar los solventes en forma secuencial para extraer las proteínas en forma fraccionada. Con este objeto, se compararon los porcentajes de extracción de proteína obtenidos empleando los solventes en las 24 secuencias posibles. Se encontró que las secuencias en las que el hidróxido de sodio figura como solvente inicial, rinden el mayor porcentaje de extracción (88.07), pero con muy poca o ninguna separación entre las fracciones que integran el contenido proteínico total del frijol; en cambio, la secuencia que ofrece a la vez el mayor rendimiento de extracción y la mejor separación de las proteínas es aquélla en la cual el etanol figura como tercer solvente (85.71%) y el hidróxido de sodio como cuarto solvente de extracción (80.53). Por otro lado, si el objetivo que se persigue es extraer la mayor cantidad de proteína, es indudable que el hidróxido de sodio resulta ser el solvente más adecuado para tal propósito.

Se sugiere, asimismo, la necesidad de uniformar la metodología de extracción de proteínas vegetales, a fin de obtener resultados comparables entre los laboratorios que se dedican a la investigación.

INTRODUCCION

Las proteínas del frijol, así como las de otras leguminosas, están constituidas por albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas, siendo la fracción globulínica la que se encuentra en mayor proporción (1). Por lo tanto, estas fracciones pueden ser separadas de acuerdo a sus características de solubilidad.

Osborne (2) fue el primero en aislar mediante este sistema dos fracciones de la proteína del frijol; al hacerlo, encontró 63% de globulinas y 8.5% de albúminas. Posteriormente, Waterman, Johns y Jones (3) identificaron una globulina que llamaron confaseolina, y que presentaba un alto contenido de azufre y una proporción extraordinariamente alta de lisina.

Stoikoff y Sweshtarowa-Dinewa, por su parte (4), determinaron las diversas formas de nitrógeno orgánico existentes en la harina de frijol. Los hallazgos revelaron que de un total de 4.77% de nitrógeno extraíble, 3.98% correspondía a nitrógeno proteínico, del cual 0.21% era nitrógeno de albúmina y 3.56% nitrógeno de globulinas.

La cualidad de extracción de las proteínas de leguminosas por medio de diferentes solventes fue investigada por Smith *et al.* (5), basándose en los métodos de Lund y Sandstrom (6), que utilizan una selección de solventes más o menos arbitraria. En el caso del frijol (*Phaseolus vulgaris*), estos autores encontraron un 24.20/o de proteína total distribuida en la siguiente forma: soluble en NaOH, 96.40/o; en fosfato disódico, 68.60/o; en cloruro de sodio, 76.20/o; en agua, 74.90/o; en etanol al 700/o, 8.20/o; y en ácido tricloroacético, 10.70/o. Estos resultados fueron confirmados por Powrie (7), quien informa acerca de rendimientos de extracción semejantes.

Por otro lado, Evans y Kerr (8) estudiaron el efecto del pH y de otros factores sobre la extracción de las proteínas del frijol, estableciendo que aproximadamente el 800/o del nitrógeno total era extraído por solventes neutros.

Estos mismos autores señalan que la extracción de proteína ocurrió a un pH de 3.8 y, de acuerdo con sus resultados, sugieren tres posibles métodos para aislar la proteína del frijol. El primero consiste en extraer la proteína con una solución de ácido clorhídrico y llevar a un pH de 3.8 para precipitar la proteína. El segundo método implica una extracción a un pH de 7.0 y una precipitación por ajuste del pH a 3.8; este procedimiento daría una proteína con menores cambios en su estructura, dadas las condiciones de neutralidad usadas para la extracción. Finalmente, el tercer método consiste en extraer con hidróxido de sodio o de potasio a un pH de 10-12 y precipitar por ajuste al pH de 3.8.

Otros investigadores como Jaffé y Hanning (9) fraccionaron las proteínas del frijol utilizando soluciones salinas para extraer la proteína y luego por electroforesis de flujo libre lograron separar varias fracciones: dos solubles en solución salina y nueve solubles en agua. Extracciones similares practicadas con las variedades roja y blanca de *Phaseolus vulgaris* acusaron patrones de separación muy diferentes. Con base en las consideraciones precedentes y dado que no existe uniformidad metodológica entre laboratorios para extraer y cuantificar las proteínas de leguminosas, se acordó realizar el trabajo aquí descrito, con el propósito de: a) obtener mayor información acerca de la cualidad de extracción de las proteínas del frijol en diferentes solventes, y b) buscar la secuencia de solventes más adecuada y las condiciones óptimas para la extracción y fraccionamiento de dichas proteínas.

