

Contenido en lisina y triptófano de lentejas y garbanzos

por

Tisi B., G. E. y Godoy C., H.

De la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad
de Concepción

PRESENTADO POR EL ACADÉMICO D. OEDULIO FERNÁNDEZ

S U M M A R Y

Lysine and tryptophan contents from chickpeas and lentils by ion exchange method using columns of 4 per cent cross-linked sulfonated polystyrene (Dowex 50 W X4), Moore and Stein technique was determined.

Filter paper ascending and Stahl thin layer chromatography techniques were applied for the identification of the amino acids in the effluents.

The results obtained were compared with the results given by other authors and with the F. A. O. Provisional Amino Acids Pattern (1957).

Protein scores by F. A. O. method for chickpeas and lentils were calculated.

INTRODUCCIÓN

El hombre ha modificado su modo de alimentarse y seguirá modificándolo. Los hechos no confirman la opinión, bastante pesimista, adoptada por ciertos investigadores, de que es imposible cambiar los métodos de alimentarse de los pueblos en proceso de desarrollo o subdesarrollados.

En muchas de las zonas afectadas, la población general no puede consumir leche ni productos lácteos, y la carne y el pescado figuran en la dieta más bien como condimentos, que como verdaderos alimentos.

Tampoco hay posibilidades inmediatas de producir alimentos ricos en proteínas en cantidad suficiente y a un costo que, por económico, permitan utilizarlos en la lucha en gran escala contra la deficiencia proteínica.

Las proteínas de origen vegetal se emplean en alimentar más de dos tercios de la población humana mundial y a casi todos los animales domésticos, y es evidente que hay un vasto potencial para la suplementación de proteínas vegetales.

Continuando con la línea de investigación trazada en la Cátedra de Nutrición de nuestra Facultad, el presente trabajo de valoración de *Lisina*, *Triptófano*, completa el estudio de los aminoácidos esenciales en lentejas y garbanzos presentado como una contribución al mejor conocimiento de las proteínas vegetales consumidas por nuestro pueblo.

PARTE EXPERIMENTAL

1. MUESTRA Y PREPARACIÓN.

Se trabajó con muestras de lentejas y garbanzos provenientes de Mulchén (provincia de Bío-Bío) y de Cabrero (provincia de Concepción) respectivamente.

La muestra fue molida en molinillo para granos y luego en molino de bolas; separando la cáscara en los garbanzos, ya que es así como de preferencia se consumen.

2. DETERMINACIONES PRACTICADAS Y TÉCNICAS USADAS.

- a) *Humedad*: Por desecación a 105° C, hasta peso constante (1).
- b) *Contenido de nitrógeno*: Por el método de Kjeldahl, empleando solución de rojo de metilo y azul de metileno como indicador (2).
- c) *Aminoácidos*: Lisina y triptófano; por separación cromatográfica en columnas con resinas de intercambio iónico (3) y valoración fotocolorimétrica con reactivo ninhidrina (4, 5).

Lisina y triptófano

Se emplearon dos columnas de vidrio cargadas con resina de intercambio iónico Dowex 50W-X4 de 400 mesh y en su forma sódica (3); una para la separación de lisina y otra para triptófano. Ambas de 15 cm. de alto por 0,9 cm. de diámetro interno y revestidas por una camisa de vidrio, tipo refrigerante, que permite la circulación de agua calentada a 50° C; temperatura que se mantuvo constante mediante un termostato.

Preparación de las columnas

Se llenaron las columnas con una suspensión de resina en regulador del pH 3.25, previamente preparada, mediante un chorro continuo. Luego que sedimentó la resina se retiró el regulador sobre-nadante por succión; se equilibró la columna con regulador del pH 3.25 hervido, evitándose así la formación de burbujas de aire en la resina al calentar la columna a la temperatura requerida para el trabajo (3).

La velocidad de flujo fue de 18 ml. por hora, velocidad que se mantuvo constante regulando el goteo de la columna.

Columna A.

Para la separación de lisina se cargó la columna con 2 ml. de muestra del hidrolizado (hidrólisis ácida), ajustado previamente a pH 4 (3) y se eluyó con regulador del pH 6.8 (3), recogiendo fracciones de 3 ml. en un colector automático de fracciones de volumen constante.

Hidrólisis ácida.

