

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Estudios Químicos sobre las Proteínas y
contenido de Nitrógeno, Metionina, Cistina
y Lisina de variedades de Frijol (*Phaseolus*
Vulgaris) de Centro América.



Tesis presentada por

LILY DORA HASBUN BABICH

Previa opción del título de

Doctor en Química y Farmacia.

Mayo 1970

San Salvador, El Salvador, Centro América.



581.634
-344e
976
:C. Q.
1.2.



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

DR. JOSE MARIA MENDEZ

SECRETARIO GENERAL:

DR. JOSE RICARDO MARTINEZ



FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

DECANO:

DR. JULIO CESAR MORAN RAMIREZ

SECRETARIO:

DR. ELIAS ALVARADO CORNEJO

Morán / 2-VII / 70 #35525

JURADOS

PRIMER EXAMEN PRIVADO

Presidente: *Dra. Guadalupe Ventura de Calles*
Vocal: *Dra. Rosa Hernández de Díaz*
Secretario: *Dra. Blanca Lidia de León*

SEGUNDO EXAMEN PRIVADO

Presidente: *Dr. Carlos Mata Gavidia*
Vocal: *Dr. Jader Orellana Ubau*
Secretario: *Dr. Francisco Flores González*

TESIS

Presidente: *Dra. Lilia Uribe de Lecha*
Primer Vocal: *Dr. Pedro Geoffroy Luna*
Segundo Vocal: *Dr. José Mauricio Alvarez C.*

DEDICATORIA

A LA VIRGEN DE GUADALUPE

A MIS PADRES:

Teodoro J. Hasbún

Victoria B. de Hasbún

A MI ESPOSO:

Oscar L. Olivares

A MI ABUELITA:

Sara M. v. de Babich

A LA MEMORIA DE MIS ABUELOS

A MIS HERMANOS Y FAMILIARES



AGRADECIMIENTO

El presente trabajo de Tesis se llevó a feliz término en los laboratorios de la División de Ciencias Agrícolas y de Alimentos del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá.

Es mi deseo dejar constancia de mi agradecimiento al Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, por haberme permitido el desarrollo de tal investigación y en especial a la División de Ciencias Agrícolas y de Alimentos.

Quiero también hacer público mi agradecimiento al Doctor Ricardo Bressani, Jefe de dicha División, quien tuvo a su cargo la supervisión de este trabajo y me brindó constantemente su valiosa guía; a la Señora Marta Monzón de Muñoz y al Señor Carlos Urrutia, miembros de esa dependencia, por la desinteresada cooperación que me prestaron.



I N D I C E

I INTRODUCCION

II REVISION DE LITERATURA

- A. Contenido de Proteína y Otros Compuestos Nitrogenados en Semillas Leguminosas.
- B. Efecto de Variedad y Ambiente Sobre el Contenido de Proteína, Aminoácidos de las Semillas Leguminosas.
- C. Valor Nutritivo de la Proteína de las Semillas Leguminosas.
- D. Extracción y Fraccionamiento de Proteínas del Frijol.
- E. Factores Tóxicos del Frijol.

III MATERIALES Y METODOS

- A. Extracción y Fraccionamiento de las Proteínas del Frijol.
 - 1. Solubilidad del Nitrógeno en Diferentes Solventes.
 - 2. Efecto del Número de Extracciones sobre la Cantidad de Nitrógeno Extraído.
 - 3. Fraccionamiento del Nitrógeno por medio de Extracciones Combinadas de Diferentes Solventes.
 - 4. Relación entre el pH de la Solución y el Nitrógeno en Solución.
 - 5. Fraccionamiento del Nitrógeno Extraído con 0.2% NaOH.

B. Contenido de Nitrógeno, Metionina, Cistina y Lisina en Selecciones de Frijol.

IV RESULTADOS

A. Extracción del Nitrógeno del Frijol con Diferentes Solventes individuales.

- 1. Agua**
- 2. Solución al 5% KCl**
- 3. Solución acuosa al 70% de alcohol etílico**
- 4. Solución 0.2% de Hidróxido de Sodio**
- 5. Efecto de varias extracciones con el mismo solvente sobre el nitrógeno solubilizado.**

B. Extracción del Nitrógeno del Frijol con Solventes usados en Secuencia.

- 1. Agua - 5% KCl - 0.2% NaOH**
- 2. 5% KCl - 0.2% NaOH - Agua**
- 3. 0.2% NaOH - 5% KCl - Agua**

C. Efecto del pH sobre el nitrógeno en solución.

D. Fraccionamiento del nitrógeno extraído con solución 0.2% NaOH.

E. Contenido de Nitrógeno, metionina, cistina y lisina en selecciones de frijol.

V DISCUSION

VI RESUMEN

VII REFERENCIAS

INTRODUCCION

Existen muchos informes que han descrito el problema de la malnutrición, la cual prevalece en Centro América, especialmente entre los infantes y niños de edad pre-escolar, indicándose repetidas veces que la carestía de fuentes de proteína de buena calidad es un importante factor epidemiológico. En estos informes se ha indicado que en el caso de niños menores de 2 años, el consumo de frijol es relativamente bajo; sin embargo, reciben hasta 100 gr. de caldo de frijol por día.

Las semillas de las leguminosas, particularmente las del frijol (*Phaseolus vulgaris*) son una fuente muy importante de proteínas en las dietas de la población de América Latina (34, 36). Los frijoles ocupan el segundo lugar entre los alimentos más comunes e importantes de las zonas rurales y urbanas de América Central (15, 21, 22, 23) proporcionando del 20 al 30% de la proteína de la dieta, siguiéndole al maíz (22), y contribuyendo hasta con el 17% de la ingesta promedio calórica.