MATERIALES Y METODOS

El material utilizado fue frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) de la variedad S-19N (20.3% de proteína) cultivado en la Finca Experimental del INCAP, situada a 1,400 m sobre el nivel del mar. Las muestras se almacenaron en un cuarto refrigerado a 5°C hasta el momento de practicar los análisis químicos correspondientes.

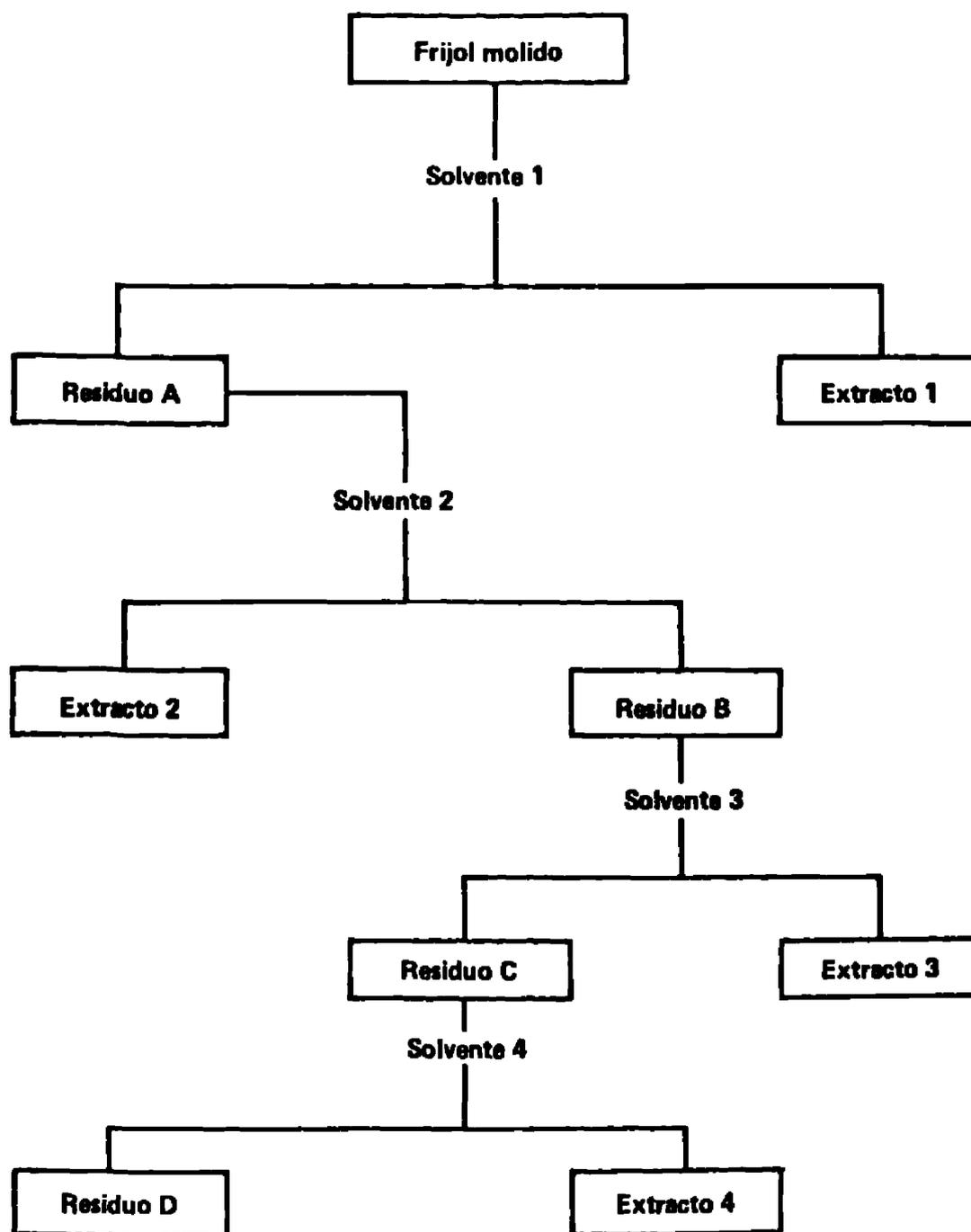
Se estudió el efecto de utilizar cuatro solventes en un sistema secuencial para extraer en forma fraccionada las proteínas del frijol, seleccionándose como solventes: agua destilada, hidróxido de sodio 0.01 M, cloruro de sodio 0.5 M, y etanol al 70% (6). Se siguió el sistema de fraccionamiento propuesto en la Figura 1, según el cual el residuo de extracción con un solvente se sometió a extracción con un segundo solvente, y así sucesivamente hasta utilizar los cuatro solventes propuestos. Se obtuvieron así cuatro extractos de una misma porción de material y un solo residuo.

