
**CONCENTRADOS DE *Cajanus cajanus* Y *Phaseolus vulgaris*
FERMENTADOS E HIDROLIZADOS: INGREDIENTES FUNCIONALES
PARA EL DESARROLLO DE ALIMENTOS**

Suhey Pérez y Marisela Granito

RESUMEN

La fermentación de las leguminosas disminuye los factores productores de flatulencia, incrementa la biodisponibilidad de su proteína y modifica las propiedades funcionales. Por otra parte, la hidrólisis proteica permite mejorar las características nutricionales, retrasar el deterioro, potenciar o reducir las propiedades funcionales y eliminar compuestos antinutritivos. Se estudió el efecto de la hidrólisis con pepsina sobre las características nutricionales, propiedades funcionales y actividad de atrapamiento de radicales libres (RSA), de concentrados de *Cajanus cajan* y *Phaseolus vulgaris* obtenidos a partir de granos crudos y de granos sometidos a fermentación natural. Se encontró que la fermentación en combinación con hidrólisis con pepsina aumenta la calidad nutricional de los concen-

trados al aumentar la digestibilidad proteica hasta 90,5% en concentrados extraídos de granos fermentados de *C. cajan* y hasta 94,6% en concentrados extraídos de granos fermentados de *P. vulgaris*. Adicionalmente, en estos concentrados no se detectó actividad de inhibición de tripsina. La RSA aumentó con la hidrólisis enzimática de los concentrados obtenidos de granos fermentados o no, para ambas especies. Por otra parte, la solubilidad proteica en el punto isoeléctrico aumentó significativamente ($P < 0,05$) con la hidrólisis enzimática y en consecuencia mejoraron la solubilidad y capacidad emulsificante, lo que permite sugerir la incorporación de los hidrolizados de *P. vulgaris* y *C. cajan* en la formulación de bebidas instantáneas y productos emulsionados.

Introducción

Las leguminosas constituyen el único aporte proteico de muchas poblaciones del tercer mundo y son, en general, una importante fuente

proteica para la creciente población mundial que necesita reducir los riesgos asociados al consumo de proteína animal (Duranti, 2006). Algunos estudios han demostrado que las proteínas de leguminosas

no sólo son fuente de compuestos nutritivos, tales como los aminoácidos, sino que pueden ser fuente de compuestos bioactivos; entre las funciones más conocidas de estos compuestos están la in-

munomodulativa, antihipertensiva, antitrombótica y actividad opioide (Wang y González de Mejía, 2005)

Sin embargo, el uso de proteínas provenientes de leguminosas está limitado por la

PALABRAS CLAVE / *Cajanus Cajan* / Capacidad de Atrapamiento de Radicales Libres / Fermentación / Hidrólisis Enzimática / *Phaseolus Vulgaris* / Propiedades Funcionales /

Recibido: 04/03/2011. Modificado: 23/04/2012. Aceptado: 02/05/2012.

Suhey Pérez. M.Sc. en Ciencia de los Alimentos, Universidad Simón Bolívar (USB), Venezuela. Profesora, USB, Venezuela. e-mail: suheyperez@usb.ve

Marisela Granito. Doctora en Ciencias de los Alimentos, USB, Venezuela. Profesora, USB, Venezuela. Dirección: Departamento de Tecnología

de Procesos Biológicos y Bioquímicos, USB. Caracas 1090A, Venezuela. e-mail: mgranito@usb.ve

FERMENTED AND HYDROLIZED CONCENTRATES OF *Cajanus cajan* AND *Phaseolus vulgaris*: FUNCTIONAL INGREDIENTS FOR FOOD MANUFACTURE

Suhey Pérez and Marisela Granito

SUMMARY

The fermentation of legumes reduces the flatulus producing factors, increases the bio-availability of their protein and modifies the functional properties. On the other hand, pepsin protein hydrolysis permits to improve the nutritional characteristics, to delay spoilage, to potentiate or reduce the functional properties and to eliminate anti-nutritive compounds. The effect of pepsin hydrolysis on the nutritional characteristics, functional properties and free radical scavenging activity (RSA) was studied in concentrates of *Cajanus cajan* and *Phaseolus vulgaris* obtained from raw and naturally fermented grains. Fermentation combined with pepsin hydrolysis increases the nutritional quality of the concentrates by augmenting

the protein digestibility up to 90.5% in concentrates extracted from *C. cajan* fermented grains and up to 94.6% in concentrates extracted from *P. vulgaris*. Additionally, no inhibition of trypsin activity was found in these concentrates. The RSA increased with enzymatic activity of the concentrates obtained from fermented or non-fermented grains of both species. On the other hand, protein solubility at the isoelectric point increased significantly ($P < 0.05$) with enzymatic hydrolysis and therefore, the solubility and emulsifying capacity improved. This allows to suggest the use of hydrolysates of *P. vulgaris* and *C. cajan* in the formulation of instant beverages and emulsified products.

CONCENTRADOS DE *Cajanus cajan* E *Phaseolus vulgaris* FERMENTADOS E HIDROLISADOS: INGREDIENTES FUNCIONAIS PARA O DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTOS

Suhey Pérez e Marisela Granito

RESUMO

A fermentação das leguminosas diminui os fatores produtores de flatulência, incrementa a biodisponibilidade de sua proteína e modifica as propriedades funcionais. Por outra parte, a hidrólise proteica permite melhorar as características nutricionais, retardar a deterioração, potencializar ou reduzir as propriedades funcionais e eliminar compostos antinutricionais. Estudou-se o efeito da hidrólise com pepsina sobre as características nutricionais, propriedades funcionais e atividade sequestradora de radicais livres (RSA), de concentrados de *Cajanus cajan* e *Phaseolus vulgaris* obtidos a partir de grãos crus e de grãos submetidos à fermentação natural. Encontrou-se que a fermentação em combinação com hidrólise com pepsina aumenta a qualidade nutricional dos concentrados ao aumentar a

digestibilidade proteica até 90,5% em concentrados extraídos de grãos fermentados de *C. cajan* e até 94,6% em concentrados extraídos de grãos fermentados de *P. vulgaris*. Adicionalmente, nestes concentrados não foi detectada atividade de inibição de tripsina. A RSA aumentou com a hidrólise enzimática dos concentrados obtidos de grãos fermentados ou não, para ambas as espécies. Por outra parte, a solubilidade proteica no ponto isoelétrico aumentou significativamente ($P < 0,05$) com a hidrólise enzimática e em consequência melhoraram a solubilidade e capacidade emulsificante, o que permite sugerir a incorporação dos hidrolisados de *P. vulgaris* e *C. cajan* na formulação de bebidas instantâneas e produtos emulsionados.