Estudios dietéticos en El Salvador y en Guatemala, han demostrado que la variedad más comunmente usada es la de color negro, mientras que en Honduras es de color rojo. La mayoría de las familias consumen diariamente frijoles en los tres tiempos de comida, los que preparan en forma de sopa a la que agregan algún vegetal, tal como flor u hojas de pito o quilete (*Erythrina berteroana*, Urban), ayote tierno (*Cucurbita pepo*, linn), cebolla y ajo. Se calcula que la ingesta diaria de esta leguminosa, es de 40 a 80 gramos por persona, La ingesta de frijoles tanto en el área rural como en la urbana alcanza niveles más o menos similares (22).

Asimismo las leguminosas son también de gran importancia como alimento en muchas otras partes del mundo y resulta sorprendente que aún así los estudios sobre el valor nutritivo de las variedades de *Phaseolus vulgaris* sean escasos. Sin embargo, en los últimos años se le ha dado más atención a este

producto agrícola como un alimento que puede proporcionar mayor cantidad de proteína y complementar la proteína de los cereales.

Varios investigadores han informado sobre el contenido de aminoácidos de semillas leguminosas y estos estudios así como otros de carácter biológico, han indicado con bastante claridad que la proteína total del frijol es deficiente en el aminoácido esencial metionina, su valor proteico es bajo, con índices de eficiencia proteica que varía entre 0.71 a 1.35% con una digestibilidad de aproximadamente 60%. Sin embargo, se ha demostrado que la proteína del frijol suplementa adecuadamente a la de los cereales (34) y que el agregado de metionina mejora su calidad proteica significativamente.

Las proteínas individuales de las semillas leguminosas fueron estudiadas por primera vez en 1894 por Osborne (33), quien aisló una llamada faseolina y tres conocidas como faseolina. La faseolina es una proteína soluble en sales. Las tres clases de faseolinas se caracterizan las primeras por ser solubles en solución salina, las del segundo grupo por ser insolubles en solución salina y solubles en solución alcalina y las del tercero por ser insolubles en solución salina o alcalina. Muchos otros investigadores, han realizado estudios similares ya sea con el fin de identificar las proteínas del frijol o aislar compuestos tóxicos de este grano. Sin embargo, no se conoce ningún estudio en el cual se haya tratado de conocer si existe variación en la concentración de las diferentes proteínas del frijol en diferentes variedades. Asimismo, existen pocos estudios en los cuales se haya tratado de conocer la composición de aminoácidos de cada aislado proteico y de su valor nutritivo.

Esto último se considera de mucho interés por varias razones. En primer lugar las semillas leguminosas contienen compuestos tóxicos como los inhibidores de la tripsina y las hemaglutinas que se encuentran ligadas a proteínas. Es esta la razón por la cual es necesario cocinarlas antes del consumo.

En segundo lugar, la digestibilidad de la proteína del frijol es baja, pero no se conoce cual de las proteínas es la de poca digestibilidad o si es proteína. Finalmente es de creer que no todas las proteínas del frijol son deficientes en metionina. Es pues de sumo interés práctico conocer cual de ellas es la responsable da cada uno de los tres aspectos presentados. Además de esto los frijoles contienen factores que causan gases intestinales. Aunque existen excelentes estudios al respecto, es conveniente conocer si alguna de las proteínas es responsable de este efecto. En vista del gran potencial que tienen las semillas leguminosas en aumentar la cantidad de alimentos para consumo humano y de proporcionar mayor cantidad de proteína, se consideró de interés estudiar la variación en el contenido de nitrógeno total del grano de *Phaseolus vulgaris*, así como determinar si existen selecciones con concentraciones más altas de metionina que las comunes. Obviamente, selecciones de frijol con mayor cantidad de proteína y de metionina serían un mejor suplemento a las dietas de cereales de nuestras poblaciones.

Además se realizaron varios estudios de carácter preliminar sobre la extracción y fraccionamiento de las proteínas del frijol, con el propósito de poder identificar las proteínas que contribuyen más a la proteína total de la semilla y aquellos que son deficientes en los aminoácidos azufrados, así como las proteínas resistentes a la acción enzimática del aparato digestivo dando como resultado factores de digestibilidad bajos, característica de las semillas leguminosas, en especial *Phaseolus vulgaris*.

II REVISION DE LITERATURA

A. — Contenido de Proteína y otros Compuestos Nitrogenados en Semillas de Leguminosas

Una gran porción de los diversos componentes orgánicos presentes en las semillas secas y maduras del frijol (*Phaseolus vulgaris*) consiste en substancias tales como proteínas, aminoácidos libres y amidas (34, 35). Sin embargo, la mayor parte de estos compuestos nitrogenados está formada por las proteínas, habiendo muy poca información sobre los otros compuestos nitrogenados de las semillas leguminosas (34). El contenido de nitrógeno de las especies de frijoles que crecen y se cultivan en la América Latina, ha sido informado como de 3.18% por Cravioto y colaboradores en México (17). Para los países de Centro América, varios investigadores indicaron que el frijol contiene un promedio de 3.94% de nitrógeno (2, 12, 13, 14), valores similares informados también por otros investigadores para esta leguminosa (25, 26). Otras semillas leguminosas estudiadas, como el cowpea (*Vigna sinensis*) (13, 18) y el gandul (*Cajanus cajan*) (8) contienen al igual que el frijol, cantidades similares de nitrógeno. Informes de varios investigadores de algunos países de la América del Sur, también indican que el frijol contiene alrededor de 4% de proteína (25, 26, 27).

De estos estudios se llega a la conclusión que las diferentes especies de leguminosas comestibles poseen un contenido muy similar de proteína cruda total, existiendo algunas que se desvían del rango de 18-22% de proteína.

Ciertos autores (34) han indicado que el contenido de proteína puede llegar hasta 30%. Además de la proteína, las semillas leguminosas contienen otros compuestos nitrogenados Bhagrat y Screenivasaya (6) informaron que 10 a 55% del nitrógeno total de semillas leguminosas se encontraba en una forma dializable no precipitada por sulfato de amonio. Ellos consideraron que esta fracción podría consistir de peptidos sencillos y compuestos intermedios entre los peptidos y las proteínas. Swaminathan (43) informó que el nitrógeno no proteico de semillas leguminosas varía entre 2.9 a 13.4%. Parece por consiguiente que 90% o más de los constituyentes nitrogenados en leguminosas son proteínas o derivados proteicos capaces de ser utilizados como proteínas.