Establecimiento de las Condiciones Óptimas de Extracción y Fraccionamiento

Con miras a encontrar las condiciones óptimas de extracción, se realizaron ensayos preliminares para determinar: a) tiempo de agitación; b) número de extracciones sucesivas con el mismo solvente antes de pasar al siguiente de la serie; y c) la mejor relación de sólidos a líquido. Para estos propósitos, se molió 1 kg de frijol crudo en un molino de platos (Lamilpa), y la harina así obtenida se utilizó tanto para los ensayos preliminares como para el estudio acerca del efecto resultante de utilizar los cuatro solventes ya mencionados en diferentes secuencias a fin de fraccionar la proteína del frijol.

Partiendo de una relación inicial de 1:6 (peso:volumen) (10), se extrajeron individualmente 10 g de harina de frijol durante 1, 1.5 y 2 horas, en un agitador mecánico con 60 ml de cada uno de los solventes seleccionados. Las suspensiones se dejaron reposar a una temperatura de 40°C durante 10 minutos, y luego se centrifugaron en una centrífuga refrigerada a 0°C durante 15 minutos a 2,000 rpm. Los sobrenadantes se recolectaron y analizaron para determinar su contenido de nitrógeno según el método de Kjeldahl (11).

Se determinó el número de extracciones sucesivas con el mismo solvente, requerido para obtener el rendimiento máximo de extracción empleando la misma relación de sólidos a solvente de



Incap 80-563

FIGURA 1

Separación de proteínas del frijol por extracción con distintos solventes

1:6. Cada muestra de 10 g de frijol se extrajo con 60 ml de cada solvente durante una hora, centrifugando en las mismas condiciones que las usadas en el ensayo anterior; se decantó el sobrenadante y se adicionó solvente fresco para repetir la operación cuatro veces consecutivas. En cada etapa se separó el sobrenadante para determinar el nitrógeno.

La relación más adecuada de sólidos a solvente para obtener un mayor rendimiento de extracción fue establecida aplicando cinco diferentes relaciones de peso a volumen: 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 y 1:25, respectivamente. Se realizaron tres extracciones sucesivas con el mismo solvente, utilizando los cuatro solventes propuestos y empleando para estas operaciones tubos de ensayo de 30 ml de capacidad. La agitación y centrifugación se realizó en la forma ya descrita, y los extractos obtenidos, 60 en total, fueron analizados por el método de micro Kjeldahl (11) para nitrógeno .

Extracción de Proteínas Usando Diferentes Secuencias de Solventes

A fin de estudiar el efecto que el uso de los cuatro solventes seleccionados en diferentes secuencias ejerce sobre la extracción de las proteínas del frijol, se trabajó sobre un diseño factorial aleatorizado. En la Tabla 1 se observan las 24 combinaciones factibles de obtener cambiando el orden de sucesión de los solventes mencionados; cada una de estas combinaciones o secuencias tuvo una réplica independiente, de manera que se estudió un total de 48 secuencias. El análisis estadístico se basó en el porcentaje de nitrógeno soluble extraído en cada etapa y en el porcentaje total de extracción, referido a la cantidad de nitrógeno presente en la muestra original.

Una vez determinadas las condiciones de tiempo de extracción, el número de extracciones sucesivas con el mismo solvente antes de pasar al siguiente solvente de la secuencia, y la relación de peso a volumen para obtener los mayores rendimientos de extracción, se procedió a la extracción de las proteínas usando los solventes en secuencia, según se ilustra en la Figura 1, para obtener la separación de las proteínas del frijol de acuerdo con su solubilidad. Para estos efectos se pesaron 48 muestras de 1 g de frijol; cada una de ellas se extrajo con 25 ml de solvente durante una hora, y a temperatura ambiente, dejándolas reposar en frío durante 10 minutos y centrifugando después a 0°C durante 15 minutos a 2,000 rpm. Este proceso se repitió tres veces con el mismo solvente antes de emplear el siguiente de la secuencia; consecuentemente, cada muestra fue extraída 12 veces, obteniéndose 75 ml de extracto de cada uno de los solventes. Mediante este procedimiento se obtuvo un total de 192 extractos en los cuales se determinó el nitrógeno.

