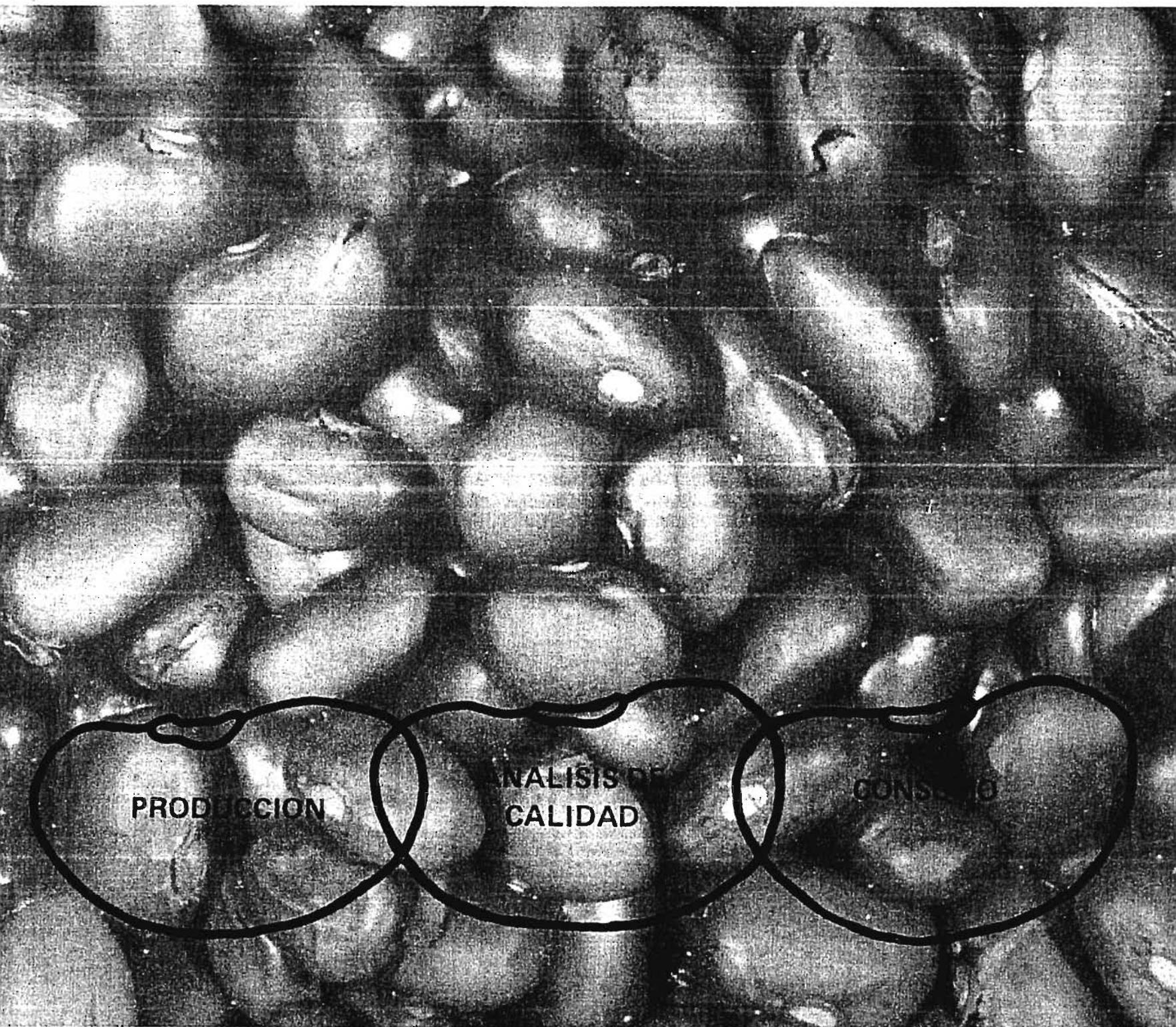
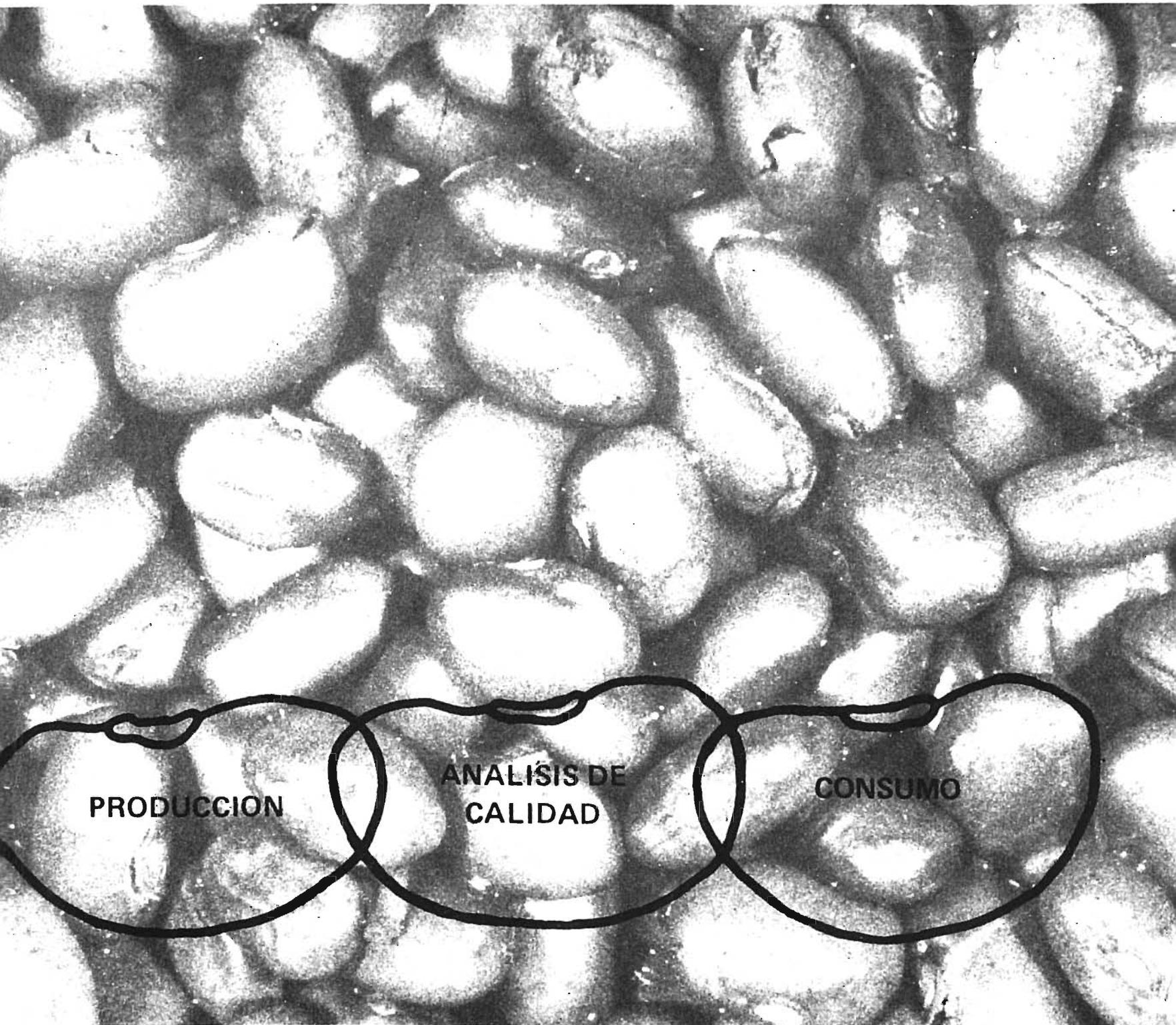


MÉTODOS PARA ESTABLECER CALIDAD TECNOLOGICA Y NUTRICIONAL DEL FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*)



Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá
(INCAP)
Apartado Postal 1188, Guatemala, C. A.

METODOS PARA ESTABLECER CALIDAD TECNOLOGICA Y NUTRICIONAL DEL FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*)



Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá
(INCAP)
Apartado Postal 1188, Guatemala, C. A.

21 MAR. 1986

**METODOS PARA ESTABLECER LA CALIDAD
TECNOLOGICA Y NUTRICIONAL DEL FRIJOL**

L. G. Elías, A. García-Soto y R. Bressani

**Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá
(INCAP)
Apartado Postal 1188, Guatemala, C. A.**

Publicación L-33

AGRADECIMIENTOS

La información descrita en este documento y aquella obtenida directamente a través de investigaciones realizadas por el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), fueron posibles gracias a la ayuda parcial recibida del Proyecto BEAN-COWPEA CRSP Título XII y por la ayuda parcial del Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (CIID), del Canadá.

La publicación de este documento fue posible gracias a la ayuda parcial suministrada por la Dirección del INCAP.

CONTENIDO

CARACTERIZACION TECNOLOGICA

Métodos Físicos

- **Peso de grano**
- **Tamaño de grano**
- **Distribución por tamaño de grano**
- **Porcentaje de cáscara**
- **Absorción de agua**
- **Tiempo de cocción Mattson modificado**
- **Tiempo de cocción evaluación sensorial**
- **Índice de tiempo de cocción**
- **Espesor de caldo**
- **Índice de espesor de caldo**
- **Referencias**

CARACTERIZACION NUTRICIONAL

Métodos Químicos

- **Nitrógeno**
- **Lisina disponible**
- **Actividad inhibidora de tripsina**
- **Actividad de hemaglutinina**
- **Taninos y polifenoles**
- **Azufre total**
- **Metionina disponible**
- **Metionina total**
- **Cistina**
- **Triptofano**
- **Digestibilidad "in vitro" de proteína**
- **Referencias**

Métodos Biológicos

- **Evaluación biológica calidad proteína**
- **Ensayos humanos para calidad proteínica**
- **Referencias**

METODOS PARA ESTABLECER LA CALIDAD TECNOLOGICA Y NUTRICIONAL DEL FRIJOL

L. G. Elías, A. García-Soto y R. Bressani

INTRODUCCION

Es bien conocido que la base de la dieta de los grandes sectores de la población Latino Americana así como de otros países en proceso de desarrollo, descansa en los alimentos básicos, que son los cereales y las leguminosas de grano. Los cereales de mayor consumo son el maíz, el arroz, el sorgo y aunque no necesariamente de producción nacional, el trigo. Son varias las leguminosas de grano consumidas por la población, sin embargo, en América Latina, el frijol común ocupa una posición preferencial sobre otras leguminosas. Los cereales para ser consumidos son procesados y transformados en formas clásicas como la tortilla, el pan, el arroz cocido o la papilla de sorgo. Estos productos de consumo deben llenar las características de aceptabilidad del consumidor y son características que los cereales deben tener antes de ser distribuidos para su producción por los centros que se dedican a esta actividad. Por esta razón es que se le está dando más importancia a lo que se ha venido llamando calidad de grano, concepto que se está tomando mucho en consideración en programas de fitomejoramiento genético y que es de la mayor importancia para el consumidor, ya sea éste el ama de casa, o el industrial.