B. — Efecto de Variedad y Ambiente sobre el Contenido de Proteína, Aminoácidos de las Semillas Leguminosas

Se han realizado relativamente pocos estudios referentes al

efecto del suelo y ambiente, así como de los fertilizantes, sobre el contenido de proteína del frijol. Tandon y colaboradores (44) informaron en un estudio con 25 variedades cultivadas en dos diferentes localidades en Guatemala, que la proteína varió entre 20.1 a 27.9%, siendo esta influenciada por la localidad. Efectos importantes de localidad sobre el contenido de proteína han sido informados por otros investigadores (12, 31), sin embargo, el número es limitado y no indican cual de los varios factores que forman el medio ambiental es el de más importancia. Existen algunos estudios sobre el efecto de la aplicación de fertilizantes sobre el contenido de proteína del frijol y otras semillas leguminosas similares (44).

Scharrer y Schieber (39) informaron que los niveles de diferentes fertilizantes aumentan los rendimientos y cantidad total de proteína por unidad de área, pero no tienen efecto sobre el contenido relativo de proteína cruda.

Los resultados de varios investigadores (13, 18, 29, 31, 34) indican que con toda probabilidad la especie de la leguminosa tiene más influencia sobre el contenido de proteína que la localidad y fertilizantes. Sin embargo, no puede llegarse a conclusiones definitivas ya que no existen suficientes estudios en este problema, lo cual debería de investigarse más.

Con respecto al contenido de aminoácidos, los estudios realizados por Tandon y colaboradores (44) demostraron que el contenido de triptofano variaba significativamente entre 25 variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*) la cual era debido a la composición genética y localidad. También indicaron que la fertilidad del suelo alteraba significativamente el rendimiento pero no el contenido de nitrógeno o de los aminoácidos metionina, lisina y triptofano. En un estudio reciente Kakade y Evans (29) no reportaron diferencias mayores en contenido de aminoácidos de 5 variedades de frijol.

Como en el caso de proteína total, se ha informado mayor variación en el contenido de aminoácidos entre especies de leguminosas que entre variedades de la misma especie. Esta variación ha sido encontrada para la mayor parte de los aminoácidos con la posible excepción de metionina (13, 18, 29, 31). Otros investigadores (39, 44) han indicado que la localidad afecta más el contenido de aminoácidos que la variedad, el año o el tiempo de siembra.

C.—Valor Nutritivo de la Proteína de las Semillas Leguminosas

Un número relativamente grande de semillas leguminosas

han sido analizadas por su contenido de aminoácidos (34). Las características principales de las proteínas de las semillas leguminosas es que son muy deficientes en el aminoácido metionina y luego en triptofano (3, 25, 34, 40). En ciertas semillas leguminosas, aparentemente el triptofano es el más limitante (8). Sin embargo, todas las semillas de esta naturaleza son marcadamente deficientes en metionina (34).

El coeficiente de digestibilidad de la proteína de las leguminosas varía ampliamente, entre valores de 51 hasta cifras de 92% (27, 34). También se ha informado sobre variaciones grandes entre muestras de la misma variedad o especie (34). Asimismo, se ha indicado que ni la cocción ni cualquier otro tratamiento con calor, por ejemplo, cocción bajo presión, no mejoran el coeficiente de digestibilidad de la proteína de las leguminosas (11, 34).

Grandes variaciones también se han informado sobre el valor biológico de la proteína de semillas leguminosas (34) habiendo valores tan bajos como 32% hasta valores relativamente altos de 78%. Como en el caso del coeficiente de digestibilidad, varios autores han informado diferentes valores biológicos para la misma variedad de frijol (27, 34), a pesar de que la ingesta de proteína bajo la cual el valor biológico se ha determinado ha variado entre 9 a 12% en la dieta. Basu y colaboradores (4, 5) han estudiado el valor biológico de una semilla leguminosa a niveles de proteína de 5, 10 y 15% y reportaron una disminución conforme el nivel proteico de la dieta aumentaba.

Esto sin embargo, no significa mayor cosa, ya que es común encontrar que a mayor nivel de proteína en la dieta es menor el valor biológico de la misma.

El índice de eficiencia proteica, otro modo de representar el valor biológico, es en general sumamente bajo en comparación con la proteína de la leche de vaca o de huevo entero (34). En algunos informes se ha indicado que algunas leguminosas son incapaces de producir crecimiento en ratas jóvenes, por ejemplo, la semilla *Lablab niger* y algunas de *Phaseolus vulgaris* (6, 43).

Varios investigadores han estudiado el efecto de procesamiento sobre el valor nutritivo de la proteína del frijol. Los resultados de estos estudios han indicado que este tratamiento tiene un pequeño efecto en aumentar el valor proteico y el crecimiento de los animales, no por haberse aumentado el valor biológico si no más bien porque el calor destruye los inhibidores de tripsina, presentes en la mayor parte de las semillas legu-

minosas (7, 8, 11, 32, 37, 40). El uso de cocción con presión ha resultado en mejoras en el valor nutritivo de la proteína y varios investigadores han informado que el tiempo óptimo de cocción a 15 libras de presión varía entre 10 a 25 minutos. Al prolongarse la cocción puede destruirse el valor nutritivo a causa de pérdidas en ciertos aminoácidos (11, 29a).

Ya que la metionina es el aminoácido limitante en la proteína del frijol, muchos trabajos indican que la adición de ese aminoácido se traduce en un aumento significativo en el valor proteico (34). Jaffé (25, 26) indicó que en tres muestras de *Phaseolus vulgaris* y en otras 10 leguminosas, el aminoácido esencial que limitaba el crecimiento en ratas jóvenes fue la metionina. La adición de este aminoácido produjo un aumento en el valor biológico pero no en el coeficiente de digestibilidad de la proteína. Por lo general, las cantidades de metionina agregada han variado de 0.1 a 0.6% (11, 25, 40) y en todos los casos la respuesta ha sido en un mejoramiento del índice de eficiencia proteica y valor biológico. En unos trabajos realizados por Braham y colaboradores (8) el triptofano mejoró el índice de eficiencia proteica del gandul, pero la adición de metionina con triptofano resultó mejor aún en términos del valor nutritivo de la proteína de esa semilla leguminosa.