TABLA 1

DIFERENTES COMBINACIONES DE SECUENCIAS DE SOLVENTES*

H ₂ O	NaCl	Et-OH	NaOH
H ₂ O	NaCl	NaOH	Et-OH
H ₂ O	Et-OH	NaCl	NaOH
H ₂ O	Et-OH	NaOH	NaCl
H ₂ O	NaOH	NaCl	Et-OH
H ₂ O	NaOH	Et-OH	NaCl
NaCl	H ₂ O	Et-OH	NaOH
NaCl	H ₂ O	NaOH	Et-OH
NaCl	Et-OH	NaOH	H ₂ O
NaCl	Et-OH	H ₂ O	NaOH
NaCl	NaOH	H ₂ O	Et-OH
NaCl	NaOH	Et-OH	H ₂ O
Et-OH	H ₂ O	NaCl	NaOH
Et-OH	H ₂ O	NaOH	NaCl
Et-OH	NaCl	H ₂ O	NaOH
Et-OH	NaCl	NaOH	H ₂ O
Et-OH	NaOH	H ₂ O	NaCl
Et-OH	NaOH	NaCl	H ₂ O
NaOH	H ₂ O	NaCl	Et-OH
NaOH	H ₂ O	Et-OH	NaCl
NaOH	NaCl	H ₂ O	Et-OH
NaOH	NaCl	Et-OH	H ₂ O
NaOH	Et-OH	H ₂ O	NaCl
NaOH	Et-OH	NaCl	H ₂ O

* Cloruro de Sodio, 0.5 M.

* Etanol (Et-OH), 70%.

* NaOH, 0.01 M.

RESULTADOS

Tiempo de Extracción

En la Tabla 2 se consignan los resultados de la determinación del contenido de proteína de los extractos obtenidos después de

1, 1.5 y 2 horas de agitación de la harina de frijol con agua, hidróxido de sodio, cloruro de sodio y etanol al 70%. Se encontró que después de dos horas de agitación, se obtenía en el extracto con agua 46.6% de la proteína soluble, lo que representa aproximadamente 2% más que la proporción de proteína extraída con sólo una hora de agitación. En el caso de la extracción con cloruro de sodio, después de dos horas de agitación se obtuvo 58% de proteína en el extracto, en contraste con 57% en el extracto obtenido después de una hora. Cuando el solvente era etanol, estos valores oscilaban entre 3.6% en el extracto de dos horas y 3.4% en el de una hora y, finalmente, para hidróxido de sodio, se encontraron valores de 64.3% después de dos horas y 62% después de una hora de agitación. Puede anotarse que la proporción de proteína extraída después de dos horas de agitación no es mucho mayor que cuando el tiempo de agitación es de una hora; por esta razón, y para propósitos prácticos, se seleccionó una hora como el tiempo de agitación adecuado para la extracción de proteínas.

TABLA 2

RENDIMIENTO DE EXTRACCION DE PROTEINA A DIFERENTES
TIEMPOS DE EXTRACCION

Solvente	o/o Proteína		
	T ₁	T ₂	T ₃
Agua	44.4	46.4	46.6
Cloruro de sodio	62.0	63.5	64.3
Etanol	3.4	3.8	3.6
Hidróxido de sodio	57.1	57.6	58.0

T₁ = 1 hora; T₂ = 1.5 horas; T₃ = 2 horas.

Relación muestra:solvente, 1:1.

Número de extracciones: 1.