Se trató 1 g. de cada una de las muestras de harina en una ampolla de vidrio con 25 ml. de HCl al 20 %; se hizo vacío, se cerraron a la llama y luego se sometió a calentamiento por seis horas a 110° C. El hidrolizado se evaporó a sequedad, se lavó con agua tres veces, evaporando cada vez y en seguida se completó a un volumen de 25 ml. (6). Algunos autores aconsejan separar la parte pro-

teica (7), pero aquí se trabajó con la muestra total, como lo hacen Stockes y cols. (8).

Se comprobó la hidrólisis total mediante la reacción de Biuret y para dipéptidos, siendo ambas negativas.

Columna B.

Se empleó para la separación de triptófano. Se cargó la columna con 2 ml. de muestra del hidrolizado (hidrólisis alcalina). Se eluyó con regulador del pH 6.8 (3), recogiendo fracciones de 3 ml. en un colector automático de fracciones a volumen constante.

Hidrólisis alcalina.

Se trató 1 g. de las harinas con ampolla de vidrio $(HO)_2Ba$ 0.38 M; se hizo vacío, se cerraron a la llama y se sometió a un calentamiento a 100° C por tres horas. Luego se trató con 5 ml. de H_2SO_4 1.9 M, se enfrió para precipitar todo el SO_4Ba , se centrifugó y el líquido sobrenadante se evaporó; se lavó tres veces con agua, evaporando cada vez; se completó a un volumen de 25 ml. (9).

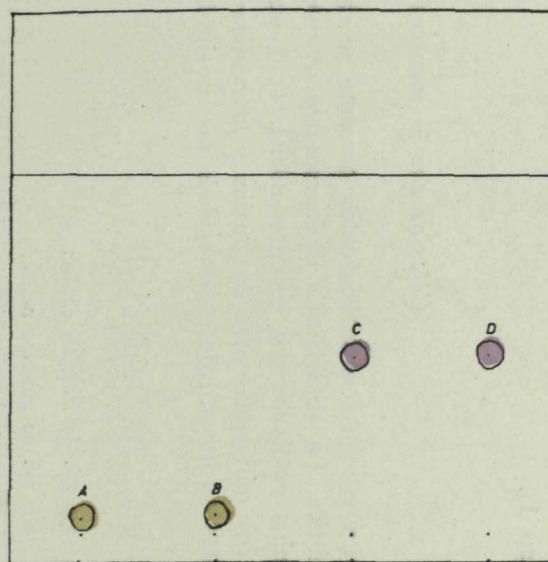
Poder de resolución

Se calculó el poder de resolución de la resina para la lisina en la columna A y para el triptófano en la columna B, con soluciones de los aminoácidos respectivos en concentraciones conocidas, siendo para:

Lisina (columna A)	94,4 %
Triptófano (columna B)	93,7 %

Coeficiente de color

El coeficiente de color para los aminoácidos en cuestión se determinó en 2 ml. de una solución 0,1 mM en el buffer en que el aminoácido emerge de la columna; en este caso fue en regulador del pH 6.8 para ambos casos. Ellos fueron: para la lisina 1.2 y para el triptófano 1.09 (10).



A: Lisina

B: "Peak" de Lisina

C: Triptófano

D: "Peak" de Triptófano

Fig. 1 a.

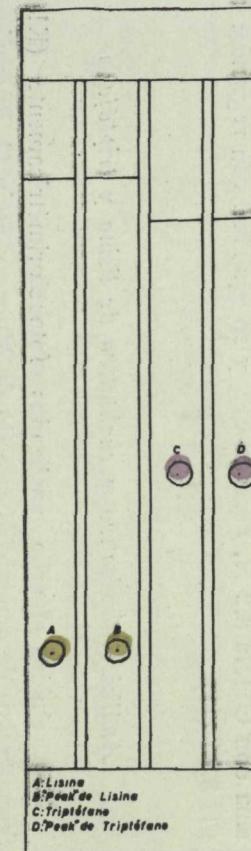


Fig. 1 b.

Regeneración de la resina en las columnas

Después de eluidos los aminoácidos a separar se regeneró la resina con OHNa 0.2 N, libre de CO₂ y se equilibró con regulador del pH 3.25 (11).