Mucho es lo que en calidad de grano se ha logrado con los cereales, sin embargo, poco existe con respecto al frijol. Aunque una razón lo constituye el hecho de que se hace relativamente menos investigación en frijol que en cereales, el problema de frijol es más complejo por el gran número de tipos, colores y tamaños que se consumen. Además los problemas de postcosecha, en particular de almacenamiento agravan la calidad de grano en las leguminosas, siendo entonces más difícil proponer metodologías fáciles de realizar, completamente indicativas de características de aceptabilidad y que llenen las expectativas de todos los consumidores tanto en el hogar como en la industria.

Las medidas que se publican en este documento no incluyen todas las que se consideran necesarias para medir la calidad del frijol. Existen otras de naturaleza física, química y/o biológica en las cuales los métodos todavía están en desarrollo y por lo tanto, serán objeto de publicaciones posteriores. Tal es el caso del color, brillantez y dureza del grano, color del caldo de cocción y espesor de la cáscara. Sin embargo, creemos que en los momentos actuales es importante publicar la metodología ya estudiada con la finalidad de que las mismas sean utilizadas y probadas en los diferentes laboratorios. Desde luego, que esta publicación debe ser vista como el inicio de un proceso dinámico en el cual la experiencia y la crítica de los demás investigadores contribuirá significativamente al mejoramiento y a la expansión de la metodología presentada.

Este primer documento describe una serie de medidas que se han seleccionado con el fin de definir calidad de grano en el frijol. Muchas de las pruebas en el documento son originarias de muchos investigadores sometidas a prueba en el INCAP, y otras son de origen de esta institución. El concepto de calidad de grano que se expone en este documento es uno más amplio que el convencional, descrito como calidad tecnológica y nutricional del grano de frijol. Por consiguiente, la metodología descrita responde a ese concepto. También se pretende con este documento lograr una unificación de criterios a través de una metodología común y probada para definir calidad de grano de frijol entre laboratorios de investigación agrícola, de almacenamiento, procesamiento y utilización biológica del frijol.

CONSIDERACION:

Es importante en lo posible, obtener la siguiente información sobre la muestra para ir conjunta a los análisis que se proponen: nombre o identificación del cultivar; lugar y fecha de siembra; fecha de cosecha, tratamiento postcosecha, edad y condiciones de almacenamiento.

PESO DE GRANO

A. DEFINICION

Peso promedio de 100 granos de frijol, expresado en gramos.

B. APLICACION

Para todo tipo de frijol seco (1).

C. APARATOS

Balanza analítica, con precisión de 0.1 mg.

D. PREPARACION DE LA MUESTRA

Seleccionar al azar 3 muestras de 100 granos de frijol.

E. PROCEDIMIENTO

Pesar la muestra de 100 granos.

F. CALCULOS

Valor promedio y desviación estándar de las tres repeticiones.

Nota: el peso individual de 25 granos proporciona más información sobre la variabilidad dentro de la muestra que el peso medido en grupo de 25 granos.

G. VALORES DE REFERENCIA (2)

Grano de frijol común negro con peso promedio menor de 0.193 g	=	grano pequeño
de 0.193 a 0.217 g	=	grano mediano
mayor de 0.217 g	=	grano grande

Grano de frijol común rojo con peso promedio menor de 0.211 g	=	grano pequeño
de 0.211 a 0.247 g	=	grano mediano
mayor de 0.247 g	=	grano grande

TAMAÑO DE GRANO

A. DEFINICION

Desplazamiento de volumen de una muestra de 100 granos de frijol.

B. APLICACION

Frijol seco crudo o frijol remojado (3).

C. APARATOS

- Recipiente con volumen conocido.
- Suficiente cantidad de semilla de chan (*Salvia hispánica*), u otra semilla pequeña, para llenar el recipiente.
- Probeta graduada.

D. PROCEDIMIENTO

- Llenar el recipiente con la semilla, golpeando 2 veces el fondo para su apelmazamiento.
- Vaciar la mitad de la cantidad de semilla del recipiente, controlando que no hayan pérdidas de semilla.
- Colocar la muestra de frijol dentro del recipiente con semilla.
- Con la porción de semilla vaciada llenar nuevamente el recipiente.
- Cuantificar con la probeta la cantidad de semilla que desplazó la muestra de frijol.
- Efectuar 3 mediciones por muestra.

E. CALCULOS

Expresar el promedio del volumen remanente de semilla (en ml.) dividido entre 100 como el tamaño del grano.

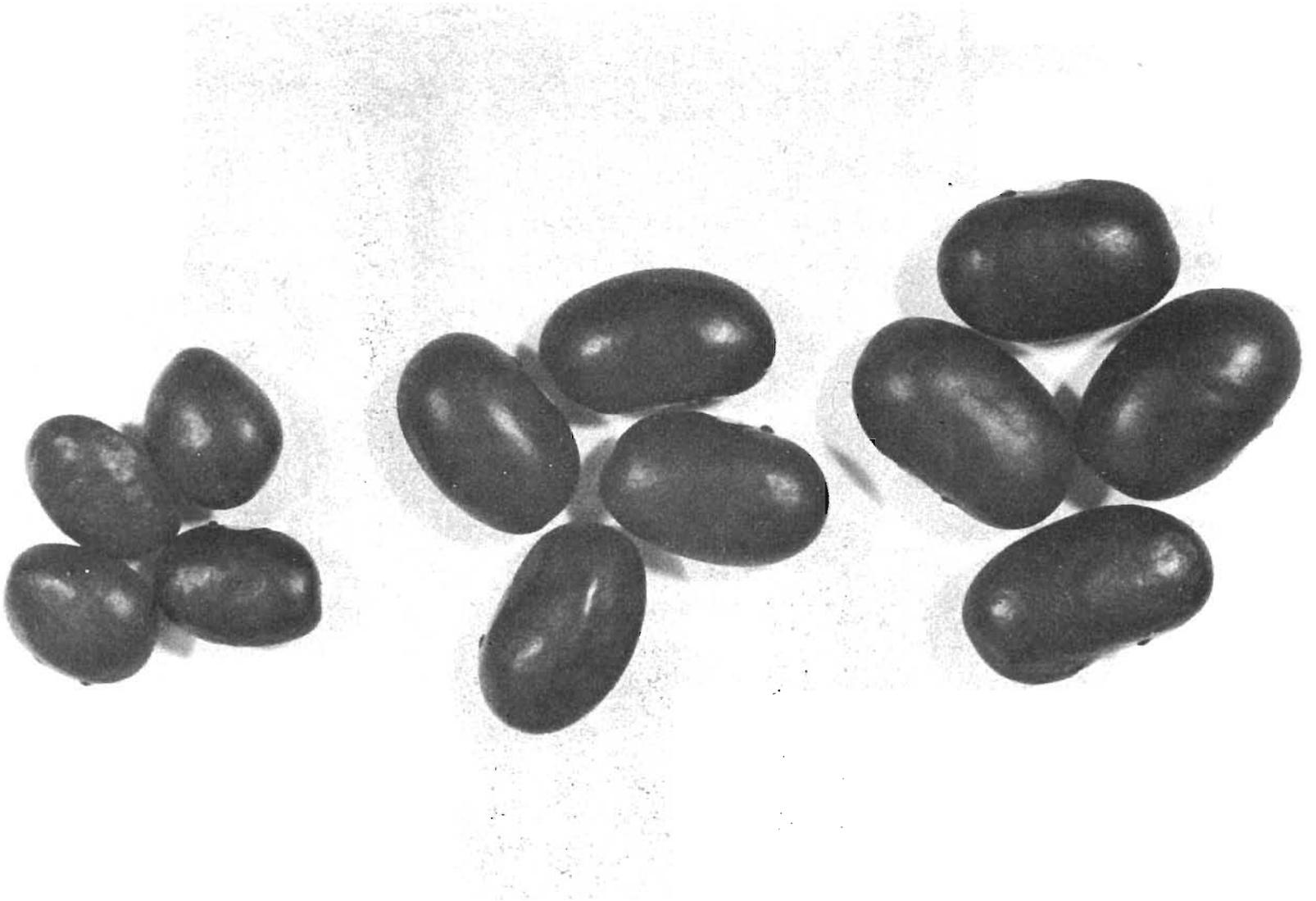
F. VALORES DE REFERENCIA (4)