deficiencia de aminoácidos esenciales azufrados y por la presencia de factores antinutricionales (Seena *et al.*, 2005). Para mejorar el valor nutritivo y digestibilidad de las proteínas de leguminosas se pueden aplicar métodos de remojo, descascarado, germinación, fermentación, cocción e irradiación (Frarnworth, 2003). La fermentación de leguminosas produce la disminución de factores antinutricionales, incrementa la vida útil y modifica las propiedades sensoriales, lo cual a veces se traduce en una mejor aceptabilidad por el público consumidor; los cambios fer-

tados dependerán de las condiciones de la fermentación (Granito *et al.*, 2002).

Particularmente, se ha encontrado que al fermentar granos de *Phaseolus vulgaris* y *Cajanus cajan* se reducen significativamente los enlaces α -galactosídicos y la fibra soluble, compuestos altamente fermentables por las bacterias colónicas y por tanto productores de flatulencia. Otros factores antinutricionales se reducen o eliminan con la fermentación, como los inhibidores de proteasas, el derivado IP₆ del fosfato inositol y los taninos; lo cual trae como consecuencia el aumento de la digestibilidad. (Granito *et al.*,

2002; Torres *et al.*, 2006).

En estudios más recientes se ha encontrado que la fermentación modifica significativamente las propiedades funcionales de las harinas de *P. vulgaris*, ya que mejora la capacidad emulsificante, posiblemente debido a una posible desnaturalización parcial de la proteína (Granito *et al.*, 2009).

La funcionalidad le imparte valor agregado a las proteínas, pues complementa su ya establecido valor nutricional. Las propiedades funcionales son características físico químicas de las proteínas que determinan su comportamiento en los sistemas alimenticios durante su preparación, procesamien-

to, almacenamiento y consumo. Estas propiedades son afectadas, entre otras cosas, por características moleculares de las proteínas tales como composición aminoacídica, rigidez estructural, hidrofobicidad, hidrofiliidad y punto isoelétrico.

Los concentrados y aislados de leguminosas son utilizados en la industria de los alimentos para ejercer un rol funcional, pues poseen propiedades de solubilidad, gelificación, emulsificación y espumado. Sin embargo, en alimentos ácidos estas propiedades se reducen significativamente, por la cercanía del pH del alimento al punto

isoeléctrico de la proteína. La hidrólisis enzimática con control sobre la proteólisis puede mejorar las propiedades funcionales en un amplio intervalo de pH.

La hidrólisis proteica permite mejorar las características nutricionales, retrasar el deterioro, eliminar compuestos antinutritivos, así como modificar sus propiedades funcionales (Meisel y Fitzgerald, 2003; Khalil, 2006). La hidrólisis enzimática genera péptidos cuyo valor nutricional es mayor que el de la proteína nativa o los aminoácidos libres. Adicionalmente, la proteólisis *in vitro* se puede considerar una pre-digestión de las proteínas que mejora su absorción a nivel intestinal (Villanueva *et al.*, 1999).

Los hidrolizados proteicos no sólo poseen propiedades funcionales y nutricionales. Algunos estudios han demostrado que estos poseen actividad antioxidante. Hirose y Miyashita (1999) encontraron que al aumentar el grado de hidrólisis de las proteínas de soja aumentaba su actividad de atrapamiento de radicales libres, al tiempo que aumentaba su capacidad de inhibir la oxidación de sistemas emulsificados con triacilglicerolos.

El estrés oxidativo tiene un rol significativo en el desarrollo de enfermedades asociadas a la vejez. Los factores involucrados son principalmente la peroxidación de lípidos y la producción de compuestos de bajo peso molecular en las reacciones oxidativas, por lo cual se considera de importancia la incorporación de compuestos capaces de prevenir la peroxidación de lípidos y/o las reacciones de radicales libres a fin de ofrecer al consumidor protección contra esas enfermedades (Halliwell *et al.*, 1995).

En el presente trabajo se estudió el efecto de la hidrólisis con pepsina sobre las características nutricionales, propiedades funcionales y actividad de atrapamiento de

radicales libres de concentrados de *Cajanus cajan* y *Phaseolus vulgaris* obtenidos a partir de granos crudos y granos sometidos a fermentación natural.

Materiales y Métodos

Muestras

Las muestras de *Cajanus cajan* y *Phaseolus vulgaris* fueron adquiridas en un mercado local. Se retiraron los granos infestados y los partidos. Los granos fueron divididos en dos lotes de 1kg cada uno. El primer lote fue sometido a fermentación y el otro no.

Fermentación

Los granos enteros fueron enjuagados por triplicado con agua destilada y sumergidos en una solución de ácido láctico 1% durante 15min. Posteriormente se drenó la solución de ácido láctico y los granos se enjuagaron nuevamente tres veces con agua destilada.

Los granos higienizados fueron colocados en agua destilada estéril en proporción 1:4 (p/v) y fermentados durante 48h a 42°C y 440rpm en un fermentador Microferm (New Brunswick Scientific). Culminado el tiempo de fermentación los granos fueron drenados, liofilizados, molidos y pasados por un tamiz de 80 mesh (Granito *et al.*, 2002).

Preparación de los concentrados

Los concentrados del material fermentado y sin fermentar se obtuvieron por extracción alcalina y precipitación en el punto isoeléctrico de la proteína, siguiendo el método de Adebowale *et al.* (2003).