Análisis cuantitativo y cualitativo de lisina y triptófano

Los eluidos fueron analizados fotocolorimétricamente (Klett-Summerson) de acuerdo al método de Moore y Stein (4, 5) empleando filtro verde 54 y reactivo de ninhidrina al 0,2 %.

El pH 6.8 al cual emergen los aminoácidos se llevó a pH 5 con ClH 0.5 M (3) para tener las mismas condiciones en las que se hizo la curva standard de leucina.

La identificación de los «peaks» de lisina y triptófano en los eluidos se efectuó mediante cromatografía monodimensional en capa fina (12, 13 y 14) y en papel Whatman 1 (13, 14) con trazadores puros de soluciones en regulador del pH 6.8 para tenerlos en las mismas condiciones que emergen de las columnas. (Ver tabla número 1).

Cálculos con la muestra

La cantidad de aminoácidos presente se calculó por integración analítica. La absorbancia de la muestra se convirtió a mili-moles de leucina mediante una curva standard (4). Luego se calculó la suma de los mili-equivlentes de leucina y la cantidad de aminoácidos presentes en los ml. de eluidos, dada por la siguiente fórmula (5):

$$X = \frac{a \times L \times M}{b \times C \times 1000} \text{ (mg)}$$

a = ml. de fracción eluida;

b = ml. de muestra usada;

C = coeficiente de color del aminoácido (leucina = 1);

L = suma de mili-moles de leucina;

M = peso molecular del aminoácido (lisina = 182.66; triptófano = 204.23).

RESULTADOS

TABLA NÚM. 1

Coloraciones obtenidas al revelar los aminoácidos puros con el reactivo ninhidrina-Cu de Moffat y Lytle (14) para la comparación con los obtenidos por elución

Solventes	Amino ácidos	RI (18°C)	Coloraciones
a) Metiletilcetona; n-butanol; agua...	Lisina	0.032	Pardo que pasa a rosado amarillento por reposo
(2: 2: 1)	Triptófano	0.49	Violeta
En capa fina (12)			
b) n-butanol ácido acético; agua...	Lisina	0.19	Pardo que pasa a rosado amarillento por reposo
(25: 6: 25)	Triptófano	0.53	Violeta
En papel Whatman número 1 (13)			

Curva de calibración con leucina

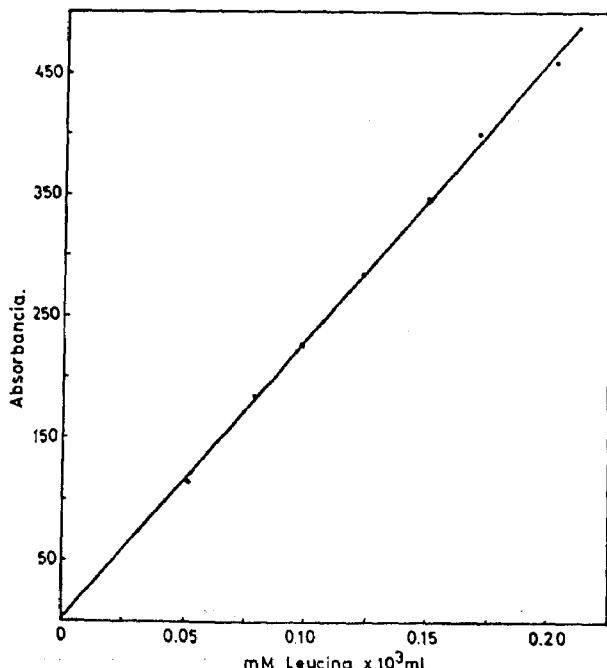


Fig. 2.