Frijol negro

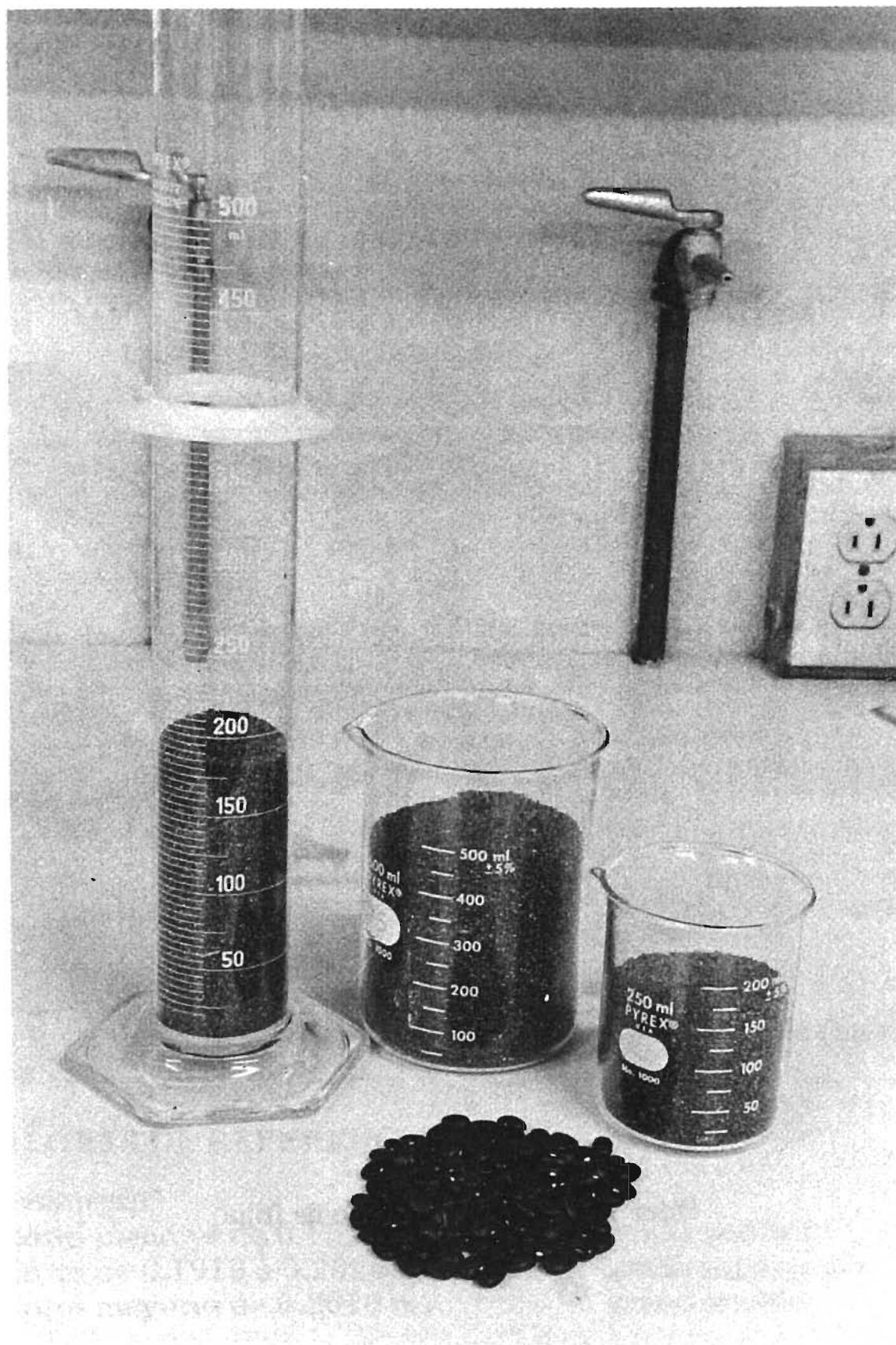
Valores menores de 0.1919 ml	=	grano pequeño
Valores de 0.1919 a 0.2010 ml	=	grano intermedio
Valores mayores de 0.2010 ml	=	grano grande

Frijol rojo

Valores menores de 0.2139 ml	=	grano pequeño
Valores de 0.2139 a 0.24441 ml	=	grano intermedio
Valores mayores de 0.2441 ml	=	grano grande



Diferentes tamaños de grano de frijol



Equipo utilizado para determinación de tamaño de grano de frijol

DISTRIBUCION POR TAMAÑO DE GRANO

A. DEFINICION

Distribución por tamaño de grano de una muestra de frijol.

B. APLICACION

Frijol seco o crudo o frijol remojado por 16 horas.

C. APARATOS

Juegos de tamices con aperturas longitudinales de 19 mm. (3/4 de pulgada) y anchos de 7.93 a 3.18 mm. (5/16 a 1/8 de pulg.) con intervalos de 2.38 mm. (6/64 de pulg.).

Balanza, precisión de 1 g.

D. PROCEDIMIENTO

Usar una muestra de 5 Kg. de frijol seco o remojado.

Pasar la muestra por los tamices, iniciando con el de mayor tamaño de agujero.

Ir separando y pesando el frijol remanente en cada tamiz.

E. CALCULOS

Expresar el peso del frijol remanente en cada tamiz como porcentaje del peso total inicial (3).

F. VALORES DE REFERENCIA (4)

Porcentajes de frijol remanente en tamiz:

Para frijol remojado

7.93 mm (20/64 pulg.) = 0/o grano grande

6.36 mm (16/64 pulg.) = 0/o grano mediano

Porcentaje de frijol que pasa el tamiz 6.36 mm (16/64 pulg.) = grano pequeño

Para frijol seco

4.76 mm (12/64 pulg.) = 0/o grano grande

3.18 mm (8/64 pulg.) = 0/o grano pequeño

Porcentaje de frijol que pasa el tamiz 3.18 mm (8/63 pulg.) = 0/o grano pequeño

PORCENTAJE DE CASCARA

A. DEFINICION

Peso de la cáscara seca de 25 granos de frijol relacionados con el peso del cotiledón más cáscara secos, expresado como porcentaje.

B. APLICACION

Aplicable a todo tipo de frijol común seco (3).

C. APARATOS

- Balanza analítica, con precisión de 0.1 mg.
- Horno con vacío, calibrado a 60°C y vacío de 25 mm de Hg.
- Desecador, conteniendo desecante químico.

D. PROCEDIMIENTO

- Seleccionar una cantidad representativa del grano de la muestra a analizar.
- De la cantidad seleccionada, tome al azar 3 muestras de 25 granos cada una.
- Remojar cada muestra en agua a temperatura ambiente por toda la noche (16-18 horas), usando una cantidad de agua de aproximadamente 50 ml.
- Secar los frijoles con una toalla de papel y separar manualmente la cáscara y cotiledón de cada grano.
- Secar las cáscaras y cotiledones en horno con vacío por 4 horas.
- Pesarse las cáscaras y cotiledones secos después de enfriarlos en un desecador.

E. CALCULOS

$$\text{o/o cáscara} = \frac{\text{Peso de cáscara seca}}{\text{Peso cotiledón} + \text{cáscara}} \times 100$$

F. VALORES DE REFERENCIA (6)

- valores menores de 8.00/o = contenido de cáscara bajo
- valores de 8.0 a 10.00/o = contenido de cáscara intermedio
- valores mayores de 10.00/o = contenido de cáscara alto

ABSORCION DE AGUA

A. DEFINICION

Cantidad de agua, expresada como porcentaje del peso del grano, absorbida por el grano de frijol durante determinado tiempo.

B. APLICACION

Todo tipo de frijol seco (1, 5).

C. APARATOS

Balanza analítica, con precisión de 0.1 mg.

D. PROCEDIMIENTO

- Pesar una muestra de 25 granos en duplicado (W_1).
- Ponerlos a remojar en agua destilada utilizando 75 ml a temperatura ambiente.
- A intervalos de una hora, por un máximo de 8 horas, remover la muestra de 25 frijoles del agua de remojo, secarlos con una toalla y pesarlos inmediatamente (W_2).

E. CALCULOS

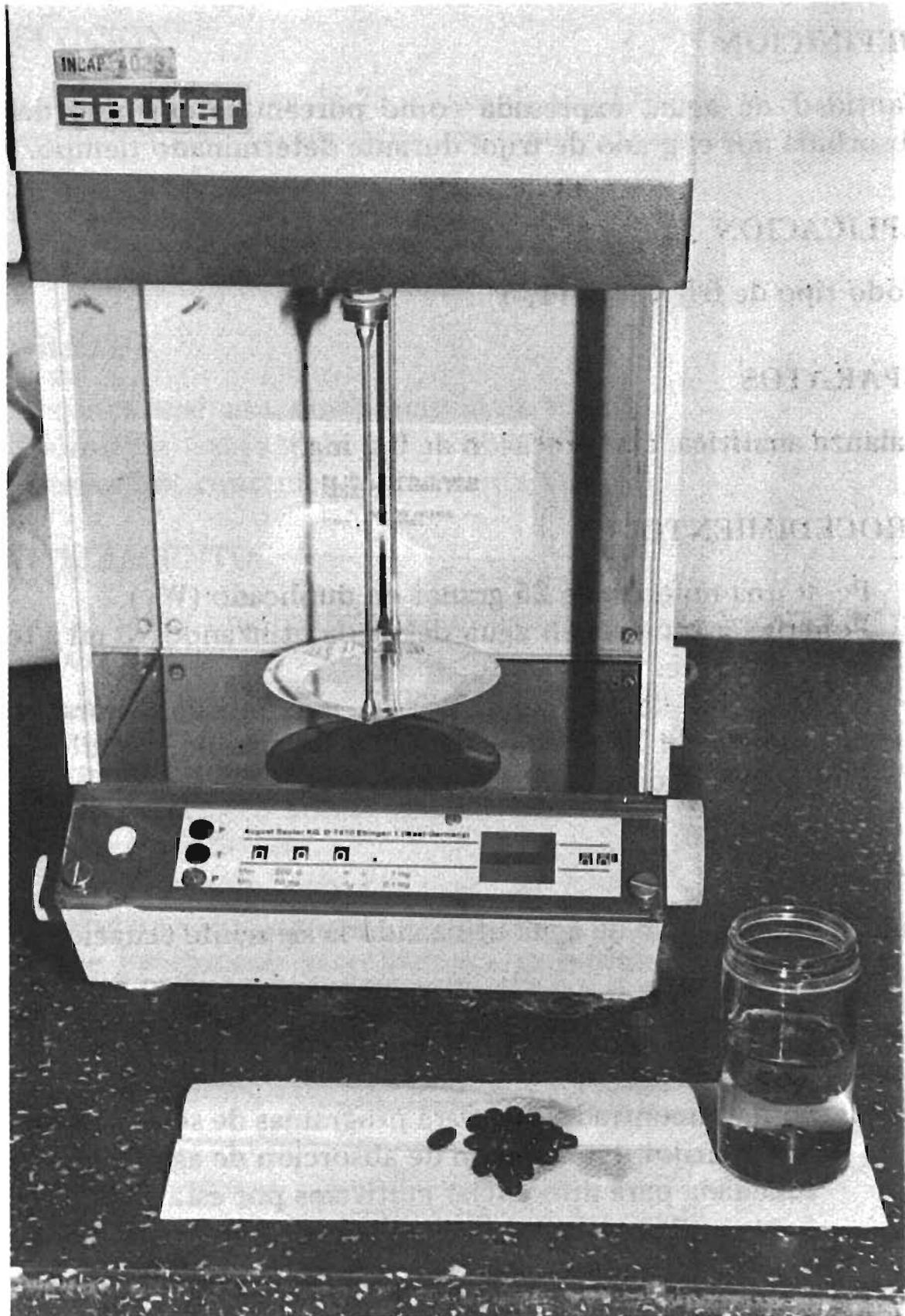
Calcule la absorción de agua utilizando la siguiente ecuación

$$\text{\% Absorción de agua} = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 100$$

Nota: Se ha encontrado que para programas de selección de cultivares de frijol, la medición de absorción de agua a las 4 horas es adecuada para diferenciar cultivares por esta característica.