Hidrólisis de los concentrados con pepsina

La hidrólisis de los concentrados se llevó a cabo según Megias *et al.* (2004) en un vaso de precipitado provisto de un agitador magnético y un electrodo para la determinación del pH. Se prepararon

100ml de una solución al 10% del concentrado, luego se agregaron 5ml de una solución de pepsina de mucosa gástrica de cerdo (0,7 FIP-U/mg, EC 3.4.23.1; Merck, Alemania) al 10%, el pH se ajustó a 2 y la mezcla se incubó a 37°C durante 30, 60, 90 y 120min. Las variaciones de pH durante la hidrólisis fueron compensadas con la adición de NaOH 0,0001N. La reacción se detuvo ajustando el pH a 7.

Finalmente, los hidrolizados fueron filtrados a través de una membrana de 0,45µm para remover el sustrato insoluble y posteriormente liofilizados.

Inhibidores de tripsina

La actividad de inhibición de tripsina (AIT) se cuantificó a través del método de Kakade *et al.* (1974), para lo cual se definió que una unidad de tripsina incrementa la absorbancia a 410nm en 0,01 unidades por cada 10ml de la mezcla de reacción. La AIT se expresa en términos de unidades de tripsina inhibida por mg de muestra en base seca.

Digestibilidad proteica *in vitro*

La digestibilidad *in vitro* se determinó usando un sistema multienzimático de tripsina, quimiotripsina y peptidasa. El grado de hidrólisis enzimática se determinó por el método de la caída del pH después de 10min, según Hsu *et al.* (1977).

Propiedades funcionales

Solubilidad proteica. La solubilidad proteica se determinó a través del método propuesto por Morr *et al.* (1985) y se expresó como la relación entre el contenido de proteína en el sobrenadante y el contenido de proteína de la muestra multiplicado por 100.

Capacidad espumante y estabilidad de espuma. La capacidad espumante se cuantificó empleando el método propues-

to por Bencini (1986) y se expresó como la relación del volumen de espuma respecto al volumen inicial de solución por 100.

Capacidad emulsificante y estabilidad de emulsión. La capacidad emulsificante se determinó con el método propuesto por Yasumatsu *et al.* (1992). La estabilidad de emulsión se expresó como el porcentaje de la emulsión remanente luego del calentamiento, de acuerdo con el método de Lqari *et al.* (2002).

Determinación del grado de hidrólisis. El grado de hidrólisis, definido como el porcentaje de enlaces peptídicos escindidos en una proteína, se calculó determinando los grupos amino libres por reacción con el TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico), siguiendo el método de Adler-Nissen (1976). El número total de grupos amino se determinó en una muestra de concentrado obtenido de granos crudos que fue hidrolizada 100% a 110°C durante 24h en HCl 6N.

Actividad de atrapamiento de radicales libres. El efecto atrapador de los concentrados fue determinado con el método de Chen *et al.* (1996). Se utilizó como patrón una mezcla de 1000ppm del reactivo 1,1-difenil-2-picril hidrazilo (DPPH) en etanol, y se midió su absorbancia a 517nm. El efecto atrapador se calculó de acuerdo a la expresión

$$\text{Efecto atrapador} = \left[1 - \left(\frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs patrón}} \right) \right] \times 100$$

Resultados y Discusión

En la Tabla I se puede apreciar el efecto de la hidrólisis con pepsina sobre la AIT y la digestibilidad proteica. Los concentrados obtenidos de granos de *Cajanus cajan* no fermentados y posteriormente hidrolizados durante 120min (CCCC 120min) presentaron una disminución del 71% de la AIT respecto a los

TABLA I
CALIDAD NUTRICIONAL DE LOS CONCENTRADOS E HIDROLIZADOS *Cajanus cajan* Y *Phaseolus vulgaris*

Muestra / Tiempo de hidrólisis (min)	AIT		Digestibilidad proteica	
	0	120	0	120
CCCC	11,36 ±0,11 b;1**	3,31 ±0,07 a;2	79,8 ±0,3 a;1	81,6 ±0,4 b;1
CFCC	ND	ND	84,2 ±1,3 a;2	90,5 ±0,8 b;2
CCPV	13,16 ±0,09 b;2	2,26 ±0,04 a;1	88,4 ±1,1 a;3	90,1 ±0,4 b;2
CFPV	ND	ND	90,9 ±0,6 a;4	94,6 ±0,7 b;3

CCCC: concentrado obtenido de granos crudos de *Cajanus cajan*. CFCC: concentrado obtenido de granos fermentados de *Cajanus cajan*. CCPV: concentrado obtenido de granos crudos de *Phaseolus vulgaris*. CFPV: concentrado obtenido de granos fermentados de *Phaseolus vulgaris*. ** **Valores en una misma columna o fila con letras o números diferentes presentaron diferencias significativas $P < 0,05$.

concentrados de *C. cajan* sin tratamiento enzimático (CCCC), mientras que los concentrados de *Phaseolus vulgaris* no fermentada (CCPV 120min) presentaron una reducción de 83% en la AIT, respecto a los concentrados de *P. vulgaris* sin hidrolizar (CCPV).

La reducción de la AIT en este caso podría atribuirse a la desnaturalización proteica por efecto del pH durante el proceso de extracción del inhibidor y a la posterior digestión con pepsina (Oliva y Sampaio, 2009). Clemente *et al.* (1999) hidrolizaron concentrados de *Cicer arietinum* con alcalasa y una mezcla de aminopeptidasas, reduciendo la AIT en 80% y encontrando que la reducción de actividad

de inhibición de tripsina depende de la enzima utilizada y de la estructura de la proteína hidrolizada.

Por otra parte, en los concentrados obtenidos de granos fermentados de *C. cajan* (CFCC) y en los obtenidos de granos fermentados de *P. vulgaris* (CFPV), así como en sus hidrolizados con pepsina, no se detectó AIT, con lo cual se puede inferir que el proceso de fermentación fue suficiente para eliminar los inhibidores de tripsina.