Número de Extracciones Sucesivas

Se hicieron cuatro extracciones sucesivas de la misma porción de material, con los cuatro solventes mencionados, determinando el nitrógeno contenido en los 16 extractos obtenidos. La propor-

ción de proteína extraída en cada etapa por cada uno de los solventes se presenta en la Tabla 3. Según se observa, en la primera extracción se obtuvo la mayor proporción de proteína en todos los casos; para el agua este valor fue de 40^o/o; para hidróxido de sodio, 62^o/o; para etanol, 3.4^o/o; y en el extracto con cloruro de sodio, 57^o/o. Al extraer nuevamente con solvente fresco, se obtuvo una cantidad adicional de proteína que disminuyó progresivamente en cada etapa de extracción hasta que finalmente, después de cuatro extracciones, se obtuvieron valores de 1.8^o/o en el extracto acuoso, 2.4^o/o en el extracto de hidróxido de sodio, 1.4^o/o en el de etanol, y 2.1^o/o en cloruro de sodio. La suma de los porcentajes de proteína extraída en cada etapa representa el total de extracción. Es evidente que la proporción obtenida durante un período de agitación adicional es muy pequeña, por lo que para este trabajo se descartó una cuarta extracción. Sin embargo, si se pretende extraer del todo las prolaminas del frijol para estudiarlas separadamente, sería necesario hacer más extracciones con etanol.

TABLA 3

**EFFECTO DE EXTRACCIONES SUCESIVAS CON EL MISMO SOLVENTE
EN EL RENDIMIENTO TOTAL DE EXTRACCION**

Solvente	o/o Proteína extraída				Total
	Extr. No. 1	Extr. No. 2	Extr. No. 3	Extr. No. 4	
Agua	40.0	24.1	4.9	1.8	70.8
Hidróxido de sodio	62.0	13.7	8.8	2.4	86.9
Etanol	3.4	2.5	1.9	1.4	10.2
Cloruro de sodio	57.1	12.8	5.7	2.1	77.7

Relación muestra:solvente, 1:1.

Tiempo de extracción: 1 hora.

Relación Sólidos-Solvente

Aun cuando en los estudios sobre tiempo de extracción y número de extracciones sucesivas mencionados, se utilizó una relación de peso a volumen de 1:6 entre sólidos y solvente, según se

informó en trabajos previos (10), se consideró conveniente estudiar el efecto de diferentes proporciones entre éstos, con respecto al rendimiento de extracción de materia nitrogenada. En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos al calcular los porcentajes de extracción cuando se usan proporciones de 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 y 1:25 entre sólidos y solvente; los datos revelan que, en la primera extracción, a medida que el volumen de solvente aumenta con respecto a la cantidad de sólidos sometida a extracción, la proporción de proteína extraída también aumenta. Cuando el solvente es agua, si se usan 5 ml de solvente por gramo de harina en la primera extracción, se obtiene 32.60/o de proteína en el extracto, y después de tres extracciones sucesivas, el total extraído es de 86.80/o, en tanto que si el volumen utilizado para extracción es de 25 ml, en la primera etapa de extracción se obtiene 48.90/o y un rendimiento total de 780/o. Con cloruro de sodio se obtuvieron, para la primera etapa de extracción, valores de 54.70/o al usar 5 ml de solvente, y 78.60/o al emplear 25 ml. Para el hidróxido de sodio estos valores fueron de 55.30/o y 91.30/o, respectivamente, y con etanol se encontraron valores de 4.20/o cuando se usaron 5 ml, y 7.20/o, con 25 ml. A juzgar por estos resultados, es evidente que el rendimiento de extracción con hidróxido de sodio y etanol incrementa notablemente al aumentar el volumen de solvente con respecto a la cantidad de sólidos. Por otra parte, la separación entre extracto y residuo después de centrifugar se logra con mayor facilidad en estas condiciones.

En la Tabla 5 se aprecian los rendimientos totales de extracción, expresados como el promedio de estos valores encontrados para cada secuencia de extracción y su réplica independiente. Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos, y fue la secuencia cloruro de sodio, hidróxido de sodio-agua-etanol [2-4-1-3] la que ofreció un mayor rendimiento de extracción, con 94.70/o de proteína total extraída. En general, las secuencias en las que el hidróxido de sodio era el primer solvente, o el segundo de secuencia, ofrecieron los mayores rendimientos de extracción. La secuencia en la que se obtuvo menor rendimiento fue agua-etanol-hidróxido de sodio-cloruro de sodio [1-3-4-2], con 59.60/o de rendimiento total de extracción.