F. VALORES DE REFERENCIA

Frijoles de cáscara dura	=	menos de 80% de absorción
Frijoles de cáscara suave	=	mayor de 81% de absorción de agua



Equipo utilizado para determinación de absorción de agua en el grano de frijol

TIEMPO DE COCCION DETERMINADO POR EL COCINADOR MATTSON MODIFICADO

A. Tiempo para que el 50% de una muestra de frijol bajo condiciones de cocción sea atravesado por una aguja.

B. APLICACION

Frijoles y arbejas (7, 8).

C. APARATOS

Estufas

Cocinador Mattson modificado, 25 pines de + ó - 48 g.

Cada una, con un diámetro de 5 mm, y agujas al extremo inferior de 2 mm.

D. PROCEDIMIENTO

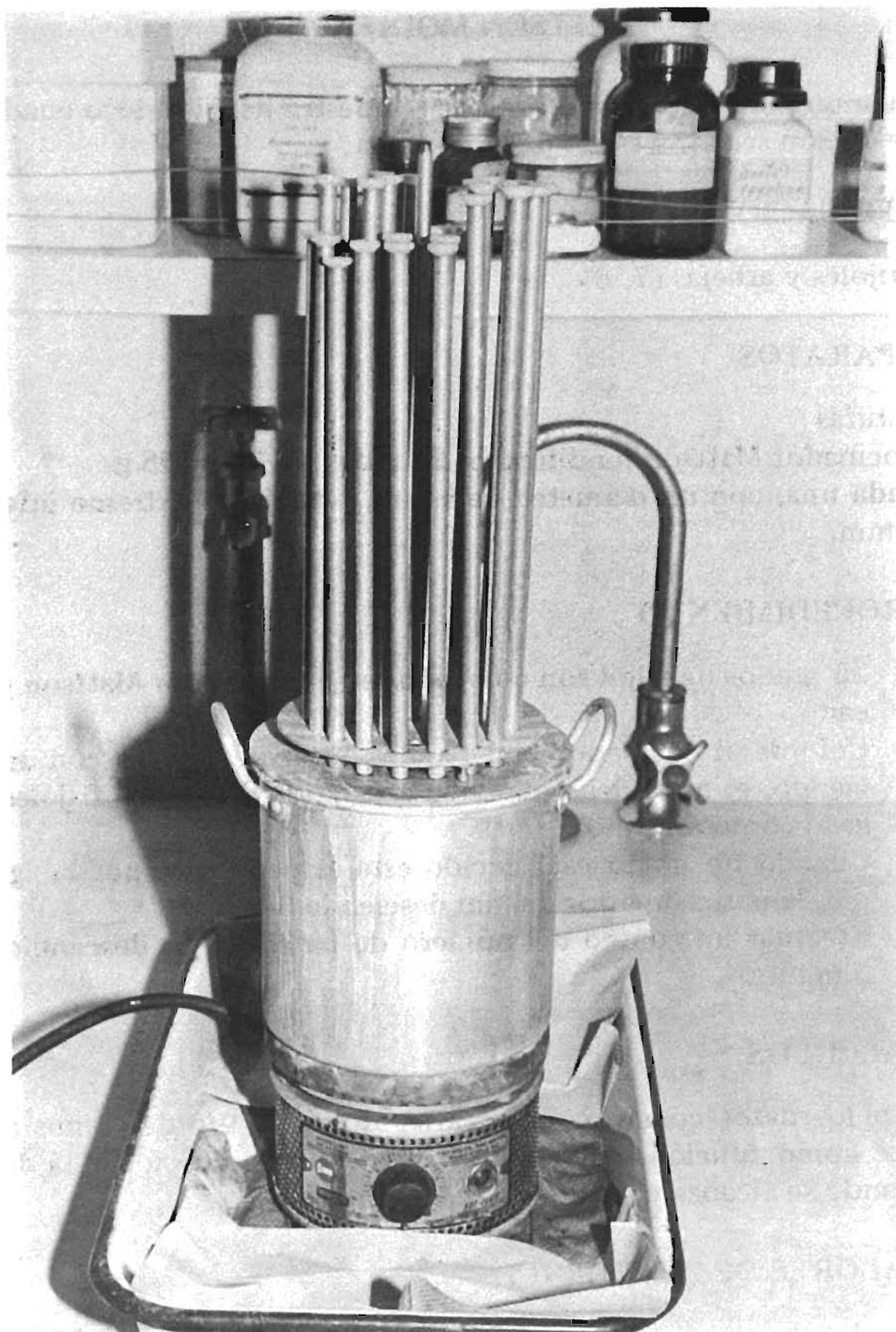
- 25 granos de frijol son colocados en el cocinador Mattson modificado.
- Colocar el cocinador con frijoles en un recipiente con agua hirviendo, el nivel del agua debe quedar arriba de los frijoles 1 pulgada como mínimo.
- Cuando un grano está cocido este es penetrado por la aguja del pin, la parte superior del pin desciende 3-4 cm.
- Efectuar un conteo del número de pines que ha descendido cada 5 minutos.

E. CALCULOS

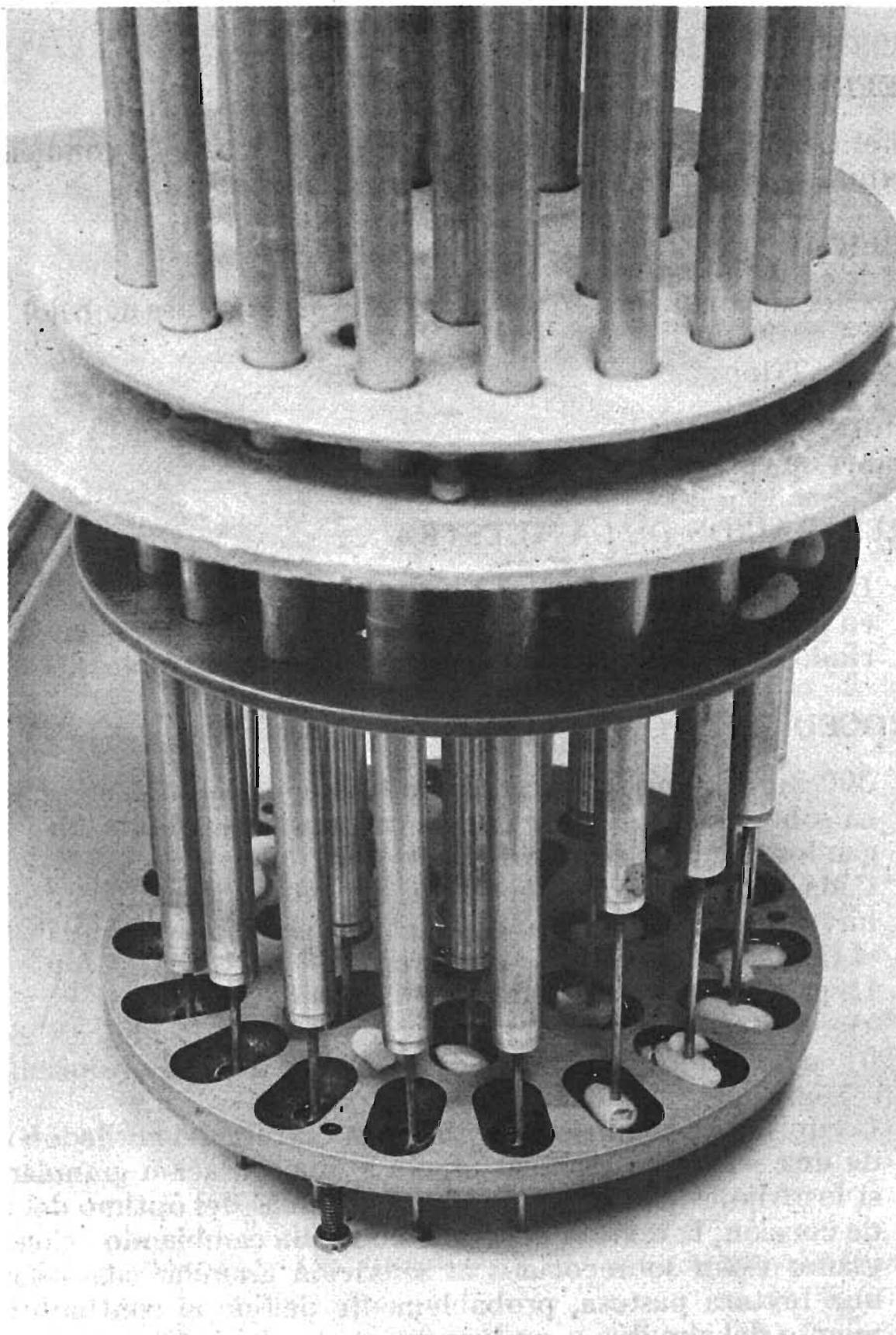
Con los datos construir una gráfica donde el % de granos cocidos esté como función del tiempo. El tiempo de cocción está definido cuando se alcanza el 50% de granos cocidos.