La reducción de los factores antinutricionales en CFCC y CFPV podría ser atribuido, al menos parcialmente, a la acción de enzimas externas de las bacterias responsables de la fermentación. Huo *et al.* (1993) reportaron la inactivación de

inhibidores de tripsina, quimiotripsina y lectinas de soya cruda por incubación con proteasas microbianas; por otra parte, otros autores señalan que la disminución de la AIT es debida a la solubilización de estas proteínas en el caldo de fermentación (Tabera *et al.*, 1995). do Prado *et al.* (1980) estudiaron la solubilidad de la fracción de proteínas de soya con actividad inhibitoria de tripsina y encontraron que estas son solubles a pH 4,5, que es justamente el pH al cual ocurre la fermentación.

Tanto la hidrólisis enzimática como la fermentación incrementaron la digestibilidad proteica (Tabla I). Para *C. cajan* la fermentación incrementó en 5,5% la digestibilidad, mientras que la hidrólisis lo hizo en

2,3%; la combinación de ambos procesos produjo un incremento de la digestibilidad de 13,4%, con lo cual se podría inferir que la combinación de estos dos procesos tiene un efecto sinérgico. La fermentación inicialmente reduce o desnaturaliza a los inhibidores de proteinasas, lo cual permite que la pepsina pueda acceder más fácilmente a los enlaces peptídicos e hidrolizarlos (Kunitz, 1946).

Un efecto similar al descrito se observó con los concentrados de *P. vulgaris*. Luego de hidrolizar durante 120min el CCPV su digestibilidad proteica aumentó en 2,8%; por su parte la digestibilidad proteica del concentrado obtenido de granos fermentados fue 1,9% superior a la de CCPV, y la combinación de procesos de fermentación e hidrólisis por 120min mostró una digestibilidad proteica 7,0% superior a CCPV.

Paredes-López y Harry (1989) y Angulo-Bejarano *et al.* (2008) reportaron que el incremento de la digestibilidad proteica *in vitro* es consecuencia de la eliminación de factores antinutricionales, como por ejemplo la hidrólisis de ácido fítico y la reducción de inhibidores de proteinasas.

En la Tabla II se observa que el grado de hidrólisis alcanzado por los concentrados de *C. cajan* y *P. vulgaris* extraídos de granos no fermentados aumentó significativamente ($P < 0,05$) durante el tiempo de hidrólisis.

Es de hacer notar que el grado de hidrólisis alcanzado por CFCC al cabo de 120min fue 24,1% mayor que el alcanzado por CCCC para el mismo tiempo de tratamiento enzimático. De igual manera, para *P. vulgaris* el grado de hidrólisis del concentrado fermentado fue 21,7% superior al concentrado no fermentado. Lo anterior podría atribuirse a la desnaturalización e hidrólisis producida durante la fermentación, lo que facilita la acción de la enzima sobre las proteínas de *C. cajan* y *P. vulgaris*, las cuales en su mayoría son globulinas cuya estructura cuaternaria nativa

TABLA II
GRADO DE HIDRÓLISIS Y ACTIVIDAD DE ATRAPAMIENTO DE RADICALES LIBRES DE CONCENTRADOS DE *Cajanus cajan* Y *Phaseolus vulgaris* HIDROLIZADOS CON PEPSINA PORCINA

Muestra/ Tiempo de hidrólisis (min)	%DH					%RSA				
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
CCCC	0 ±0,0 a; 1	2,52 ±0,13 b; 1	16,87 ±0,04 c; 1	21,94 ±0,09 d; 1	23,81 ±1,42 e; 1	19,01 ±0,10 a; 2	16,46 ±0,03 b; 2	21,62 ±0,25 c; 1	23,11 ±0,41 d; 1	22,91 ±0,02 d; 1
CFCC	12,34 ±0,19 a; 2	14,69 ±0,75 b; 2	20,79 ±0,02 c; 2	28,61 ±0,71 d; 2	31,37 ±0,26 e; 3	24,01 ±0,11 a; 3	24,03 ±0,33 a; 3	24,08 ±0,24 a; 2	25,67 ±0,70 b; 2	31,06 ±0,91 c; 3
CCPV	0 ±0,12 a; 1	13,74 ±0,33 b; 2	20,94 ±0,28 c; 2	26,53 ±0,47 d; 2	27,11 ±0,94 d; 2	8,14 ±0,65 a; 1	10,27 ±0,01 b; 1	20,45 ±0,12 c; 1	26,75 ±0,62 d; 2	29,47 ±0,20 e; 3
CFPV	17,62 ±0,56 a; 3	21,37 ±0,74 b; 3	34,37 ±0,21 c; 3	34,61 ±0,05 c; 3	34,64 ±0,50 c; 4	17,64 ±0,32 a; 2	18,05 ±0,32 a; 2	25,67 ±0,49 b; 3	24,99 ±0,16 b; 2	24,83 ±0,26 b; 2

CCCC: concentrado obtenido de granos crudos de *Cajanus cajan*, CFCC: concentrado obtenido de granos fermentados de *Cajanus cajan*, CCPV: concentrado obtenido de granos crudos de *Phaseolus vulgaris*, CFPV: concentrado obtenido de granos fermentados de *Phaseolus vulgaris*. Valores en una misma columna o fila con letras o números diferentes presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$).

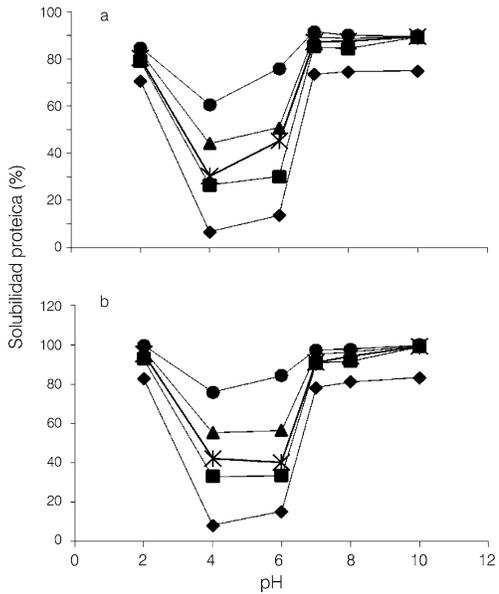


Figura 1. Solubilidad de concentrados de *Cajanus cajan*. a: CCCC, b: CFCC. ◆: 0min de hidrólisis con pepsina, ■: 30 min de hidrólisis con pepsina, * : 60 min de hidrólisis con pepsina, ▲: 90 min de hidrólisis con pepsina, ●: 120min hidrólisis con pepsina.