Curvas de elución de aminoácidos

- a) Lentejas
- b) Garbanzos

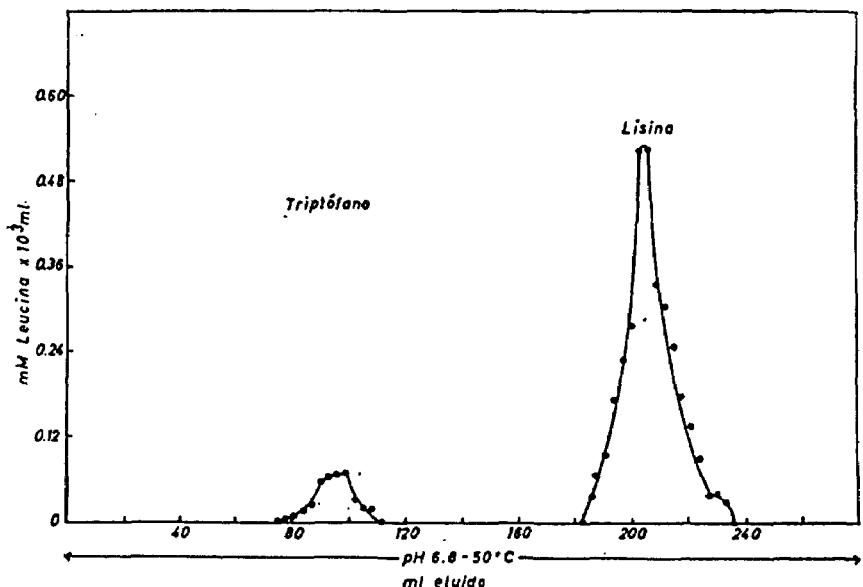


Fig. 3 a.

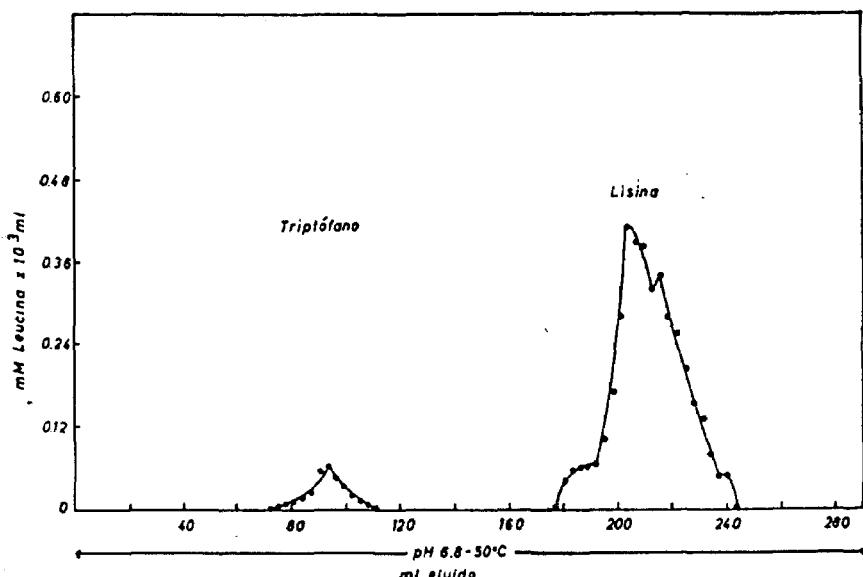


Fig. 3 b.

TABLA NÚM. 2

Contenido en agua, nitrógeno, lisina y triptófano de lentejas y garbanzos

	Muestras Nº	Humedad g/100 g	Nitrógeno g/100 g	Lisina mg/gN	Triptófano mg/gN
Lentejas (<i>Lens esculenta</i>)...	12	8,43	3,97	482	63
Garbanzos (<i>Cicer arietinum</i>)	10	9,97	2,66	572	52

TABLA NÚM. 3

Comparación de valores con otros autores

	Triptófano mg/gN		Lisina mg/gN	
	Lentejas	Garbanzos	Lentejas	Garbanzos
Dept. Agro USA (*)...	54	51	—	431
Harvey USA (*)	19	38	—	400
Huges India (*)	—	29	—	—
Colobrazo Sanahuja (7)	—	29	—	—
F. A. O. (*)	30	49	—	433
Mét. químico Ros y cols. (*)	—	39,7	—	489
Mét. microb., Ros y cols. (*)	—	24,98	—	—
CÁTEDRA	63	52	482	572

(*) Citados por M. Ros, K. Alamo e I. Pennacchiotti (15).

DISCUSIÓN

El empleo de la cromatografía monodimensional, tanto en papel Whatman número 1, como en capa fina según Stahl (12), dio buenas separaciones de los aminoácidos en estudio al emplear tanto el disolvente metil etil cetona, butanol, agua (2: 2: 1) como el n-butanol, ácido acético, agua (25: 6: 25) (13) y el revelador reactivo ninhidrina-Cu de Moffart y Lytle (14). Las coloraciones y Rf obtenidos se dan en tabla núm. 1.