F. VALORES DE REFERENCIA

Frijoles recién cosechados	=	Menos de 100 minutos
Frijoles con 6 meses de almacenamiento, bajo condiciones de agricultores	=	Más de 150 minutos



Cocinator Mattson modificado



Detalle del cocinador Mattson modificado

TIEMPO DE COCCION DETERMINADO POR EVALUACION SENSORIAL

A. DEFINICION

Es el tiempo requerido para llevar el grano de frijol a condiciones de textura capaz de ser consumido como alimento.

B. APLICACION

Caracterización de materiales avanzados o variedades de frijol.

C. APARATOS

Estufa

Beaker de vidrio, capacidad 600 ml.

D. PREPARACION DE LA MUESTRA

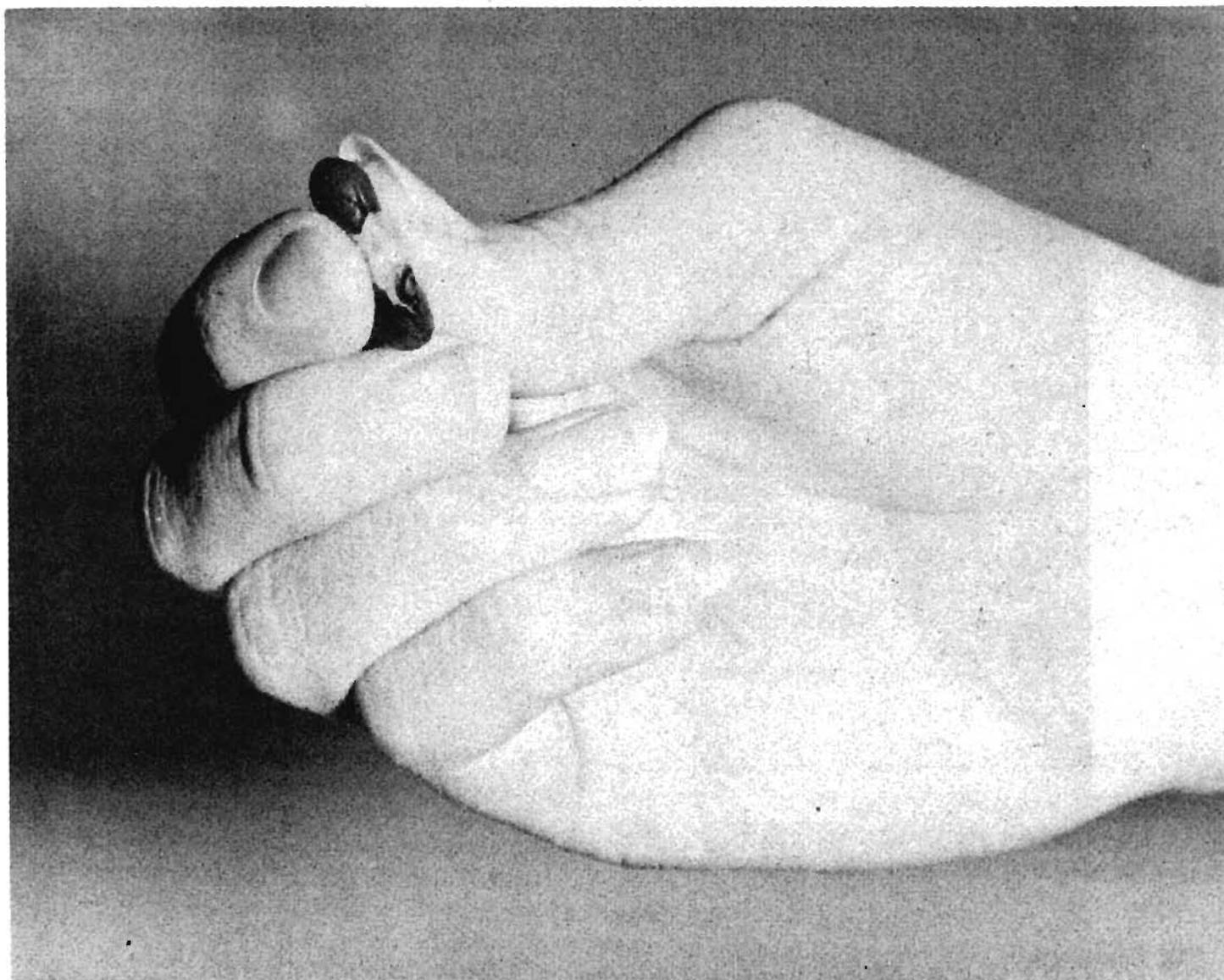
— Lavar 25 granos de frijol y colocarlos en 75 ml de agua. Dejarlos en remojo por 18 horas a temperatura ambiente, al final del período de remojo separar los granos del agua de remojo.

E. PROCEDIMIENTO

- 300 ml de agua se agregan a un beaker de 600 ml, el que se coloca sobre una estufa y se pone a calentar hasta ebullición. Se agregan los frijoles y se deja hervir.
- Cada determinado tiempo varios granos son removidos del agua hirviendo y con ellos se realiza la prueba sensorial que determina el tiempo de cocción.
- La prueba sensorial puede efectuarse en 2 formas:
 - a) oprimiendo un grano de frijol entre el dedo índice y el pulgar.
 - b) mordiendo un grano con los dientes incisivos y oprimiéndolo entre la lengua y el paladar.
- Conforme la ebullición continua, la textura del cotiledón cambia de una sensación granular áspera a una sensación granular suave, si los frijoles continúan en ebullición más del óptimo del tiempo de cocción, la textura del grano continua cambiando. Cuando los granos están sobrecocidos la sensación granular suave cambia a una textura pastosa, probablemente debido al continuo hinchamiento del almidón y ruptura de las paredes celulares.
- Reportar como tiempo de cocción cuando la textura es granular suave.

F. VALORES DE REFERENCIA (9)

Frijoles con más de 150 minutos de cocción = Frijol duro

TIEMPO DE COCCION DETERMINADO POR EVALUACION SENSORIAL

Método utilizado para determinar grado de cocción en grano de frijol



Método utilizado para determinar grado de cocción en grano de frijol

INDICE DE TIEMPO DE COCCION

A. DEFINICION

Es el número de granos reventados, expresados como porcentaje, que sugiere un mayor o menor tiempo de cocción en una muestra de frijol sometida a determinadas condiciones de cocción — a mayor porcentaje de granos reventados se sugiere un menor tiempo de cocción.

B. APLICACION (10)

Materiales de frijol en proceso de selección.

C. APARATOS

Estufa, si posible con condensadores de reflujo.

D. PREPARACION DE LA MUESTRA

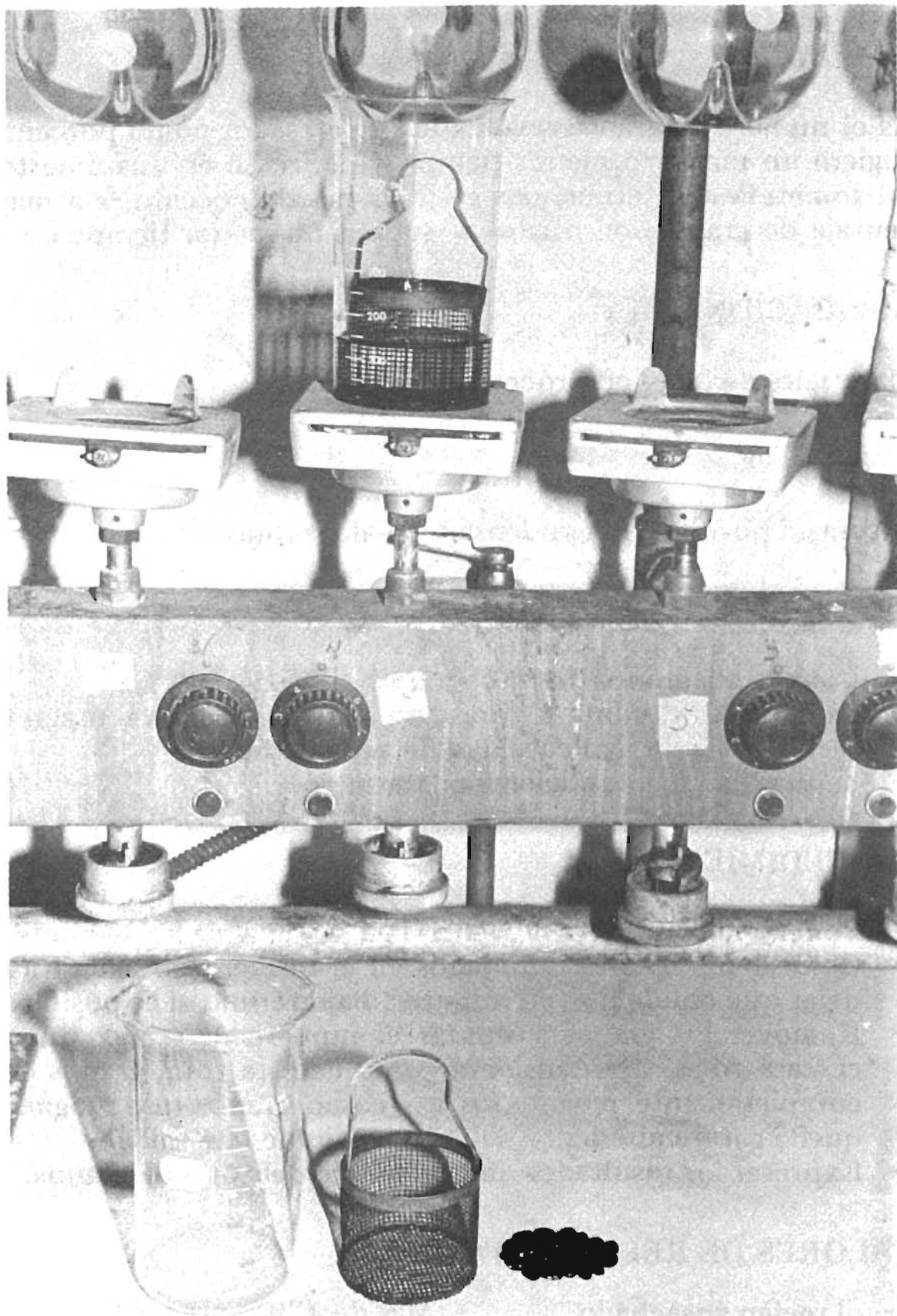
- Colocar 25 granos de frijol en un beaker de 100 ml.
- Remojarlos durante 4 horas con agua destilada a temperatura ambiente, usando una cantidad de agua de 50 ml.
- Separar los frijoles del agua de remojo.