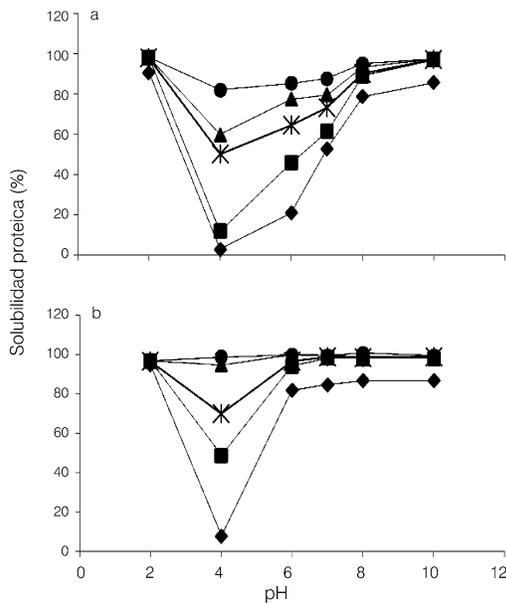


Figura 2. Solubilidad de concentrados de *Phaseolus vulgaris*. a: CCPV, b: CFPV. ◆: 0min, ■: 30min, * : 60min, ▲: 90min, y ●: 120min hidrólisis con pepsina.

dificulta el acceso a las enzimas digestivas.

En la Tabla II se observa que luego de 120min de hidrólisis CCCC y CFCC mostraron 22,91 y 31,06% de actividad de atrapamiento de radicales libres, respectivamente. En el caso de *P. vulgaris* CCPV y CFPV mostraron una actividad de atrapamiento de radicales libres de 29,47 y 24,83%, respectivamente.

A pesar que no se cuantificaron los aminoácidos presentes, el incremento del efecto atrapador de radicales libres con el tiempo de hidrólisis permite inferir la formación de péptidos que poseen residuos aminoácidos con capacidad antioxidante tal como lo son Try, Met, His, Gly, Val, Lys y Trp (Wade y Tucker, 1998).

Desde el punto de vista tecnológico la capacidad de atrapar

radicales libres produce aumento en la vida útil de los alimentos, dado que los radicales libres causan la auto-oxidación de lípidos insaturados (Kaur y Perkins, 1991). Así, la incorporación de los hidrolizados de *C. cajan* y *P. vulgaris*, obtenidos de granos fermentados o no, en formulaciones alimenticias, podría tener efecto beneficioso sobre la salud y/o sobre el tiempo de vida útil de los alimentos.

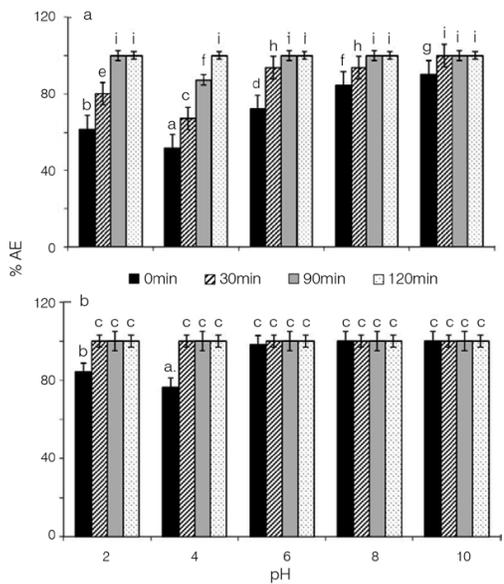


Figura 3. Actividad emulsificante de concentrados de *Cajanus cajan*. a: CCCC, b: CFCC.

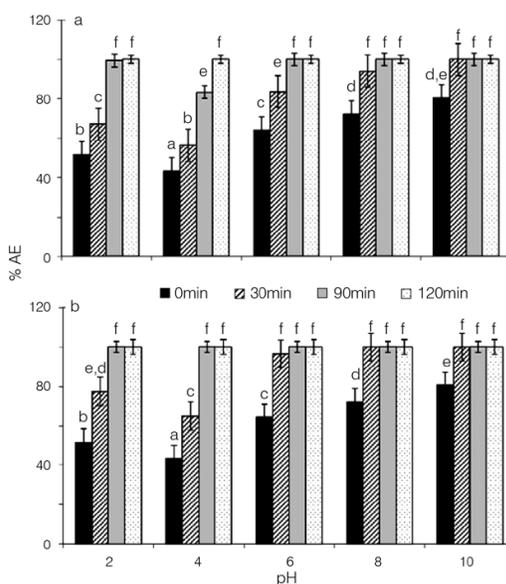


Figura 4. Actividad emulsificante de concentrado de *Phaseolus vulgaris*. a: CCPV, b: CFPV.

La solubilidad es considerada como una de las más importantes propiedades funcionales de las proteínas, pues esta afecta a otras propiedades funcionales, tales como las propiedades hidrodinámicas, las cuales requieren solubilidades de media a completa, para la formulación de emulsiones, espumas y geles.

Tal como se muestra en la Figura 1, la hidrólisis con pepsina mejoró significativamente la solubilidad de los concentrados CCCC. En el punto isoeléctrico (pH 4) la solubilidad aumentó desde 6,6 hasta 60,8% al cabo de 120min de hidrólisis con pepsina. En este mismo intervalo de tiempo para los concentrados CFCC se observaron incrementos desde 8,3 hasta 76%.