TABLA 4

EFECTO DE LA RELACION SOLIDO—SOLVENTE SOBRE EL RENDIMIENTO DE EXTRACCION

Solvente	Relación peso- volumen	o/o Proteína extraída			Total
		Extr. No. 1	Extr. No. 2	Extr. No. 3	
Agua	1:05	32.6	32.6	21.6	86.8
	1:10	44.4	24.8	6.6	75.8
	1:15	46.9	27.0	6.4	80.3
	1:20	46.8	27.0	5.9	79.7
	1:25	48.9	23.9	5.2	78.0
Cloruro de sodio 0.5M	1:05	54.7	23.7	6.5	84.9
	1:10	70.3	10.5	2.7	83.5
	1:15	73.3	11.1	1.6	86.0
	1:20	76.2	7.4	1.0	84.6
	1:25	78.6	5.9	1.3	85.8
Hidróxido de sodio	1:05	55.3	23.8	7.2	86.3
	1:10	74.8	17.8	3.3	95.9
	1:15	83.7	12.7	2.0	98.4
	1:20	87.5	10.8	0.0	98.3
	1:25	91.3	10.7	0.0	100.8
Etanol 70°/o	1:05	4.2	3.2	1.0	8.4
	1:10	6.4	2.6	1.2	10.2
	1:15	9.5	2.0	0.3	11.8
	1:20	12.8	1.0	0.0	13.8
	1:25	7.2	1.3	0.0	8.5

Tiempo de extracción: 1 hora.

DISCUSION

Extracción de Proteínas

En los trabajos realizados por diferentes investigadores sobre

TABLA 5

RENDIMIENTO TOTAL DE EXTRACCION DE LAS DISTINTAS
SECUENCIAS

Secuencia	\bar{x} o/o Prot.	DE	EE	Secuencia	\bar{x} o/o Prot.	DE	EE
2 4 1 3	94.75	9.10	6.43	1 2 3 4	82.88	1.83	1.30
4 3 1 2	94.58	4.65	3.29	4 1 3 2	82.39	2.42	1.71
4 2 1 3	93.12	3.21	2.27	2 3 4 1	82.33	4.40	3.11
4 3 2 1	92.57	3.18	2.25	2 1 4 3	81.97	1.47	1.04
2 4 3 1	88.80	2.67	1.89	4 1 2 3	80.31	4.02	2.84
1 4 3 2	88.54	4.29	3.04	1 3 2 4	79.40	1.71	1.21
2 3 1 4	87.19	8.70	6.15	3 2 1 4	77.26	10.38	7.34
2 1 3 4	86.24	3.61	2.55	1 4 2 3	75.92	6.08	4.30
4 2 3 1	85.43	2.89	2.04	3 1 4 2	71.10	0.94	0.67
3 4 2 1	84.91	14.31	10.12	3 1 2 4	70.19	3.90	2.76
3 4 1 2	84.25	17.02	12.04	3 2 4 1	66.13	0.86	0.61
1 2 4 3	83.90	2.70	1.97	1 3 4 2	59.60	7.80	5.54

1 = Agua.

2 = Cloruro de sodio, 0.5 M.

3 = Etanol, 70%.

4 = Hidróxido de sodio, 0.01 M.

DE = Desviación estándar.

EE = Error estándar.

extracción y fraccionamiento de leguminosas y cereales (8, 12, 13) por medio de métodos de extracción por solubilidad diferencial, se aprecia que la selección de solventes, así como la secuencia en que éstos fueron utilizados, ha sido más o menos arbitraria (5). Existen varios factores que afectan la solubilidad del nitrógeno: temperatura, pH del sistema, método de agitación, etc., que han sido objeto de otros estudios (4, 14), pero se conoce relativamente poco acerca del efecto que el orden de sucesión de los solventes pudiese ejercer sobre la solubilidad de las proteínas al realizar estudios de fraccionamiento. Los datos recabados en este estudio demuestran la importancia de considerar este factor cuando lo que se persigue es la separación de las proteínas por solubilidad diferencial.

Los estudios sobre tiempo de extracción, y efecto de la relación sólido-solvente en el rendimiento de extracción de constituyentes nitrogenados, coincide con los datos de que informan Molina, Argueta y Bressani (14) y Powrie (7). Este último autor, trabajando con solución de hidróxido de sodio 0.02 M, encontró rendimientos de extracción de 81.0%, 7.90% y 1.60% de los constituyentes nitrogenados de la harina de frijol en la primera, segunda y tercera extracción efectuadas sucesivamente. Estos datos son similares a los obtenidos en este trabajo cuando las extracciones se llevaron a cabo con una relación sólido-solvente de 1:15 con hidróxido de sodio 0.01 M.