Los valores encontrados para lisina indican un mayor contenido de este aminoácido en garbanzos que en lentejas. Para triptófano, en cambio, son las lentejas las que lo contienen en mayor cantidad (tabla núm. 2).

Comparación de los valores encontrados en la proteína de lentejas y garbanzos con el Patrón de aminoácidos de la Proteína Provisional (F. A. O. 1957)

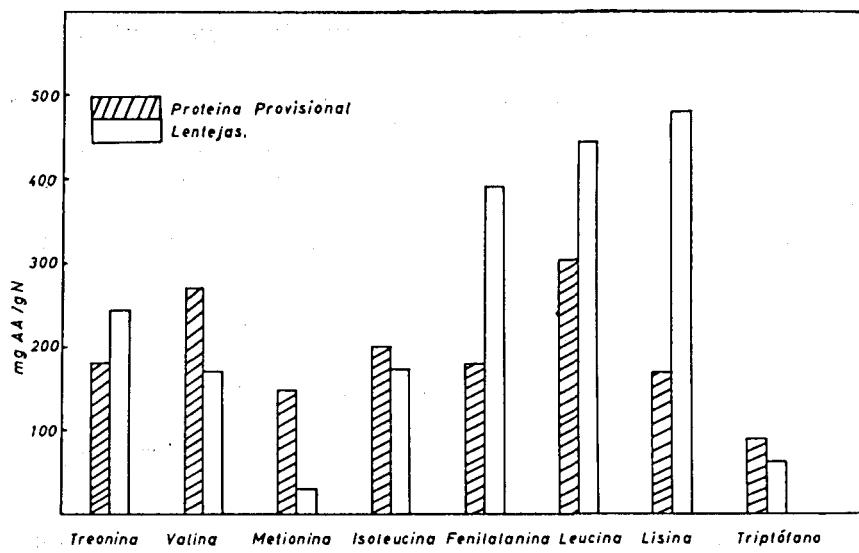


Fig. 4 a.—Lentejas.

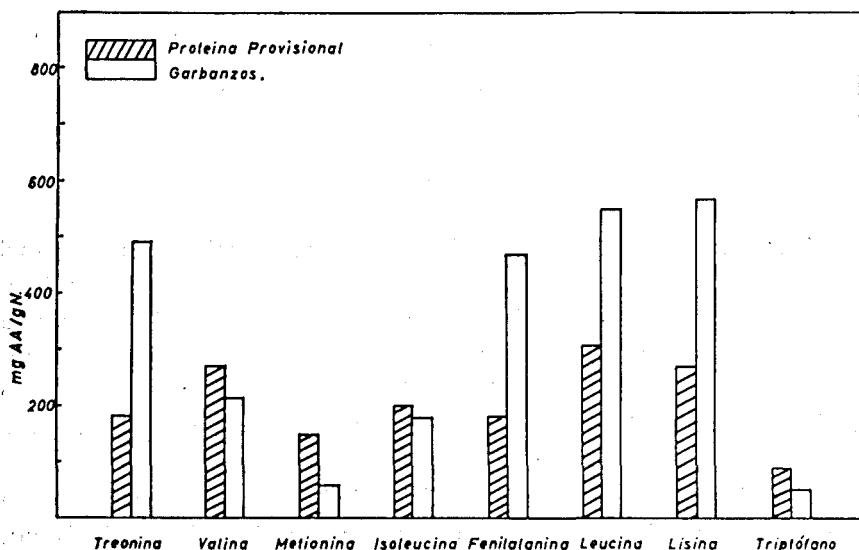


Fig. 4 b.—Garbanzos.

Los resultados obtenidos dan valores de triptófano en lentejas y garbanzos cercanos a los dados por Dpto. of Agr. (U. S. A.), pero superiores a los de Harvey; Huges; Ros Alamo y Pennacchiotti (15) y Colobraro y Sanahuja (7).

Los valores obtenidos para lisina en garbanzos son algo superiores a los de otros autores. Para lisina en lentejas no se encontraron referencias.

Evaluación nutricional

Se estimó conveniente presentar en este trabajo, no sólo la comparación de los valores de lisina y triptófano con el patrón de aminoácidos de la Proteína Provisional de F. A. O. (1957) (16), sino que aprovechando los estudios anteriores de Sanzana (17) y Torres (18), evaluar la calidad nutricional de las proteínas de lentejas y garbanzos; comparando su contenido en aminoácidos esenciales con el de la Proteína Provisional de F. A. O. (1957).