E. PROCEDIMIENTO

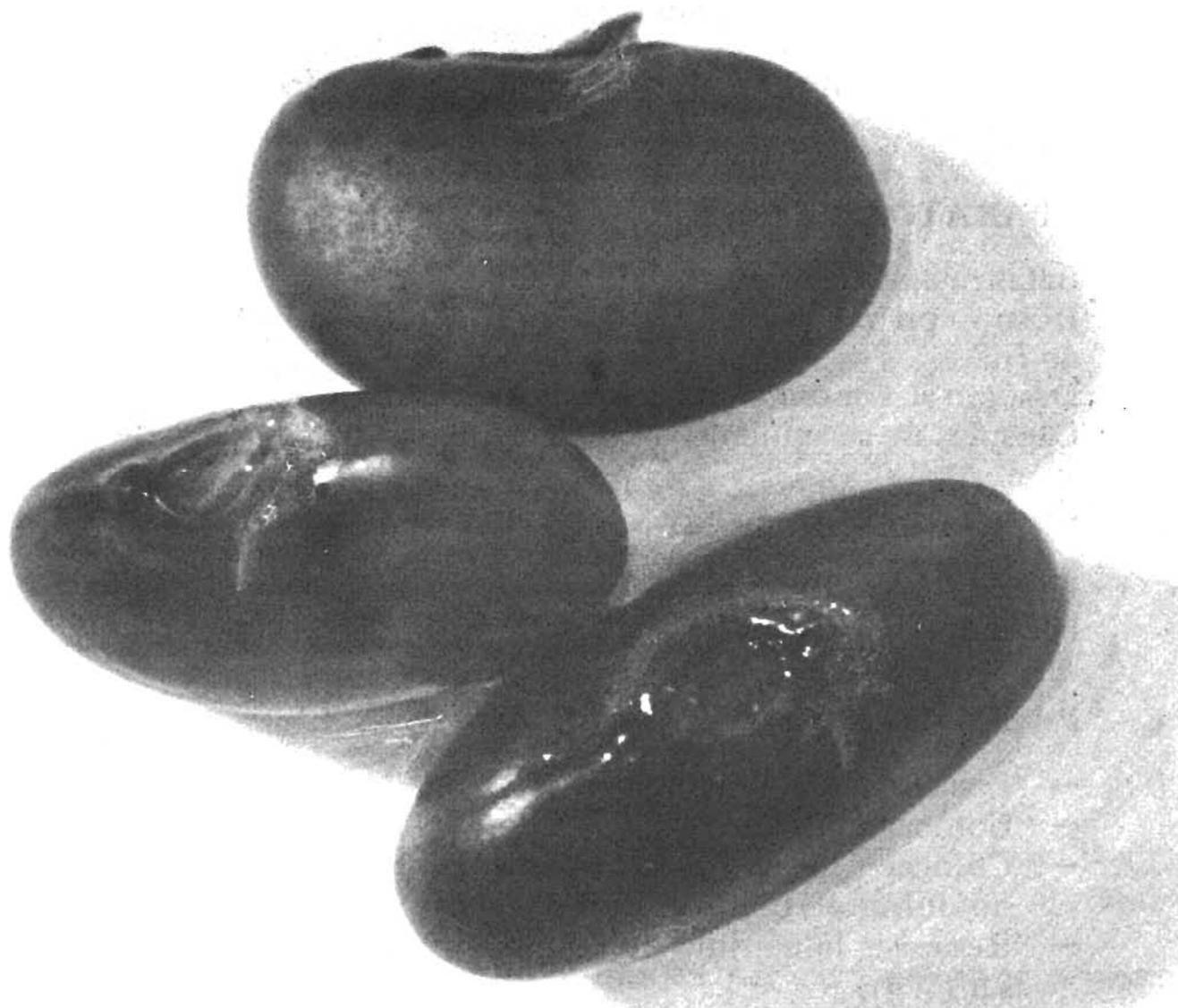
- Poner a calentar en un beaker 100 ml de agua hasta ebullición.
- Colocar los frijoles remojados en el beaker con agua hirviendo y dejar que ebulle por 20 minutos, bajo reflujo si es posible.
- Remover los granos y contar el número de granos que tenga la cáscara rota. Se considera como cáscara rota, granos que estén completamente reventados así como granos que tengan una pequeña rotura alrededor del hilum (ojo de la semilla).
- Expresar los resultados en porcentaje del total de granos.

F. VALORES DE REFERENCIA (11)

Frijol recién cosechado	= Más de 47% granos reventados
Frijol con 6 meses de almacenamiento bajo condiciones de agricultor	= Menos de 34% granos reventados



Equipo utilizado para determinación de tiempo de cocción



Detalle de grano reventado en la determinación de índice de cocción

ESPESOR DE CALDO DE COCCION

A. DEFINICION

Cantidad de sólidos en una alicuota de caldo de cocción de frijol, expresado como porcentaje de sólidos.

B. APLICACION

Caracterización de materiales avanzados o variedades comerciales de frijol.

C. APARATOS

Balanza analítica, precisión 0.1 mg.

Horno con vacío, calibrado a 60°C y con vacío equivalente a 25 mm de Hg.

Desecador conteniendo desecante químico.

Cápsulas de secamiento de 90 mm de diámetro y alto de 15 mm.

D. PREPARACION DE LA MUESTRA

Utilizar caldo de cocción obtenido en la determinación de tiempo de cocción por evaluación sensorial.

E. PROCEDIMIENTO

- Pesar cápsula de secamiento (W_1).
- Colocar alicuota de caldo en cápsula de secamiento y pesar (W_2).
- Colocar cápsula de secamiento con caldo en horno y dejar secando durante 16 horas.
- Remover la cápsula de secamiento del horno, dejar enfriar, y pesar (W_3).

F. CALCULOS

$$\text{o/o de sólidos} = \frac{W_3 - W_1}{W_2 - W_1} \times 100$$

G. VALORES DE REFERENCIA (11)

Caldo ralo	=	menos de 9.00/o sólidos
Caldo intermedio	=	de 9.0 a 12.00/o de sólidos
Caldo espeso	=	más de 12.00/o de sólidos

INDICE DE ESPESOR DE CALDO DE COCCION

A. DEFINICION

Es el contenido de sólidos del caldo de cocción obtenido en el método índice de cocción, a través del secamiento de una alicuota, expresándose como sólidos el remanente después de la remoción del agua y que sugiere un mayor o menor espesor del caldo.

B. APLICACION

Aplicable a materiales en proceso de selección.

C. APARATOS

- Balanza analítica, precisión de 0.1 mg.
- Horno con vacío, calibrado a 60°C y vacío equivalente a 25 mm de Hg.
- Desecador, conteniendo desecante químico.
- Cápsulas de secamiento, diámetro 90 mm y alto 15 mm.

D. PREPARACION DE LA MUESTRA

Utilizar caldo obtenido en el método índice tiempo de cocción.

E. PROCEDIMIENTO

- Pesar cápsula de secamiento (W_1).
- Colocar alicuota de caldo en cápsula de secamiento y pesar (W_2).
- Colocar cápsula que contiene caldo en horno con vacío durante 16 horas.
- Remover cápsula del horno, dejar enfriar en desecador y pesar (W_3).