Luego de 120min de hidrólisis con pepsina para CCPV y CFPV la solubilidad se incrementó desde 3 hasta 82,2% y desde 8 hasta 99%, respectivamente (Figura 2).

De acuerdo a Deeslie y Cheyan (1988) y Benítez *et al.* (2008) en el punto isoeléctrico de la proteína la solubilidad generalmente aumenta con la hidrólisis, lo cual es principalmente el resultado de la reducción en el peso molecular y del aumento en el número de grupos polares expuestos.

Las interacciones entre las proteínas y los lípidos son comunes en muchos sistemas alimenticios. El incremento de la exposición de los residuos hidrofóbicos por desnaturalización o hidrólisis contribuye a la formación de emulsiones.

En la Figura 3 se aprecia que la capacidad emulsificante de CCCC y CFCC aumentó significativamente con la hidrólisis con pepsina. Al cabo de 90min de hidrólisis del concentrado CCCC a pH 4 se alcanzó el 87,3% de capacidad emulsificante. Por otra parte, a pH 4 el concentrado fermentado de *C. cajan* luego de 30min de hidrólisis la capacidad alcanzó el 100%.

En relación a los concentrados e hidrolizados de *P. vulgaris* obtenidos de granos fermentados y sin fermentar, en la Figura 4 se muestra que la

ESTABILIDAD DE EMULSIÓN DE CONCENTRADOS E HIDROLIZADOS. DE *Cajanus cajan* Y *Phaseolus vulgaris*

Tiempo (min)	pH 2					pH 4					pH 6					pH 8					pH 10				
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
CCCC	42,3 ±1,3 h; 1	41,2 ±2,1 g; h; 3	40,3 ±1,8 g; 3	18,7 ±0,9 c; 2	13,3 ±1,8 a; 1	52,1 ±2,1 k; 1, 2	51,4 ±0,5 k; 2	46,3 ±1,2 j; 3	43,7 ±1,7 i; 4	37,0 ±1,2 3	63,3 ±0,8 n; 1	53,1 ±0,6 l; 3	40,0 ±0,2 g; 3	35,7 ±1,6 e; 2	26,3 ±1,4 d; 2	67,7 ±2,3 o; 1	64,1 ±1,4 n; 3	60,2 ±1,0 m; 3	37,0 ±1,0 3	25,6 ±0,8 d; 2	85,3 ±2,4 r; 2	77,7 ±1,4 q; 2	70,3 ±0,8 p; 2	12,5 ±1,7 a; 3	16,7 ±1,6 b; 2
CFCC	72,7 ±0,7 k; 3	63,0 ±0,3 i; 4	52,3 ±0,3 h; 4	35,7 ±0,8 g; 4	25,6 ±1,6 d; 2	82,0 ±1,6 m; 4	75,2 ±1,1 3	62,2 ±1,4 i; 4	35,7 ±1,4 g; 3	29,4 ±1,5 f; 2	92,3 ±1,3 p; 3	71,4 ±1,1 k; 4	68,3 ±1,4 j; 4	32,3 ±0,7 f; 2	20,4 ±1,7 c; 1	95,0 ±1,3 q; 2	68,5 ±0,5 j; 4	52,2 ±0,2 h; 2	34,5 ±1,1 g; 2	13,3 ±0,4 b; 1	96,0 ±1,2 q; 3	87,7 ±0,4 o; 3	85,2 ±0,2 n; 3	12,5 ±0,9 b; 3	8,8 ±0,2 a; 1
CCPV	48,0 ±0,2 k; 2	32,1 ±1,6 i; 2	27,3 ±1,3 h; 2	23,8 ±0,9 g; 3	36,9 ±1,1 j; 3	37,0 ±1,6 j; 1	20,3 ±0,5 f; 1	17,2 ±1,4 d; 1	11,1 ±0,3 a; 1	24,1 ±1,6 g; 1	62,0 ±1,7 l; 1	14,9 ±1,6 c; 1	13,2 ±1,2 b; 1	12,5 ±0,8 i; 3	33,9 ±1,6 m; 1	69,0 ±0,4 d; 1	16,7 ±1,8 b; 1	13,2 ±1,2 a; 1	11,1 ±1,7 g; 2	23,3 ±1,3 n; 1	74,7 ±1,9 b; 1	12,5 ±1,3 b; 1	12,3 ±0,7 a; 2	10,0 ±1,7 k; 3	47,4 ±1,7 3
CFPV	81,0 ±0,7 4	20,0 ±1,8 1	16,8 ±2,2 f; 1	12,5 ±0,4 c; 1	34,4 ±1,2 i; 3	64,7 ±0,9 k; 3	21,7 ±1,1 f; 1	21,3 ±1,4 f; 2	20,0 ±1,3 f; 2	25,5 ±1,5 g; 1, 2	86,0 ±1,1 m; 2	32,3 ±0,9 h; 2	30,4 ±1,2 h; 2	14,3 ±1,7 d; 1	47,0 ±1,4 j; 4	100 ±0,4 n; 3	20,0 ±0,2 f; 2	15,3 ±0,2 d; 1	9,1 ±0,4 b; 1	31,4 ±1,6 h; 3	100 ±1,1 n; 4	11,1 ±0,7 b; c; 1	10,8 ±0,2 b; 1	6,7 ±0,2 a; 1	6,6 ±1,6 a; 1

CCCC: concentrado obtenido de granos crudos de *Cajanus cajan*. CFCC: concentrado obtenido de granos fermentados de *Cajanus cajan*. CCPV: concentrado obtenido de granos crudos de *Phaseolus vulgaris*. CFPV: concentrado obtenido de granos fermentados de *Phaseolus vulgaris*. **Valores en una misma columna o fila con letras o números diferentes presentaron diferencias significativas (P<0,05).

