

NATURALEZA DE LAS GLOBULINAS DEL FRIJOL BAYO

Por JUAN ROCA y
ROBERTO LLAMAS,
del Instituto de
Biología.

En un estudio publicado por el Instituto de Biología acerca del valor alimenticio del frijol, fijamos la composición centesimal de numerosas variedades de esta leguminosa con el fin de poder establecer su utilidad como alimento; el tema nos pareció de particular interés por el hecho de que el frijol constituye un integrante casi constante de la alimentación popular de México. En este trabajo hemos profundizado algo más en el estudio de este asunto, al tratar de dilucidar la naturaleza de las globulinas de la leguminosa, fijando la calidad y cantidad de los distintos aminoácidos que las integran.

Para poder fijar el valor biológico de las proteínas, cualquiera que sea su naturaleza, es indispensable saber previamente cuales son los aminoácidos que la forman, pues como es bien sabido, los estudios relativos a la composición de los alimentos en relación con sus propiedades alimenticias, han sufrido radicales transformaciones desde que se conoce la incapacidad del organismo animal para la síntesis de algunos aminoácidos indispensables para la elaboración de proteínas propias o de sustancias de carácter hormonal. Los estudios experimentales mostraron que la falta de triptofano origina en los animales trastornos graves que conducen rápidamente hacia la muerte, otro tanto se puede decir de la tirosina, aminoácido indispensable para la vida y sustancia formada de la adrenalina y de la tiroxina; la administración de los mencionados aminoácidos hace desaparecer rápidamente los cuadros patológicos de carencia. Los aminoácidos considerados como indispensables eran en un principio la lisina, histidina y triptofano, pero en la actualidad se consideran también como estrictamente necesarios la cistina, leucina, isoleucina, fenilalanina y va-

lina. Así pues, el conocimiento de la composición centesimal de un alimento, si bien suministra muy valiosas indicaciones para juzgar de su valor en bromatología, no proporciona datos sobre la calidad de sus principios alimenticios, calidad que debe ser conocida sobre todo en lo que se refiere a la molécula proteica.

Creemos indispensable que entre nosotros se inicien trabajos de esta índole con el fin de conocer el valor biológico de las principales proteínas que intervienen en la alimentación; ciertamente estos trabajos son difíciles y delicados, pero las nuevas técnicas de laboratorio tienden a simplificarlos, como se desprende de los nuevos procedimientos expuestos por Max Bergmann, capaces de lograr la separación de numerosos aminoácidos cristalizados en forma de sales complejas características mediante combinación con los ácidos dioxalatopiridinocromiato (ácido dioxipirídico) y dioxalatodianilincromiato (ácido dioxanílico), o bien utilizando el cloruro de dinotrobenzoilo 3-5 por el procedimiento de Saunders, o bien siguiendo otros procedimientos más en boga y que habremos de ver después.

Este trabajo ha sido hecho con frijol bayo comprado personalmente por uno de nosotros en Tepetitlán, Hgo.

Lo primero por investigar fué la naturaleza de los prótidos del frijol, para ello se desecaron y pulverizaron varios kilos de la leguminosa; en el polvo perfectamente homogéneo se averiguó la presencia de albúminas, globulinas, nucleoproteínas, polipeptidos y aminoácidos libres, los resultados fueron los siguientes: se pudo separar pequeña cantidad de albúminas y proteosomas primarios; la investigación de nucleoproteínas y ácidos aminados libres fué prácticamente negativa, en cambio se pudieron separar globulinas en mayor cantidad.

De acuerdo con esta investigación preliminar, el trabajo ulterior consistió en la separación de globulinas y estudio analítico de ellas.

El grupo de las globulinas ha sido dividido y se consideran dos tipos de ellas, las llamadas globulinas alfa y las beta, se diferencian entre sí por su solubilidad, temperatura de floculación y por los aminoácidos que las integran, se considera así que las globulinas alfa poseen de siete a ocho veces más cistina que las globulinas beta; en los alimentos naturales, por otra parte, predominan las globulinas beta sobre las alfa en gran proporción. Hay que tener en cuenta que la separación precisa y completa de las mismas es prácticamente imposible, porque al modificar las concentraciones de sulfato amónico, substancia precipitante, se llega a concentraciones medias capaces de precipitar tanto a unas como a las otras; sin embargo, procurando que

la precipitación sea correcta y estudiando detenidamente la sustancia precipitada, se puede considerar perfectamente factible la separación de ambas.

El nitrógeno total del frijol estudiado fué de 3.92% lo que corresponde a 24.50 por ciento de prótidos; el procedimiento empleado fué el acostumbrado por nosotros en todas las determinaciones o sea el de Kjeldhal; hay que señalar que la cifra indicadora de prótidos se obtuvo admitiendo que todo el nitrógeno obtenido es proteínico.