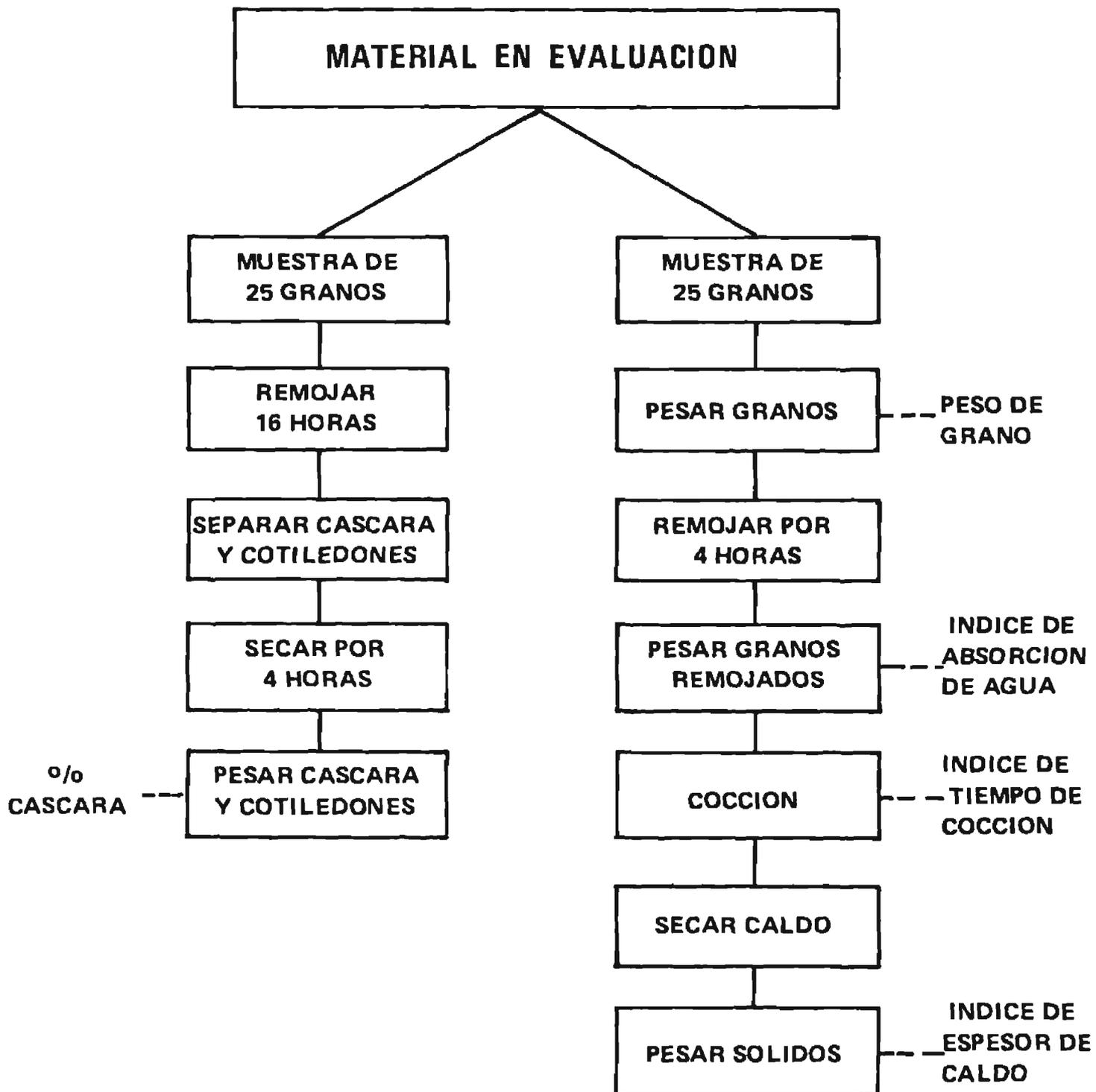
F. CALCULOS

$$\text{Índice de espesor de caldo} = ((W_3 - W_1)/(W_2 - W_1)) \times 100$$

G. VALORES DE REFERENCIA (11)

Índice menor de 0.40/o	=	sugiere caldo ralo
Índice entre 0.4 a 0.50/o	=	sugiere caldo intermedio
Índice mayor de 0.50/o	=	sugiere caldo espeso

**METODOLOGIA SUGERIDA PARA SELECCION EN SERIE
DE MATERIALES DE FRIJOL EN PROCESO DE
MEJORAMIENTO POR CALIDAD**





Equipo utilizado para determinación de espesor de caldo

REFERENCIAS

Peso de Grano

1. Linares, B. S., De Bosque, C. M., Elías, L. G. y Bressani, R. Características tecnológicas y nutricionales de 20 cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). I. Características físicas del grano. Turrialba. Vol. 31, No. 1. 1-10, 1981.
2. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. División de Ciencias Agrícolas y de Alimentos. Datos no publicados.

Tamaño del Grano

3. Hulse, J. H., K. O. Rachie y L. W. Billingley. Nutritional standards and methods of evaluation for food legume breeders. Ottawa, Canada. Institute for Development and Research Centre. 1977. 100 p. (IDRC-TS 7e).
4. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. División de Ciencias Agrícolas y de Alimentos. Datos no publicados.

Porcentaje de Cáscara y Absorción de Agua

5. Bustamante, J. A. "Evaluación de factores físicos y bioquímicos en 20 variedades de *Phaseolus vulgaris*". Tesis (Químico Biólogo). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 1980. 81 p.
6. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. División de Ciencias Agrícolas y de Alimentos. Datos no publicados.

Tiempo de Cocción

7. Mattson, S. The cookability of yellow peas: A colloid-chemical and biochemical study. Acta Agric. Suecana II. 2:1985, 1946.

8. Mattson, S., Akerberg, E., Eriksson, E., Koulter-Anderson, E. and K. Vahtras. Factors determining the composition and cookability of peas. *Acta Agric. Scand.*, 1:40. 1950.
9. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. División de Ciencias Agrícolas y de Alimentos. Datos no publicados.

Índice de Tiempo de Cocción

10. Elías, L. G., A. García y R. Bressani. Comparación entre diferentes métodos de laboratorio para medir el tiempo de cocción de frijoles. INCAP. Datos no publicados.
11. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. División de Ciencias Agrícolas y de Alimentos. Datos no publicados.

1. CARACTERIZACION NUTRICIONAL

1.1 METODOS QUIMICOS

- a. **Nitrógeno.** De acuerdo al procedimiento recomendado por la Association of Official Analytical Chemists (1), la proteína cruda es obtenida multiplicando el factor convencional 6.25 ($N \times 6.25$).
- b. **Lisina disponible.** La lisina disponible se determina por el método recomendado por Conkerton y Frampton (2). (Alternativas más simples están siendo investigadas).
- c. **Actividad Inhibidora de Tripsina.** Se determina de acuerdo al procedimiento de Kakade y Evans (3), y está expresada como unidades inhibidoras de tripsina por mg muestra (UTI/mg muestra).
- d. **Actividad de Hemaglutinina.** Se determina siguiendo el método de Jaffé y Brucher (4), y está expresada como la dilución del extracto que resulta en aglutinación macroscópica de eritrocitos en una hora.
- e. **Taninos y polifenoles** son expresados como "ácido tánico" (Folin-Denis) (1, 5) y como catequina (6).
- f. **Azufre total:** tentativo (7). No está bien estudiado.
- g. **Metionina disponible:** de acuerdo a la técnica recomendada por J. O. Kelly y usando *Streptococcus zymogenes* (8).
- h. **Metionina Total.** Hidrólisis con Hcl 6 N seguida de la determinación del aminoácido usando una técnica de cromatografía de intercambio iónico. Hay estudios encaminados a conseguir un tiempo óptimo de hidrólisis.
- i. **Cistina.** Oxidación con ácido perfórmico seguido de hidrólisis con Hcl 6 N y separación por electroforesis en papel a pH 4.5.
- j. **Triptofano.** De acuerdo al método de Hernández y Bates (9) y modificado por Gómez Brenes y de Araya (10).

- k. Método “*In vitro*” para digestibilidad de proteína. El método “*In vitro*” para digestibilidad de proteína es llevado a cabo de acuerdo al procedimiento recomendado por Akeson y Stalerman (11), usando una digestión enzimática con pepsina y pancreatina. La digestibilidad está calculada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Digestibilidad } in vitro = \frac{\text{Nitrógeno total digerido por las enzimas}}{\text{Nitrógeno total en la muestra original}} \times 100$$

METODOS QUIMICOS



Laboratorio para determinación de nitrógeno

REFERENCIAS METODOS QUIMICOS

1. A.O.A.C., Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 12th ed., William Horwitz (Washington, D. C., 1975).
2. Conkerton, E. J. and V. L. Frampton. Reaction of gossypol with free epsilon amino groups of lysine in protein. Arch. Biochem. Biophys., 81:130-131, 1959.
3. Kakade, M. L. and R. J. Evans. Growth inhibition of rats fed navy bean (*Phaseolus vulgaris*). J. Nutrition, 90:191-198, 1966.
4. Jaffé, W. G. and O. Brucher. Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemaglutininas de frijoles (*Phaseolus vulgaris*). Arch. Latinoamer. Nutr., 22:267-281, 1972.
5. Joslyn, M. A. "Methods of Food Analysis." 2nd. ed. Academic Press, New York.
6. Price, M. L., Van Scoyoc, S., and Butler, L. G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. J. Agric. Food Chem., 26:1214-1218, 1978.
7. Tabatabai, M. A. and J. M. Bremner. A simple turbidimetric method of determining total sulphur in plant materials. Agronomy Journal, 805-806, 1970.
8. Generic modification of protein quantity and quality in beans, *Phaseolus vulgaris*. L. James Dominic Kelly. A thesis submitted in partial fulfilment of the requirements of the degree of Doctor of Philosophy (Plant Breeding and Genetics), at the University of Wisconsin. 1974. 79 p.
9. Hernández, H. H. and L. S. Bates. A modified method for rapid tryptophan analysis of maize. CIMMYT. Res. Bull., 13' 1969.

10. De Araya, Adriana Blanco. Importancia de algunos factores sobre la digestibilidad de las proteínas del frijol (*Phaseolus vulgaris*) y de sus aminoácidos en humanos adultos. Tesis de Maestría, Curso de Postgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos (CESNA)/ Universidad de San Carlos de Guatemala, 1983.
11. Akeson, W. B. and M. A. Stalerman. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. *J. Nutr.*, 83:257-258, 1964.

1.2. METODOS BIOLOGICOS

Identificación de la muestra: Identificación genética, fecha de cosecha y condiciones de almacenaje deben ser descritas debidamente.

Preparación de la muestra:

Las muestras de frijol crudo son lavadas con agua, y después remojadas por 16 horas a temperatura ambiental en tres partes de agua por cada parte de frijol. Después de remojo se descarta el agua de remojo y se agrega agua fresca y se cocina a presión. El agua debe cubrir los frijoles cerca de una pulgada (2.54 cm) sobre la superficie del frijol. Este procedimiento es llevado a cabo en recipientes especiales hechos para cocimiento de frijol. El cocimiento es llevado a cabo bajo 16 psi (121°C) para tiempos específicos, dependiendo de la leguminosa bajo estudio. Basado en valores máximos de lisina disponible de PER (Índice de Eficiencia Proteínica), recomendados para *Phaseolus vulgaris* de 20-30 min., para *Vigna* de 10-15 min y para *Cajanus* de 15-20 min. Después de cocidas las muestras de frijol, son secadas juntamente con el caldo de cocción, en un horno de aire caliente a 60°C por 16 horas, y posteriormente molidas en un molino fino Wiley utilizando un tamiz de 40 mesh (malla), y después analizada por nitrógeno total.

Recomendación: Para una mejor identificación de la muestra y un análisis eficiente de los resultados biológicos, se recomienda que las muestras cocidas deberían ser ensayadas para lisina disponible y factores antifisiológicos.