Debido a que la proteína de las semillas leguminosas contiene cantidades relativamente altas de lisina (34), aminoácido que se encuentra en deficiencia en los cereales, ya que estos contienen más metionina que las leguminosas, existe una complementación entre las proteínas de estos dos alimentos, que da una proteína de mejor valor nutritivo. Varios investigadores han demostrado por ejemplo, que mezclas de proteína de cereal y de proteína de leguminosa en la relación 7:3, tienen un valor proteico superior que las proteínas individuales (34). En otros trabajos se ha encontrado que la combinación mejor bajo el punto de vista de calidad proteica, entre maíz y frijol, es de 72 g. de maíz y 28 de frijol (10) y entre arroz y frijol, cuando el arroz aporta 60% y el frijol el 40% de la proteína de la dieta (9).

D. — Extracción y Fraccionamiento de Proteínas del Frijol

Ritthausen (38) y Osborne (33) emplearon soluciones de cloruro de sodio para extraer las proteínas de frijoles secos, y parte de la proteína extraída fué precipitada por diluciones o por medio de saturación de la solución con proteína con sulfato de amonio. Según Osborne (33), 8.5% de la proteína del frijol es albúmina y 63% es globulina. Más tarde Waterman, Johns y Jones (45), separaron las proteínas extraídas con cloruro de

sodio por medio de la precipitación fraccionada con sulfato de amonio en tres proteínas que denominaron faseolina, faseolina y confaseolina. Otros investigadores, como Smith, Earle y Wolff (4) y Powrie (35) han realizado estudios no muy extensos sobre las características de solubilidad de las proteínas de frijoles secos. Relativamente hace poco, Evans y Kerr (20) informaron sobre la extracción y la precipitación de varios constituyentes nitrogenados de frijoles secos. Estos autores informaron que el uso de HCl a pH 1.5 extrajo la mayor cantidad de nitrógeno, así como la extracción con hidróxido de sodio a un pH mayor de 7.0 y solución de cloruro de sodio en concentración de 1 al 8%. Soluciones con un pH de 3.8 extrajeron las menores cantidades de proteína. Las proteínas extraídas con una solución al 2% de cloruro de sodio y precipitadas por medio de diálisis contenían 14.63% de nitrógeno. Esta proteína puesta en columnas de DEAE celulosa se separó en cuatro componentes.

Powrie (35) informó sobre la extracción de los compuestos nitrogenados del frijol con varios solventes. Indicó que con 4 extracciones sucesivas con 70% EIOH o con 70% EIOH con acetato de sodio pudo extraer 10.40 y 11.47% del nitrógeno del frijol. Por el contrario, con tres extracciones sucesivas con solución de cloruro de sodio, alrededor del 74% del nitrógeno total fue extraído. El autor también informó que solventes alcalinos permiten la extracción óptima de constituyentes nitrogenados.

E. — Factores Tóxicos del Frijol

Recientemente, Liener (32) publicó una revisión sobre los factores tóxicos presentes en semillas leguminosas comestibles y manera como estos factores pueden ser eliminados. Entre éstos, el mejor sistema ha sido por medio de la cocción.

El efecto de la cocción a presión por varios períodos sobre el valor nutritivo de la proteína de los frijoles negros (*Phaseolus vulgaris*) fue estudiada por análisis químicos y métodos microbiológicos en los cambios en metionina y contenido de lisina y valina, también por la determinación de grupos libres de E-amino lisina y estudios biológicos en ratas.

El resultado indica que la cocción por 10 a 30 minutos y a 15 libras de presión fue óptimo. La cocción en olla abierta por 4 horas fue encontrada buena como la cocción a presión por un período de 10 a 30 minutos. Las concentraciones de lisina metionina y valina no cambian por la cocción. Por otro lado el contenido de grupos libres de E-amino lisina disminuyen cuando aumenta el tiempo de cocción.

Chattopadhyay y Banerje (16) encontraron que aun la germinación no influenció la cantidad de inhibidor de tripsina en 5 legumbres examinadas por ellos; hubo una mejora en el valor biológico de las tres legumbres alrededor del 10 al 20% pero no tiene efecto en las otras dos. Se cree que el inhibidor de la tripsina en las legumbres no influye en el valor nutritivo de los alimentos (34).

Los frijoles autoclaveados por 15 minutos a 121° C fueron más completamente digestibles, mientras que los autoclaveados por 4 horas fueron pobremente digestibles debido a la destrucción de ciertos aminoácidos, por lo tanto baja el valor biológico y la digestibilidad. El tratamiento de calor no mejora la digestibilidad de los frijoles con pepsina. Lo que indica que el efecto beneficioso del calor en los frijoles puede ser debido a la destrucción de los inhibidores de la tripsina y el efecto adverso de un calentamiento prolongado a la reacción de grupos libres amino con carbohidratos u otras sustancias para formar uniones resistentes a la hidrólisis enzimática.

Ciertos aminoácidos nombrados isoleucina, leucina, treonina, triptofano y valina aumentaron después de autoclavar los frijoles por 5 minutos. Mientras que la arginina, lisina y metionina, disminuyeron después de autoclavar por 4 horas. El coeficiente de digestibilidad de las proteínas de las legumbres varía en gran parte, oscilando los valores entre 51 a 92% (34).

III MATERIALES Y METODOS

A. — Extracción y Fraccionamiento de las Proteínas del Frijol

Para llevar a cabo los experimentos en esta parte del trabajo de tesis, se utilizó la variedad de frijol negro conocida con el nombre de S19N desarrollada en Turrialba por la IICA. Este frijol fué cultivado en noviembre de 1966, en la Finca Experimental San Antonio Pachalí del INCAP, situada a una altura de 5000 pies sobre el nivel del mar. El frijol S19N contiene 3.60% de nitrógeno.