En las pruebas preliminares para la separación de globulinas suelen usarse soluciones de cloruro de sodio, la mejor en estos casos es la solución al dos por ciento. Se utilizaron soluciones de cloruro de sodio al uno, al dos y al tres por ciento, añadiendo cinco centímetros cúbicos de estas soluciones a un gramo de frijol en polvo; al cabo de dos horas de maceración y de agitación continua, se separan los líquidos y se vuelve a tratar cada gramo de polvo con la misma solución de cloruro de sodio, en la forma descrita anteriormente, cinco veces más. La solución de cloruro de sodio al dos por ciento fué la que extrajo mayor cantidad de globulinas, pues llegó a separar el ochenta y cinco por ciento del nitrógeno total, evaluado este último por el mismo procedimiento de Kjeldhal y utilizando los mismos reactivos y material.

La solución de cloruro de sodio contiene las globulinas totales del frijol; para separar las globulinas alfa de las beta, se recurrió al sulfato de amonio, esta sal es capaz de precipitar las globulinas alfa cuando se encuentra a concentración de 35 por ciento, y de precipitar las beta a concentración de 55 y 80 por ciento.

El procedimiento seguido consiste en tratar 1500 gr. de frijol pulverizado y desecado con 7500 c.c. de solución de cloruro de sodio al dos por ciento, se agita continuamente durante dos horas y se separa más tarde el líquido mediante centrifugación en frascos grandes de 250 c.c. de capacidad. Una vez separado el líquido, se vuelve a añadir cloruro de sodio en la misma concentración y cantidad, se deja macerar y se agita durante dos horas más para finalmente separar el líquido y juntarlo con el anterior.

No se consideró necesario una tercera extracción porque la valoración de globulinas en el líquido obtenido coincidió bastante con la cantidad teórica de globulinas existentes en el frijol; no se trató hasta agotamiento, por lo tanto, para no complicar el procedimiento con el manejo de gran cantidad de solución clorurada.

Las globulinas alfa se separaron de la solución anterior precipitándolas con sulfato de amonio, para lograrlo se disolvió la cantidad

necesaria de esta sal para obtener concentraciones al 35 por ciento. Al añadir el sulfato amónico se formó precipitado abundante el cual fué separado por centrifugación; el precipitado se lavó con solución de cloruro de sodio al 2 por ciento y solución de sulfato de amonio al 35 por ciento. El líquido centrifugado se guardó para separar después las globulinas beta.

Las globulinas alfa obtenidas en los distintos frascos se reunieron y dispersaron en 2000 cc. de solución de cloruro de sodio al dos por ciento y después de filtración se dializó esta solución durante 16 días en agua corriente y en presencia de toluol; las globulinas separadas se lavaron y secaron con alcohol y éter sulfúrico; al final de estas manipulaciones se obtuvieron cinco gramos de substancia seca. El dializado era casi neutro, pH 7.1; por calentamiento a 90 grados se formó coágulo abundante después de añadir ácido acético a pH 6.8, por esta razón se lavó el coágulo con alcohol y éter sulfúrico hasta desecación, obteniéndose así otros seis gramos de substancia análoga a la anterior, por lo que la cantidad final de globulina alfa obtenida fué de 11 gramos.

Al líquido del que se separaron las globulinas alfa se añadió sulfato de amonio hasta obtención de concentraciones al 55 por ciento, en este momento apareció precipitado que se separó por filtración con pulpa de papel mojado previamente con solución de sulfato de amonio al 55 por ciento. Al filtrado se añadieron 19.08 gramos de sulfato de amonio por cada 100 c.c. de extracto para lograr una concentración de 80 por ciento, se obtuvo en seguida muy abundante precipitado que se separó por filtración a través de pulpa de papel mojado con solución de sulfato de amonio al 80 por ciento. Ambos precipitados se reunieron por corresponder a las mismas substancias y se dispersaron en 2000 c.c. de agua clorurada, se filtró y dializó como en el caso anterior en presencia de pequeña cantidad de toluol durante 18 días, y el precipitado se lavó con alcohol y éter hasta desecación, el producto obtenido pesó 70 gramos. El dializado coaguló por calentamiento a 65 grados, el coágulo formado se lavó con alcohol y éter hasta desecación y pesó 15 gramos; la cantidad total de globulinas beta obtenidas fué de 85 gramos.

Las globulinas alfa y beta tienen grandes analogías y las diferencias siguientes (globulinas del frijol bayo): las globulinas alfa dispersadas con cloruro de sodio al dos por ciento precipitan con solución de sulfato de amonio al 35 por ciento, coagulan a 90 grados al acidificar con acético hasta pH de 6.8; y proporción elevada de cistina y triptofano.

Las globulinas beta, dispersadas en solución de cloruro de sodio al dos por ciento, precipitan con sulfato de amonio al 80 por ciento, coagulan parcialmente a 90 grados y se obtiene coagulación completa después de calentamiento a noventa grados y acidificación con acético hasta pH 6.8; la floculación no se obtiene sin embargo, si se calienta después de haber añadido el ácido.