EVALUACION BIOLOGICA DE CALIDAD PROTEINICA

A. Bioensayos en Ratas

1. Razón proteínica neta (NPR). Se usa el método de Bender y Doell (1) excepto para la mezcla de vitaminas (2) y minerales (3). Se usa también aceite vegetal pero a un nivel de 5%.

1.1 Dietas

1.1.1 Use una harina precocida de frijol de acuerdo al método previamente descrito bajo la preparación de la muestra.

1.1.2 La dieta basal utilizada como la dieta libre de nitrógeno tiene la siguiente composición

	g/100 g dieta
Almidón de maíz	90.0
Aceite vegetal*	5.0
Aceite de bacalao	1.0
Mezcla de sales minerales	4.0
Mezcla de vitaminas	5 ml/100 g dieta

1.1.3 En la preparación de las dietas, la proteína es agregada para dar un nivel aproximadamente de 10^o/o (1.6^o/o nitrógeno) a expensas del almidón de maíz. Caseína es la proteína de referencia (caseína libre de vitamina, ICN Pharmaceutical, Inc., Life Sciences Group. Cleveland, Ohio).

Se ha encontrado que esta caseína es satisfactoria.

2.1 Animales

2.1.1 Se utilizan ratas de la raza Wistar, machos y hembras recién destetados, de 21-23 días.

2.1.2 Las ratas son distribuidas en grupos de ocho (mitad machos y mitad hembras), de manera que los pesos promedio de los grupos no difieren de más de 1 gramo. La variación en peso de las ratas dentro de cada grupo no debe exceder de 10 g.

2.1.3 Las ratas son colocadas en jaulas individuales con fondos levantados de tela metálica, en un cuarto con aire acondicionado mantenido a 24-25°C. La comida y agua son ofrecidos *ad libitum*. Se coloca papel o cartón bajo las jaulas para

* Se usa aceite de semilla de algodón o aceite de soya.

recoger la comida regada, que tiene que ser recogida diariamente. El consumo de comida y la ganancia en peso de las ratas son determinados semanalmente por 14 días.

3.1 Cálculo de NPR

El NPR para cada animal es calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{NPR} = \frac{\text{Peso ganado del animal que consume la proteína en prueba} + \text{pérdida}}{\text{promedio de peso del animal alimentado con dieta basal}} \times \frac{\text{Proteína consumida por el animal que consume la proteína en prueba}}{\text{Proteína consumida por el animal que consume la proteína en prueba}}$$

y éstos son promediados para dar el valor promedio y el error estándar. La Razón Proteínica Neta Relativa (RNPR) es el NPR del material a prueba expresado en relación al NPR de la referencia estándar, caseína. La razón puede también ser expresada como porcentaje.

$$\text{RNPR} = \frac{\text{NPR de la proteína en prueba}}{\text{NPR de la proteína de referencia (caseína)}} \times 100$$

2. Índice de Eficiencia Proteínica (PER). Similar al método recomendado por la AOAC (4), excepto por la mezcla de vitaminas (2) y minerales (3). Se agrega también aceite vegetal pero a un nivel de 50/o.

2.1 Dietas

La misma que se usó para el método NPR, incluyendo una referencia estándar con caseína al nivel de 10 por ciento de proteína.

2.2 Animales

Lo mismo que en el método NPR.

2.3 Cálculo de PER

2.3.1 El período de ensayo del PER es de 4 semanas.

Un record semanal de consumo de alimento y peso corporal es también llevado a cabo.

2.3.2 Al final de las cuatro semanas, el PER es calculado para el grupo de prueba y para la caseína de referencia estándar como sigue:

$$\text{PER} = \frac{\text{aumento de peso del animal en prueba}}{\text{proteína consumida}}$$

3. Digestibilidad proteínica

3.1 Dietas

Las mismas usadas en los métodos de NPR y PER, incluyendo la dieta libre de caseína y nitrógeno.

3.2 Animales

Los mismos usados en los métodos NPR y PER, sin embargo, se obtienen mejores resultados con ratas de 20-35 días de nacidas (primera y segunda semana de experimento) del procedimiento de NPR o PER (5).

3.2.1 Se recolectan diariamente las heces de cada rata por un período mínimo de 5 días, y se guardan en frascos individuales en un cuarto frío ($\pm 5^{\circ}\text{C}$). Se llevan a cabo registros del consumo de alimento y del peso corporal al comienzo y al final del período de recolección de heces.

3.2.2 Las heces individuales recolectadas son secadas en un horno de aire caliente a (60°C) por un período de 16 horas (libre de materiales extraños) pesadas y molidas en un molino tipo Wiley usando un tamiz de 40 mallas.

3.2.3 Se analiza en duplicado las heces de cada rata por su contenido de nitrógeno usando el método de Kjeldahl.

3.2.4 La digestibilidad aparente se calcula midiendo la cantidad de nitrógeno ingerido en la dieta y la cantidad excretada en las heces. Se usa la siguiente ecuación:

$$\text{Digestibilidad aparente} = \frac{\text{Consumo de nitrógeno} - \text{Nitrógeno fecal}}{\text{Consumo de nitrógeno}} \times 100$$

3.2.5 La digestibilidad verdadera es calculada midiendo la cantidad de nitrógeno ingerido en la dieta, la cantidad excretada en las heces y la llamada pérdida metabólica en las heces.

Esta última es estimada de la cantidad de nitrógeno excretada por las ratas alimentadas con la dieta de libre nitrógeno.

La siguiente ecuación es usada:

$$\text{Digestibilidad verdadera} = \frac{\text{Consumo de nitrógeno} - \text{Nitrógeno metabólico (Nitrógeno fecal)}}{\text{Consumo de nitrógeno}} \times 100$$

ENSAYOS BIOLÓGICOS



Realización de ensayos biológicos utilizando ratas

ENSAYOS HUMANOS PARA CALIDAD PROTEINICA

OBSERVACION

Cualquier estudio que involucre seres humanos deberá primero ser aceptado y aprobado por un comité institucional sobre derechos humanos, para la protección de los sujetos participantes en la investigación.

METODOLOGIA PARA ENSAYO DE BALANCE DE NITROGENO DE CORTA DURACION (5, 6)

Sobre la base de experiencias del grupo trabajando en INCAP, se propone un ensayo corto para Índice de Balance de Nitrógeno para adultos y jóvenes.

SELECCION DE ADULTOS

Se seleccionarán de 8-10 sujetos, en base a un estudio previo sobre hábitos alimenticios, que estén sanos y sin problemas metabólicos; será necesario realizarles un examen clínico y físico.

DIETA BASAL

Se preparará una dieta basal aceptable en densidad energética y sabor así como completa en los demás nutrientes (vitaminas, minerales). Un suplemento vitamínico y mineral deberá proporcionarse diariamente.

La dieta basal deberá ser analizada para determinar su contenido de nitrógeno, el cual deberá ser muy bajo. Previo al estudio deberá desarrollarse una fórmula líquida o dieta adecuada para proporcionar la proteína.

A todos los sujetos deberá proporcionárseles la dieta basal y un nivel apropiado de energía según sus necesidades.

NIVELES DE PROTEINA

La proteína se proporciona por períodos de dos días en niveles de 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 g/kg/día.

La mitad de los sujetos del estudio deben recibir los niveles de prueba en orden descendente, la otra mitad en orden ascendente, o bien distribuidos de acuerdo a un diseño estadístico.

Si la calidad de la proteína a evaluar es considerado mucho más bajo que la proteína de leche, carne o huevo los niveles de proteína a evaluar deberán incrementarse en 0.1 g de proteína/kg/día.

RECOLECCION DE MUESTRAS

Debe utilizarse un marcador de heces (carbón o carmín autoclaveado), el que se proporcionará al inicio y final de cada período de balance; todas las heces serán recolectadas y agrupadas hasta que aparezca el segundo marcador. Las heces marcadas son descartadas.

La orina debe colectarse en períodos de 24 horas y conservadas en refrigeración. Se agregará a cada botella de recolección (1-2 litros) 5 ml de HCl 1N.

Muestras representativas del alimento consumido, de las heces mezcladas de cada período y de orina diaria se analizarán por su contenido de nitrógeno (muestras de sudor serán necesarias cuando las condiciones sean de clima muy cálido o de ejercicio pesado).

CALCULOS

De la ingesta y excreción de nitrógeno se calculará:

Balance de nitrógeno a cada nivel de proteína

Digestibilidad de la proteína

La relación y/o regresión entre nitrógeno ingerido, nitrógeno absorbido y balance de nitrógeno.

Los cálculos anteriores proporcionarán:

- Digestibilidad de proteína
- Ingesta de nitrógeno para equilibrio nitrogenado
- Calidad relativa de la proteína cuando se tenga disponible un valor de referencia.

REFERENCIAS

1. Bender, A. E. and Doell, B. H. Biological evaluation of proteins: A new aspect. *Br. J. Nutrition (England)*, 11:140, 1957.
2. Manna, L. and Hauge, S. M. A possible relationship of vitamin B₁₃ to orotic acid. *J. Biol. Chem.*, 202:91, 1953.
3. Hegsted, D. M., Mills, R. C., Elvehjem, C. A. and Hart, E. B. Choline in the nutrition of chicks. *J. Biol. Chem.*, 138:459, 1941.
4. A.O.A.C., Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 11th. Ed. (Washington, D. C., 1970).
5. Elías, L. G. and Bressani, R. Effect of time and protein level on the apparent protein digestibility of common beans (*P. vulgaris*). INCAP, Annual Report, 1982.
6. Navarrete, D. A., L. G. Elías, J. E. Braham and R. Bressani. The evaluation of the protein quality of soybean products by short-term bioassays in adult human subjects. *Arch. Lat. Amer. Nut.* 29:386, 1979.
7. Bressani, R., B. Torún, L. G. Elías, D. A. Navarrete y E. Vargas. A short-term procedure to evaluate protein quality in young and adult human subjects. Chapt. 8. Protein Quality in Humans: Assessment and *in vitro* estimation. AVI Pub. Comp. Inc., Westport, Connecticut. 1981.

Precio US\$1.00

**Impreso en la Unidad de Ayudas Audiovisuales
del INCAP**

2 1 MAR. 1986