1. — Solubilidad del Nitrógeno en Diferentes Solventes

Para estos estudios se utilizaron muestras de 5.00 g. de frijol previamente molido finamente (60 mesh) las cuales fueron extraídas por una hora con 10, 15, 20, 25, 30, 40 y 50 ml. de agua. Después de la extracción por medio de agitación, cada muestra fué centrifugada por 15-20 minutos a 3500 rpm, recolectando el residuo y el extracto. El residuo fué deshidratado por medio de calor y luego pesado y el volumen del extracto medido. Luego se analizaron por su contenido de nitrógeno.

Cada extracción y sus respectivos análisis fueron hechos en duplicado. El mismo procedimiento fué utilizado para conocer la solubilidad del nitrógeno del frijol en 70% alcohol Etilico, 5% KCl y 2% NaOH.

2. — Efecto del Número de Extracciones Sobre la Cantidad de Nitrógeno Extraído

El método aquí empleado consistió en extraer 5.00 g. de frijol molido cuatro veces con 25 cc. de solución al 2% de hidróxido de sodio como se indicó previamente. Otra muestra fué extraída cuatro veces con 30 cc. de una solución al 5% de KCl y la otra muestra diferente con 20 cc. de agua. De esta manera se obtuvieron cuatro extractos y un residuo, los cuales fueron analizados por su contenido de nitrógeno individualmente.

3. — Fraccionamiento del Nitrógeno por Medio de Extracciones Combinadas de Diferentes Solventes

Para estos experimentos se tomaron en duplicado muestras de 5 g. de frijol molido a 60 mallas y fueron puestos en frascos de centrífuga de 200 cc. de capacidad. El material fué luego extraído con agua, cloruro de potasio e hidróxido de sodio, en tres diferentes secuencias, usando el residuo de la extracción previa para la extracción siguiente. La extracción y manejo del extracto y residuos fueron iguales a los ya descritos. Las tres secuencias fueron las siguientes: primero: agua, cloruro de potasio e hidróxido de sodio; segundo: cloruro de potasio, hidróxido de sodio y agua; y tercero: hidróxido de sodio, agua y cloruro de potasio.

Las cantidades de solvente utilizados fueron los que en el estudio anterior dieron las mejores extracciones. El volumen de cada extracción fué medido y el residuo final deshidratado para ser analizado por su contenido de nitrógeno.

4. — Relación entre el pH de la Solución y el Nitrógeno en Solución

Para esta parte del estudio se emplearon en duplicado 20 g. de frijol molido, el cual fué extraído 5 veces por una hora cada vez con 80 cc. de 0.2% NaOH. Los extractos se reunieron y el volumen total fué medido. El residuo se deshidrató y analizó por su contenido de nitrógeno.

Del volumen total colectado se tomaron 10 alícuotas de 25 cc. cada una y se ajustó el pH a 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 y 2. El material fué luego centrifugado y el sobrenadante medido

y analizado por su contenido de nitrógeno. De esta manera se pudo medir el pH en el cual la solubilidad de la proteína era la mínima.

5.—Fraccionamiento del Nitrógeno Extraído con 0.2% NaOH

En esta parte del trabajo se usaron 20 g. de frijol negro molido a 60 mesh y se extrajo tres veces por una hora con 80 cc. de 0.2% NaOH cada vez. Se recolectaron los extractos y se les determinó el nitrógeno. El extracto fué luego ajustado a pH 4 con el potenciómetro de Beckman usando una solución 6N de HCl. El precipitado se separó del sobrenadante por centrifugación y luego fué lavado con agua a pH 4. El sobrenadante y los lavados fueron unidos y analizados por su contenido de nitrógeno. Esta fracción se le llamó soluble en ácido. El precipitado fué luego lavado dos veces con 30 cc. de agua destilada. Se recolectaron los extractos y fueron analizados por su contenido de nitrógeno. Este material se le llamó nitrógeno soluble en agua. El residuo fué luego tratado dos veces con 30 cc. de una solución al 5% de KCl cada vez. El extracto fué llamado nitrógeno soluble en sales y el residuo nitrógeno soluble en solución alcalina. Un esquema de este método se presenta en la Figura No. 1.

B.—Contenido de Nitrógeno, Metionina, Cistina y de Lisina en Selecciones de Frijol

Para determinar la distribución de nitrógeno en selecciones de frijol se obtuvieron 268 muestras de distintos colores y de diferente procedencia, Guatemala, Honduras y Nicaragua. El nitrógeno fué analizado por el método Kjeldahl (1). De estas variedades, 127 fueron analizadas por su contenido de metionina, cistina y lisina usando métodos microbiológicos con el *Leuconostoc misenteroides* P-60 y medios Difco (42).

IV. RESULTADOS

A.—Extracción del Nitrógeno del Frijol con Diferentes Solventes Individuales

1.—Agua

El Cuadro No. 1 resume los resultados de los estudios en los cuales se determinó la cantidad de nitrógeno extraída con agua como único solvente. Los resultados indican que cantidades similares de nitrógeno fueron extraídas con 10 a 30 cc. de agua. En un segundo estudio se probó hasta con 50 cc. de agua para

5 g. de frijol, sin embargo, no hubo ningún aumento en extracción, más bien los valores fueron menores. En vista de esto, se decidió usar para extracciones posteriores 20 cc. de agua para 5.0 g. de frijol.

2. — Solución al 5% KCl

Los resultados se presentan en el Cuadro No. 2. Con este solvente se pudo extraer hasta el 58% de nitrógeno usando 40 cc. para 5.0 g. de frijol. Sin embargo, una mayor cantidad del solvente extrajo una cantidad similar a la indicada y los porcentajes extraídos con 30 y 25 cc. para 5 g. de frijol fueron ligeramente inferiores. Para los propósitos de experimentos posteriores se escogió como el nivel más conveniente, el volumen de 30 cc. de solución al 5% de KCl.