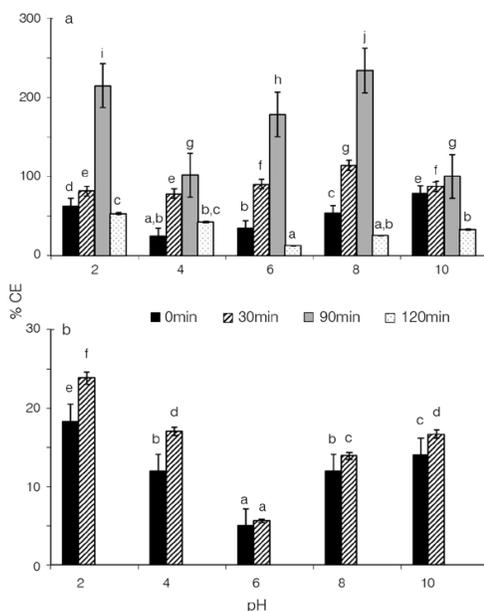


Figura 5. Capacidad espumante de concentrados de *Cajanus cajan*. a: CCCC, b: CFCC.

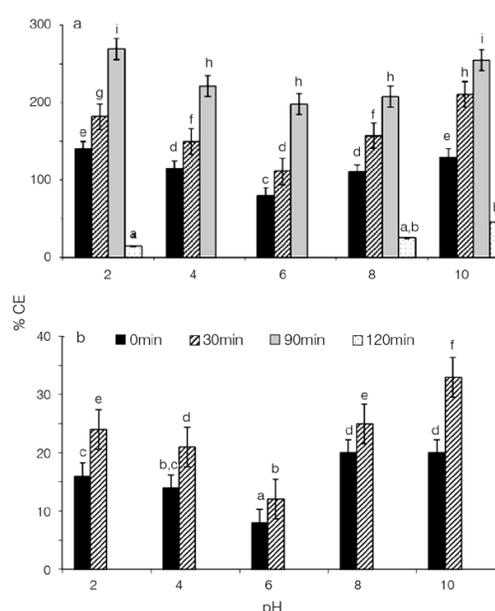


Figura 6. Capacidad espumante de concentrado de *Phaseolus vulgaris*. a: CCPV, b: CFPV.

hidrólisis con pepsina aumentó significativamente la capacidad emulsificante de CCPV y CFPV. A pH 4 luego de 120min de hidrólisis se alcanzó el 100% de la capacidad emulsificante para CCPV, mientras que los concentrados extraídos de granos de *P. vulgaris* fermentados (CFPV) a pH 4 alcanzaron el 100% de la capacidad emulsificante luego de 90min de hidrólisis.

Respecto a la estabilidad de las emulsiones de CCCC, CFCC y sus hidrolizados, en la Tabla II se observa que a

medida que aumenta el tiempo de hidrólisis con pepsina disminuye significativamente (P<0,05) la estabilidad de la emulsión. Este fenómeno podría atribuirse a la disminución de la tenacidad de la película formada en la interfase agua-grasa, consecuencia de la reducción del tamaño de la proteína.

A pH 4 luego de 90min de hidrólisis del concentrado CCCC la estabilidad de la emulsión producida fue de 43,7%, por otra parte a este

mismo pH, pero luego de hidrolizar 30min el concentrado CFCC la estabilidad de la emulsión producida fue de 75,2%.

En relación a la estabilidad de emulsión de CCPV, CFPV y sus hidrolizados, en la Tabla III se aprecia que la estabilidad de emulsión disminuye significativamente (P<0,05) a medida que aumenta el tiempo de hidrólisis con pepsina. La estabilidad de emulsión a pH 4 del CCPV luego de 120min de hidrólisis fue de 11,1%,

mientras que luego de 90min de hidrólisis del CFPV a pH 4 la estabilidad de la emulsión producida fue de 20%.

La capacidad espumante de las proteínas depende del tipo de proteína, el grado de desnaturalización, el pH, la temperatura y el método de incorporación de aire. En la Figura 5 se observa que la capacidad espumante de CCCC, que a los 90min de hidrólisis alcanza la mayor valor en el intervalo de pH estudiado. Después de este tiempo hubo una disminución de la capacidad espumante. En general, las espumas de los hidrolizados colapsan completamente luego de 10min, y se ha reportado que la proteólisis puede mejorar la capacidad espumante y reducir la estabilidad de las espumas (Chobert *et al.*, 1988).

La capacidad espumante de CFCC alcanzó su máximo valor luego de 30min de hidrólisis y después de 60min de hidrólisis no se registró capacidad espumante. Esto pudiera deberse a la desnaturalización e hidrólisis previa causada por la fermentación.

En relación a los concentrados de *P. vulgaris*, la capacidad espumante de CCPV y CFPV aumentó hasta los 90min de hidrólisis, tiempo

luego del cual no se registró formación de espuma.

Lo descrito puede atribuirse al hecho que las cadenas peptídicas con peso molecular relativo menor son incapaces de formar películas en la interfase con el aire, o bien a que la película formada en la interfase no sea lo suficientemente tenaz para mantener su integridad (Lqari *et al.*, 2005).

De los resultados obtenidos se desprende que las propiedades hidrodinámicas de emulsificación y formación de espumas en el punto isoeléctrico mejoran con la hidrólisis, lo cual es consistente con el aumento significativo de la solubilidad proteica como consecuencia de la reducción del tamaño de la cadena polipeptídica.

Conclusiones

La hidrólisis de concentrados de *Cajanus cajan* y *Phaseolus vulgaris* produce incrementos adicionales a la fermentación, en el valor nutricional y capacidad de atrapar radicales libres, así como en las capacidades espumantes y emulsificantes, con lo cual aumenta su potencial de uso como ingredientes funcionales para alimentos emulsionados o espumosos cuyo pH sea cercano a 4.