En cuanto a la eficiencia de cada uno de los solventes sometidos a estudio para solubilizar los constituyentes nitrogenados del frijol, nuestros resultados coinciden con los de Smith *et al.* (5). Dichos autores señalan al hidróxido de sodio como el mejor solvente para extraer la mayor proporción de nitrógeno soluble, ya que el pH de la solución favorece la solubilización de la proteína; le siguen el cloruro de sodio, el agua y el etanol en cuanto a eficiencia individual para extraer las proteínas de leguminosas.

Se mencionó ya la importancia de considerar la secuencia en el uso de estos solventes, si el objetivo es el de separar los constituyentes proteínicos de acuerdo a su solubilidad. Los hallazgos en el estudio aquí descrito, indican que en aquellas secuencias en las que el hidróxido de sodio fue utilizado como solvente inicial, no se pudo obtener una separación de proteínas por solubilidad diferencial, puesto que en el extracto alcalino se encuentra casi todo el nitrógeno soluble. El etanol como solvente inicial en una separación de proteína también presenta problemas, puesto que disminuye apreciablemente el rendimiento de extracción de cualquier solvente que se utilice inmediatamente después, probablemente por desnaturalización de las proteínas no solubles en alcohol (1). La naturaleza de la materia nitrogenada presente, soluble en etanol, no ha sido aún bien determinada. Powrie (7) no encontró prolaminas, y Smith *et al.* (5) concluyen que en la mayoría de los casos es nitrógeno no proteínico.

En lo referente al agua y cloruro de sodio, se encontró que la proporción de material nitrogenado extraído era semejante, independientemente del orden en que se usaran ambos solventes. Lund y Sandstrom (6) efectuaron extracciones fraccionadas de proteínas de leguminosas con agua destilada y cloruro de potasio al 50%; sus resultados coinciden con los obtenidos en este estudio cuando esos solventes se utilizan en la misma secuencia. De

acuerdo a Osborne (2), 8.50/o de la proteína del frijol es albúmina y 630/o es globulina; por lo tanto, puede asumirse que el agua extrae parte de las globulinas del frijol, así como albúmina y nitrógeno no proteínico; posiblemente ello se debe a que las sales presentes en la semilla, al solubilizarse en agua, proporcionan un medio que favorece la extracción tanto de albúminas como de globulinas (15). En la Tabla 6 se observa que el patrón de extracción de material nitrogenado es semejante si se usa agua antes de cloruro de sodio que cuando se invierte este orden de sucesión en cualquiera de las secuencias; esto puede ser evidencia de que hay poca o ninguna separación entre albúminas y globulinas por solubilidad diferencial en el caso de las proteínas del frijol. Los estudios de Pant y Tulsiani (13) confirman estas observaciones.

TABLA 6

RENDIMIENTO DE EXTRACCION DE LAS SECUENCIAS EN QUE
NaOH SE UTILIZA EN LA ETAPA FINAL DE EXTRACCION

Secuencia	o/o Proteína extraída				Total
	1er. paso	2o. paso	3er. paso	4o. paso	
2 3 1 4	74.51	3.44	0.0	9.26	87.20
2 1 3 4	73.06	4.82	0.0	4.10	81.97
1 2 3 4	73.82	5.18	0.0	3.89	82.88
1 3 2 4	65.00	5.11	2.32	7.02	79.44
3 1 2 4	9.48	43.25	10.58	11.53	74.83
3 2 1 4	8.83	41.28	0.0	16.03	66.13

- 1 = Agua.
- 2 = Cloruro de sodio, 0.5 M.
- 3 = Etanol, 700/o.
- 4 = Hidróxido de sodio, 0.01 M.

Los datos resultantes de este trabajo sugieren la importancia de uniformar la metodología de extracción de las proteínas vegetales entre las distintas instituciones y laboratorios que se dedican a investigación, a fin de que los resultados que se obtenga en un

laboratorio sean comparables con los obtenidos en otro. Si no se sigue una misma secuencia de solventes, número de extracciones con el mismo solvente, tiempo de agitación y relación sólido-solvente, los resultados serán diferentes entre laboratorios, tal como sucede actualmente. Además, el fraccionamiento de las proteínas de los alimentos tiene cada día mayor importancia nutricional, ya que de esta forma puede determinarse el aporte de aminoácidos esenciales de cada fracción, sirviendo esta información de base para la planificación de programas de fitomejoramiento.