3. — Solución Acuosa al 70% de Alcohol Etilico

El Cuadro No. 3 presenta los resultados con este solvente. En este caso la mayor cantidad extraída fué de 10% con 40 cc. de solvente para 5 g. de frijol. Ya que las cantidades extraídas fueron muy pequeñas se decidió no utilizar este solvente en estudios de fraccionamiento realizados posteriormente.

4. — Solución 0.2% de Hidróxido de Sodio

Los resultados de esta parte del estudio se presentan en el Cuadro No. 4. Se puede notar que 25 a 50 cc. de solvente para 5.0 g. de frijol extrajeron de 72.5 a 73.0% del nitrógeno. Cantidades menores de solvente resultaron en menores extracciones, siendo la más baja cuando se utilizó 10 cc. para 5.0 g. de frijol. La cantidad más favorable de solución de hidróxido de sodio al 0.2% es posiblemente 25 cc. para 5.0 g. de frijol.

5. — Efecto de varias Extracciones con el mismo Solvente Sobre el Nitrógeno Solubilizado

El Cuadro No. 5 resume los resultados de este experimento. Es interesante notar que el mejor solvente es la solución de 0.2% de hidróxido de sodio, luego la solución salina al 5% de KCl y por último el agua, que en este caso dió extracciones menores que las obtenidas en estudios anteriores. También es de interés, que la cantidad de nitrógeno extraído disminuye ya desde la segunda extracción con el mismo solvente, siendo sumamente pequeña con la cuarta extracción. El nitrógeno no extraído fué mayor en el caso del agua y menor con el uso de 0.2% NaOH.

B. — Extracción del Nitrógeno del Frijol con Solventes Usados en Secuencia

1. — Agua - 5% KCl - 0.2% NaOH

El Cuadro No. 6 resume los datos recabados en estos experimentos. Puede notarse que el agua extrajo 39.6% del nitrógeno, el cloruro de potasio el 30% y el hidróxido de sodio alrededor del 10%, habiendo 14% aproximadamente que no fué extraído. La cantidad de nitrógeno extraída con agua fué similar a la obtenida en la segunda serie de extracciones con agua presentados en el Cuadro No. 1. Sin embargo, las soluciones de 5% KCl y 0.2% NaOH extrajeron cantidades menores que cuando estos solventes se emplearon individualmente.

2. — 5% KCl - 0.2% NaOH - Agua

El Cuadro No. 7 resume los resultados de este experimento. En este estudio, la solución al 5% de KCl extrajo 58.5% del nitrógeno del frijol, mientras que el hidróxido de sodio extrajo aproximadamente el 11% y el agua solamente el 3%. Como en el estudio anterior 14% del nitrógeno no fué extraído. El cloruro de potasio en este estudio extrajo cantidades similares de nitrógeno que cuando fué utilizado sólo como solvente según datos del Cuadro No. 2.

3. — 0.2% NaOH - 5% KCl - Agua

En el Cuadro No. 8 se presentan los datos obtenidos en este experimento. El uso del hidróxido de sodio extrajo alrededor del 60% del nitrógeno, cifra un poco inferior a la obtenida en estudios previos. El cloruro de potasio extrajo 9% y el agua 3% del nitrógeno total del frijol. Como en los dos casos anteriores 14% del nitrógeno no fué solubilizado.

C. — Efecto del pH Sobre el Nitrógeno en Solución

El Cuadro No. 9 muestra los valores de dos determinaciones así como el promedio de ellas, el cual también se muestra en la gráfica No. 2. Estas presentan los datos sobre el punto isoeléctrico de las proteínas del frijol extraídas con la solución 0.2% de hidróxido de sodio. Se puede notar muy pequeños cambios entre el pH alcalino de 11.40 y el ácido de 6.0, sin embargo al reducir el pH a 5.0 y a 4.0 se produjo una precipitación casi completa del nitrógeno en forma de proteína para luego aumentar ligeramente en pH menos de 4.0.

D. — Fraccionamiento del Nitrógeno Extraído con Solución 0.2% NaOH

El Cuadro No. 10 presenta los resultados de dos estudios en los cuales se trató de hacer uso de los datos obtenidos en los experimentos anteriores con el fin de poder fraccionar las proteínas del frijol extraídas con solución al 0.2% de hidróxido de sodio. A pesar de que existen diferencias entre los dos experimentos, se puede indicar que las fracciones principales fueron la soluble en álcali, luego la soluble en ácido, la soluble en sal y por último una pequeña fracción soluble en agua. De 20 g. de frijol se obtuvo 3.0 g. de proteína con un contenido de nitrógeno de aproximadamente 10%, indicando todavía la presencia de impurezas. En estos estudios las recuperaciones de nitrógeno fueron muy inferiores a las obtenidas en estudios previos.

E. — Contenido de Nitrógeno, Metionina, Cistina y Lisina en Selecciones de Frijol

El Cuadro No. 11 presenta los datos sobre el contenido de nitrógeno en 268 selecciones de frijol. El promedio entre todas las muestras fué de 3.40%, con un valor máximo de 4.52 y un valor mínimo de 2.69%. El Cuadro No. 13 muestra la distribución del contenido de nitrógeno en las 268 muestras, en donde se puede notar que 54 muestras contenían 3.34% de nitrógeno y 131 muestras mostraron un contenido superior de nitrógeno.

El Cuadro No. 12 resume el contenido de metionina, cistina y lisina en 129 muestras de las 268 que fueron analizadas por el contenido de nitrógeno. El promedio de metionina fué de 0.183 g/100 g. mientras que el de cistina de 0.133%. El valor máximo de metionina fué de 0.355 con sólo una muestra, y el mínimo de 0.087%. En el caso de cistina, el valor máximo y mínimo fué de 0.208 y 0.075% respectivamente. En cuanto a lisina, el valor máximo fué de 2.39 y el mínimo de 0.80% con un promedio de 1.51%.