REFERENCIAS

- Adebowale KO, Lawal OS (2003) Foaming, gelation and electrophoretic characteristics of mucuna bean (*Mucuna pruriens*) protein concentrates. *Food Chem.* 83: 273-246.
- Adler-Nissen J (1979) Determination of the degree hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* 27: 1256-1262.
- Angulo-Bejarano P, Verdugo NM, Cuevas E, Milán J, Mora R, Lopez JA, Grazón JA, Reyes C (2008) Tempeh flour from chickpea (*Cicer arietinum* L.) nutritional and physicochemical properties. *Food Chem.* 106: 106-112.
- Bencini M (1986) Functional properties of drum-dried chickpea (*Cicer arietinum* L.) flours. *J. Food Sci.* 51: 1518-1526.
- Benítez R, Ibarz A, Pagan J (2008) Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquim. Clin. Latinoam.* 42: 227-232.
- Chen HM, Muramoto K, Yamachi F, Nokihara K (1996) Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2619-2623.
- Chobert JM, Sitohy MZ, Whittaker JR (1988) Solubility and emulsifying properties of caseins modified enzymatically by *Staphylococcus aureus* V8 protease. *J. Agric. Food Chem.* 36: 220-224.
- Clemente A, Bautista J, Vioque J (1999) Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Food Chem.* 67: 269-274.
- Deeslie DW, Cheryan M (1988) Functional properties of soy protein hydrolysates from a continuous ultrafiltration reactor. *J. Agric. Food Chem.* 36: 26-31.
- do Prado VC, Antunes PL, Sgarbieri VC (1980) Antinutrient occurrence and some physicochemical properties of the protein fractions of five Brazilian soybean varieties. *Arch. Latinoam. Nutr.* 30: 551-563.
- Duranti M (2006) Grain legume protein and nutraceutical properties. *Fitoterapia* 77: 67-82.
- Farnworth ER (2003) *Handbook of Fermented Functional Foods*. Functional Foods and Nutraceutical Series. CRC Press. Boca Raton, FL, EEUU. pp. 306-333.
- Granito M, Frías J, Doblado R, Guerra M, Champ M, Vidal-Valverde C (2002) Nutritional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*) by natural fermentation. *Eur. Food Res. Technol.* 214: 226-231.
- Granito M, Guinand J, Pérez D, Pérez S (2009) Valor nutricional y propiedades funcionales de *Phaseolus vulgaris* procesada: un ingrediente potencial para alimentos. *Interciencia* 34: 64-70.
- Halliwel B, Murcia MA, Chirico S, Arumoma OI (1995) Free radicals and antioxidants in food and in vivo: What they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35: 7-20.
- Hirose A, Miyashita K (1999) Inhibitory effect of proteins and their hydrolysates on the oxidation of triacylglycerols containing docosahexaenoic acids in emulsion. *J. Jap. Soc. Food Sci. Technol.* 46: 799-805.
- Hsu HW, Vavak DL, Satterlee LD, Miller GA (1977) A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J. Food Sci.* 42: 1269-1273.
- Huo GC, Fowler VR, Inbarr J, Bedford M (1993) The use of enzymes to denature antinutritive factors in soybean. En van der Poel AFB, Huisman J, Saini HS (Eds.) Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds. Proc. 2nd Int. Workshop on 'Antinutritional Factors (ANFs) in Legume Seeds'. Wageningen, Holanda. pp. 517-521.
- Kakade M, Rackis J, McGhee J, Puski G (1974) Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chem.* 51: 376-382.
- Kaur H, Perkins J (1991) The free radical-chemistry of food additives. En Auruoma OI, Halliwel B (Eds.) Free Radical and Food Additives. Taylor and Francis. London, RU. pp 17-35.
- Khalil A (2006) Nutritional improvement of an Egyptian breed of mung bean by probiotic lactobacilli. *African J. Biotechnol.* 5: 206-210.
- Kunitz M (1946) Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.* 29: 149-154.
- Lqari H, Vioque J, Pedroche J, Millán F (2002) Lupinus angustifolius protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chem.* 76: 349-356.
- Lqari H, Pedroche J, Girón-Calle J, Vioque J (2005) Production of lupinus angustifolius protein hydrolysates with improved functional properties. *Grasas y aceites* 56: 135-140.
- Megías C, Yust M, Pedroche J, Lquari H, Girón J, Alaiz M, Millán F, Vioque J (2004) Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1928-1932.
- Meisel H, FitzGerald RJ (2003) Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr. Pharm. Des.* 9: 1289-1295.
- Morr C, German B, Kinsella J, Regenstein J, Van Buren J, Kilara A, Lewis B, Mangino M (1985) A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *J. Food Sci.* 50: 1715-1718.
- Oliva ML, Sampaio MU (2009) Action of plant proteinase inhibitors on enzymes of physiopathological importance. *An. Acad. Bras. Cienc.* 81: 615-621
- Paredes-López O, Harry GI (1989) Changes in selected chemical and antinutritional components during tempeh preparation using fresh and hardened common beans. *J. Food Sci.* 54: 968-970.
- Seena S, Sridhar KR, Jung K (2005) Nutritional and antinutritional evaluation of raw and processed seeds of a wild legume, *Canavalia cathartica* of coastal sand dunes of India. *Food Chem.* 92: 465-472.
- Tabera J, Frías J, Estrella I, Villa R, Vidal-Valverde C (1995) Natural fermentation of lentil. Influence of time, concentration and temperature on protein content, trypsin inhibitor activity and phenolic compound content. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 201: 587-591.
- Torres A, Frías J, Granito M, Vidal-Valverde C (2006) Fermented pigeon pea (*Cajanus cajan*) ingredients in pastas products. *J. Agric. Food Chem.* 54: 6685-6691.
- Villanueva A, Vioque J, Sánchez-Vioque R, Clemente A, Bautista J, Millán F (1999) Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo- and exo-protease. *Grasas y Aceites* 50: 472-476.
- Wade AM, Tucker HN (1998) Antioxidant characteristics of L-histidine. *J. Nutr. Biochem.* 9: 308-315.
- Wang W, González de Mejía E (2005) A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 4: 63-78
- Yatsumatsu K, Sawada K, Moritaka M, Toda J, Wada T, Ishii K (1992) Studies on the functional properties of food grade soybean products: whipping and emulsifying properties of soybean products. *Agric. Biol. Chem.* 36: 719-727.