SUMMARY

EFFECT OF DIFFERENT SOLVENTS ON THE EXTRACTION OF PROTEIN FRACTIONS OF BEANS (*Phaseolus vulgaris*)

A study was carried out to determine the effect of different solvents on the extraction of protein fractions in beans. Black bean protein was extracted with the following solvents: distilled water, 0.01 M sodium hydroxide, 0.05 M sodium chloride, and 70% ethanol. By using each solvent under different conditions, it was possible to establish the optimum ones for the best extraction and fractionation of proteins from leguminous seeds. These conditions were the following: one hour agitation at room temperature, three successive extractions with the same solvent, and a ratio of solid to solvent of 1:20 W/V.

The effect of 24 different sequences of solvents upon the extraction of protein was also investigated. From the extraction point of view, the best sequence of solvents for extracting the protein was that where NaOH constituted the first solvent used; this sequence, however, has the disadvantage of extracting all the protein from the seed, making it impossible to separate other protein fractions by another solvent. If the purpose of the extraction is to separate different protein fractions, the best sequence of solvents is distilled water or sodium chloride in the first place, followed by ethanol and sodium hydroxide. The need for using standardized methodology for the fractionation of protein from seeds in order to obtain comparable data between research laboratories is emphasized.

BIBLIOGRAFIA

1. Bondi, A. Plant proteins. En: *Processed Plant Protein Foodstuffs*. A. M. Altschul (Ed.). New York, Academic Press Inc. Publishers, 1958, p. 43-66.

2. Osborne, T. B. *J. Am. Chem. Soc.*, **16**: 633-703, 757, 1894. Citado en: Evans, R. J. & H. Kerr. Extraction and precipitation of nitrogenous constituents of dry navy beans. *J. Agr. Food Chem.*, **11**: 26-29, 1961.
3. Waterman, H. C., C. O. Johns & D. B. Jones. Conphaseolin. A new globulin from the navy bean, *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol. Chem.*, **55**: 93-104, 1923.
4. Stoikoff, S. & M. Sweschtarowa-Dinewa. Bean proteins. *Nahrung*, **3**: 193-198, 1959.
5. Smith, Jr. C. R., F. R. Earle, I. A. Wolff & Q. Jones. Comparison of solubility characteristics of selected seed proteins. *J. Agr. Food Chem.*, **7**: 133-136, 1959.
6. Lund, A. P. & W. M. Sandstrom. The proteins of various tree seeds. *J. Agr. Res.*, **66**: 349-355, 1943.
7. Powrie, W. D. Extraction of nitrogenous constituents from the navy bean seed (*Phaseolus vulgaris*). *J. Agr. Food Chem.*, **9**: 67-69, 1961.
8. Evans, R. J. & H. Kerr. Extraction and precipitation of nitrogenous constituents of dry navy beans. *J. Agr. Food Chem.*, **11**: 26-29, 1961.
9. Jaffé, W. G. & K. Hanning. Fractionation of proteins from kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Arch. Biochem. Biophys.*, **109**: 80-91, 1965.
10. Elías, L. G., S. Sánchez L. & R. Bressani. Estudio comparativo de diferentes métodos para evaluación del valor proteico de harinas de semilla de algodón. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, **19**: 279-297, 1969.
11. Association of Official Agricultural Chemists. *Official Methods of Analysis of the AOAC*. 9th ed. Washington, D. C., The Association, 1960, 832 p.
12. Mertz, E. T. & R. Bressani. Studies on corn proteins. I. A new method of extraction. *Cereal Chem.*, **34**: 63-69, 1957.
13. Pant, R. & D. R. P. Tulsiani. Solubility, amino acid composition, and biological evaluation of proteins isolated from leguminous seeds. *J. Agr. Food Chem.*, **17**: 361-366, 1969.
14. Molina, M. R., C. E. Argueta & R. Bressani. Extraction of nitrogenous constituents from the Jack Bean (*Canavalia ensiformis*). *J. Agr. Food Chem.*, **22**: 309-312, 1974.
15. Adriaanse, A. & J. E. Robbers. Characterisation and fractionation studies on seed proteins of some of the leguminosae by starch-gel electrophoresis. *J. Sci. Food Agr.*, **21**: 126-127, 1970.