Tanto en la proteína de lentejas como en la de garbanzos el aminoácido limitante encontrado fue metionina y valina en segundo término. En base a esto se obtuvo para la proteína de lentejas un límite proteínico de 20.8 en términos de metionina y de 62.9 en términos de valina, y para la proteína de garbanzos fue de 39 y 76 respectivamente.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se determinó el contenido de lisina y triptófano en lentejas y garbanzos por cromatografía en columna usando resina Dowex 50W-X4 según Moore y Stein.

Para la identificación de los aminoácidos eluidos se utilizó la técnica cromatográfica monodimensional en papel y capa fina empleando como solventes: metil etil cetona, n-butano, agua (2: 2: 1) y n-butanol, ácido acético, agua (25: 6: 25), y como revelador ninhidrina-Cu, según Moffat y Lytle.

Los resultados obtenidos se compararon con los otros autores y con el patrón de aminoácidos de la Proteína Provisional de F. A. O. (1957).

Se calculó el límite proteínico de la proteína de lentejas y de

garbanzos con la complementación de datos obtenidos en estudios anteriores, dando 20,8 y 39 en términos de metionina para la proteína de lentejas y de garbanzos, respectivamente.

De donde se deduce que:

- a) En ambas proteínas el aminoácido limitante es metionina, seguido de valina como segundo aminoácido limitante.
- b) La proteína de lentejas y la de garbanzos por sí solas no son satisfactorias para el crecimiento y mantenimiento humano, por tener un límite proteínico bajo.
- c) La proteína de garbanzos posee mejor calidad nutricional que la de lentejas.

REFERENCIAS

- (1) *Association of Agricultural Chemist: Official Methods of Analysis*, Ninth Ed., 130, Washington 1960.
- (2) KENT-JONES, D. W. y AMOS, A. J.: *Modern Cereal Chemistry*, Liverpool England, «The Northern publishing C. O. Ltd.», 549, 1957.
- (3) MOORE, S. y STEIN, W.: «J. Biol. Chem.», 192, 663-681 (1951).
- (4) MOORE, S. y STEIN, W.: «J. Biol. Chem.», 211, 893-913 (1954).
- (5) SARAVACOS, G., LUH, B. S. y LEONARD, S. J.: «Food Research», 23, 329-337 (1958).
- (6) COWGILL, R. y PARDEE, A.: *Experiments in biochemical Research Technique*, 51, New York, John Wiley and Sons, 1957.
- (7) COLOBRARO, V. y SANAHUIJA, J. C.: «Anales de Bromatología», IX, 61-65 (1957).
- (8) STOKES y cols.: «J. Biol. Chem.», CLX, 35 (1945).
- (9) COWGILL, R. y PARDEE, A.: *Experiments in Biochemical Research Technique*, 52, New York, John Wiley and Sons, 1957.
- (10) MOORE, S. y STEIN, W.: «J. Biol. Chem.», 176, 367-388 (1948).
- (11) CLEMENTS, R. y LELAND, H.: «J. Food Sc.», 27, 20-25 (1962).
- (12) STAHL, EGON.: *Thin Layer Chromatography*. Folleto Casa Merck.
- (13) MIZELL, M. y SIMPSON, S., Jr.: «J. Chromatog.», 5, 157-160 (1961).
- (14) MOFFAT, E. D. y LYTLE, R. I.: «Anal. Chem.», 31, 926-929 (1959).
- (15) Ros, M., ALAMO, K. y PENNACCHIOTTI, I.: *Contenido en aminoácidos de algunas leguminosas chilenas*. Trabajo presentado al Primer Congreso de Nutrición, Bromatología y Toxicología realizado en Santiago, octubre 1963.

- (16) BANDEMER, S. y EVANS, R. J.: «J. Agr. Food Chem.», 11, 134-136 (1963).
- (17) SANZANA, H.: *Treonina, valina y metionina en garbanzos y lentejas.* Tesis de Químico-Farmacéutico; Facultad de Química y Farmacia, U. de Concepción (Chile) (1964).
- (18) TORRES, G.: *Contenido de isoleucina, leucina y fenilalanina en dos legumbres chilenas.* Tesis de Químico-Farmacéutico; U. de Concepción (Chile) (1964).