En ambas globulinas se procedió a la cuantificación del nitrógeno total, cenizas y azufre, los resultados son los siguientes:

Globulinas alfa.	Nitrógeno total	16.12%
	Azufre	1.05 „
	Cenizas.	0.62 „
Globulinas beta.	Nitrógeno total	17.03 „
	Azufre	0.26 „
	Cenizas.	1.40 „

Para el estudio de la distribución del nitrógeno en ambas globulinas se siguió el método descrito por Van Slyke; el nitrógeno de amidas se separa en forma de amoníaco después de neutralizar el producto de la hidrólisis con óxido de magnesio; las bases exónicas fueron separadas mediante precipitación con ácido fosfotungstico; en ellas el nitrógeno básico en forma amínica corresponde a la lisina. La mitad del resto del amoníaco se obtiene por destilación, previo tratamiento con hidróxido de sodio; de este nitrógeno no amínico las tres cuartas partes corresponden a la arginina y el resto a la histidina.

Los resultados son los siguientes:

CUADRO QUE INDICA LA DISTRIBUCION DEL NITROGENO EN LAS GLOBULINAS ALFA Y BETA DEL FRIJOL BAYO

	Globulinas alfa.	Globulinas beta.
Nitrógeno de amidas.	8.90%	10.88%
Nitrógeno de lisina.	8.86 „	8.55 „
Nitrógeno de arginina.	13.05 „	13.98 „
Nitrógeno de cistina.	0.92 „	0.87 „
Nitrógeno de histidina.	5.34 „	3.31 „
Nitr. amínico del filtrado.	57.91 „	56.24 „
Nitr. no amínico del filtrado.	2.02 „	2.97 „
Pérdidas.	3.00 „	3.20 „
Total.	100.00%	Total. 100.00%

Una vez establecida la distribución del nitrógeno de ambas globulinas, se procedió a la valoración de los ácidos aminados de mayor importancia biológica. Para la cistina empleamos el procedimiento de Sullivan, o sea transformación previa de la cistina en cisteína por medio de ácido clorhídrico deci-normal, tratamiento con cianuro de sodio y después con solución de 1-2 naftoquinona-4-sulfonato de sodio y sulfito de sodio anhidro en medio alcalino, se obtiene así color rojo moreno que pasa a rojo puro por adición del hiposulfito de sodio.

Para el triptofano se siguió el método de Krauss basado en el empleo de solución de vainillina en mezcla aceto-clorhídrica; para la tirosina optamos por el procedimiento de Folin-Ciocalteu.

La arginina, lisina e histidina se obtuvieron por cálculo, tomando como base las cuantificaciones del nitrógeno correspondiente a cada uno de estos ácidos aminados.

Los resultados son los siguientes:

CUADRO QUE INDICA LA PROPORCION DE ALGUNOS AMINO-
ACIDOS DE VALOR ELEVADO EN LAS GLOBULINAS
DEL FRIJOL BAYO.

	Globulinas alfa.	Globulinas beta.
Arginina.	6.36%	7.20%
Histidina.	3.10 „	2.02 „
Lisina.	7.25 „	7.45 „
Cistina.	1.23 „	0.11 „
Triptofano.	3.85 „	1.15 „
Tirosina.	5.25 „	4.32 „

Se deduce de los resultados anteriores que las globulinas del frijol bayo poseen relativamente alta proporción de arginina, histidina, lisina, triptofano y tirosina; es pobre en cistina, pero este aminoácido se encuentra en mayor cantidad en las proteínas del maíz, por lo que difícilmente se presentan deficiencias del mismo entre nosotros dado el consumo abundante de este grano. Contrasta, por otra parte, la presencia en el frijol de cantidades elevadas de estos aminoácidos, con la pobreza del maíz en ellos, sobre todo en lo que se refiere a lisina, del cual carece por completo, y secundariamente en lo que respecta a arginina, histidina y triptofano, muy escasos en las proteínas del maíz.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se han estudiado las globulinas alfa y beta del frijol bayo por estimarse como los componentes proteínicos más importantes del mismo.

El comportamiento físico químico de ambas presenta diversas analogías y diferencias.

Las globulinas beta se encuentran en mayor proporción que las alfa; del material de estudio se pudieron separar 85 gramos de las primeras y 11 de las segundas.

En la composición química de dichas globulinas intervienen los aminoácidos que se conceptúan como indispensables para el desarrollo normal del organismo.

Con excepción de la cistina, los demás ácidos aminados que se cuantificaron (arginina, histidina, lisina, triptofano y tirosina) existen en elevada proporción en ambas globulinas.

El valor biológico de las proteínas del frijol, es de tomarse en consideración por lo anteriormente mencionado.

Noviembre de 1941.