El Cuadro No. 13 muestra la distribución de los tres aminoácidos estudiados. Como se puede notar, el contenido de metionina presenta una distribución más amplia que la de cistina y la de lisina, habiendo aparentemente menos variación en estos dos aminoácidos.

FIGURA No. 1

ESQUEMA DE LA EXTRACCION Y FRACCIONAMIENTO
DE LA PROTEINA DEL FRIJOL

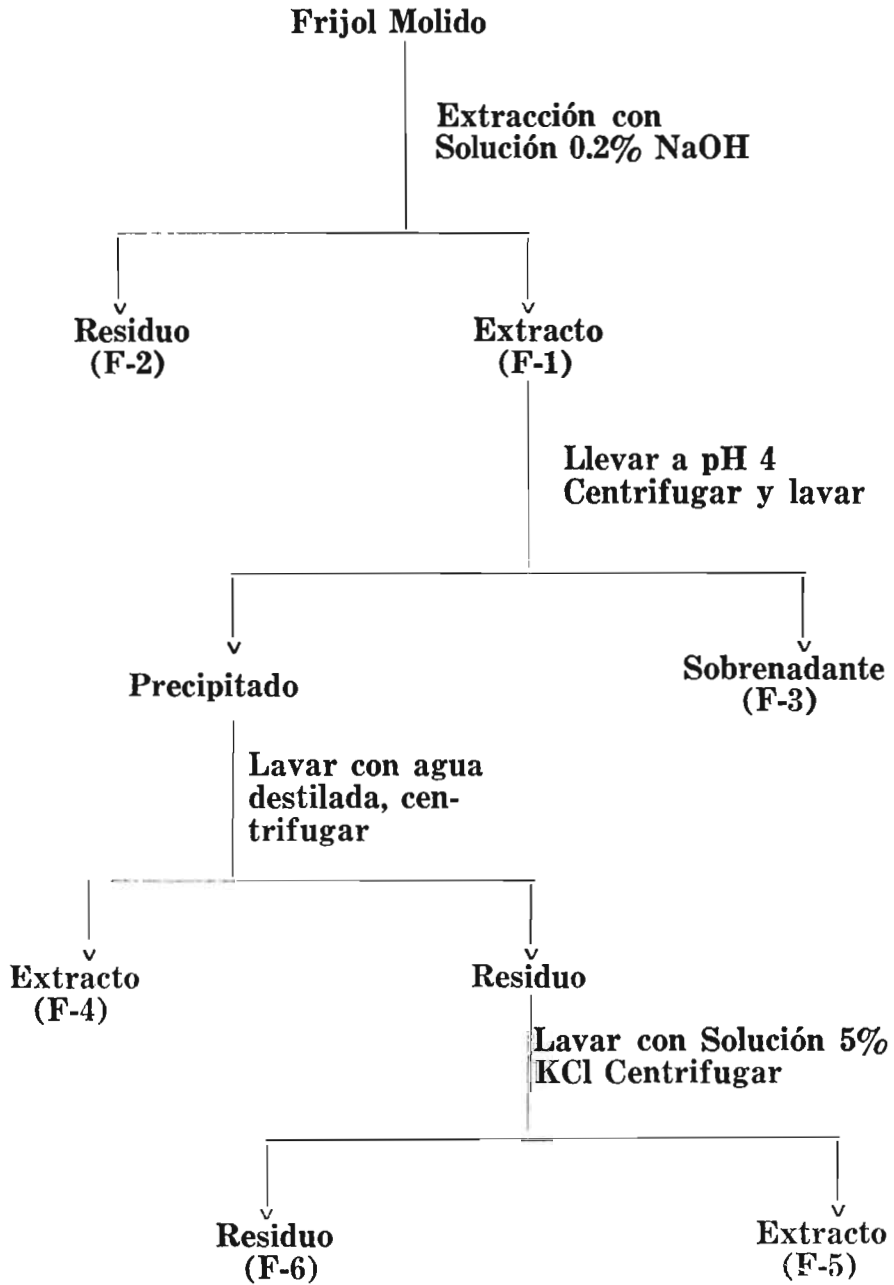
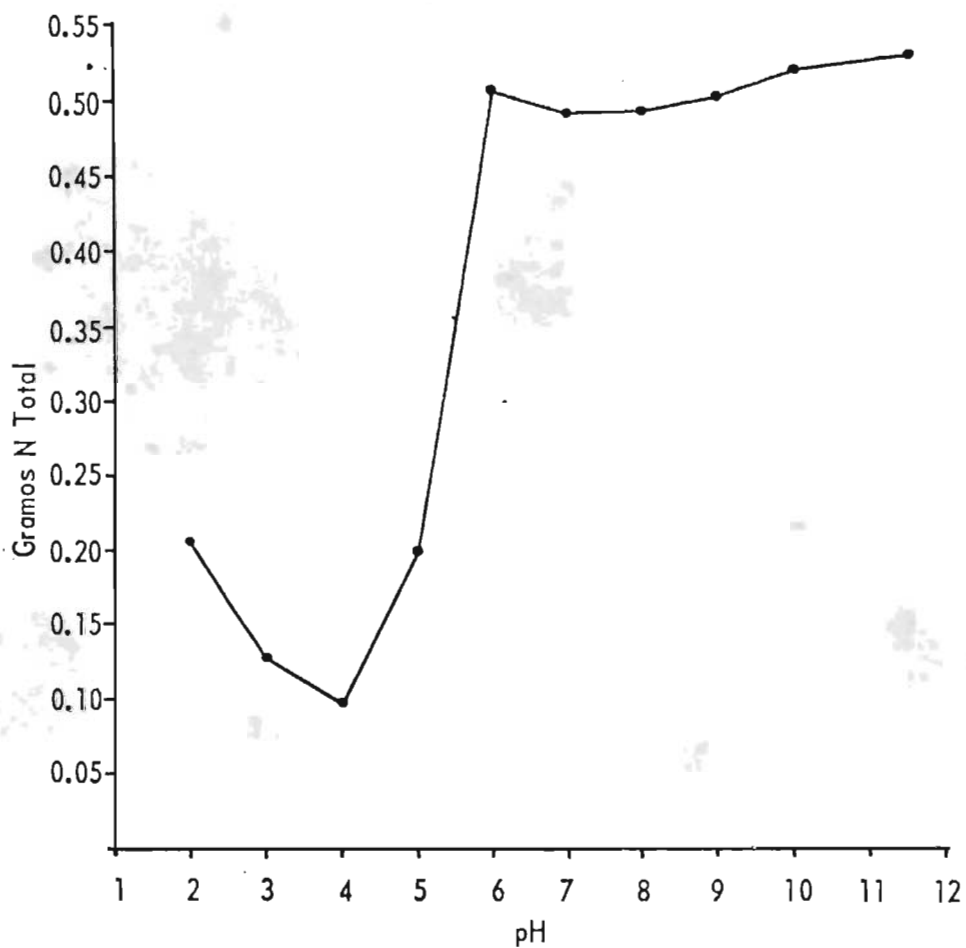
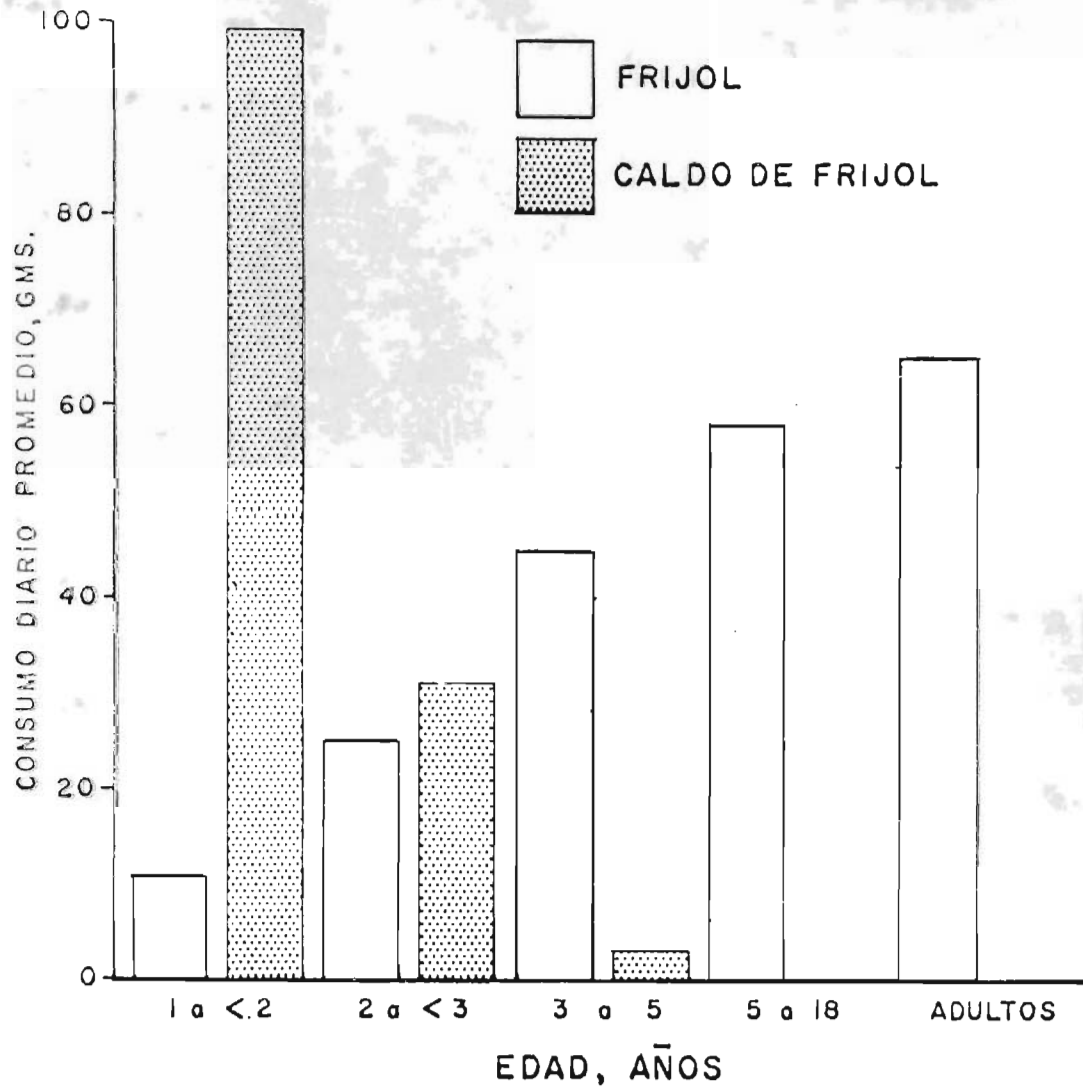


Figura No. 2

EFECTO DEL pH SOBRE LA SOLUBILIDAD DE LA
PROTEINA EXTRAIDA DEL FRIJOL

Incap 68-595

FIG.3 CONSUMO DE FRIJOL Y CALDO DE FRIJOL POR EDAD. GUATEMALA



C U A D R O No. 1

**EXTRACCION DEL NITROGENO DEL
FRIJOL CON AGUA¹**

Extracción No.	Ml. de Solvente (Agua)	Nitrógeno en Extracto(2) g.	Nitrógeno en Residuo g.	Nitrógeno Extraído %	Nitrógeno Extraído + Residuo g.	Recuperación %
1	10	0.092	0.073	50.9	0.165	91.7
2	15	0.093	0.092	51.6	0.185	102.3
3	20	0.087	0.105	48.1	0.192	106.7
4	25	0.104	0.094	57.6	0.198	110.0
5	30	0.107	0.087	59.7	0.194	107.8
<hr/>						
1	30	0.074	0.109	41.1	0.183	101.7
2	40	0.079	0.132	43.9	0.211	117.2
3	50	0.077	0.106	42.8	0.183	101.7

(1) Gramos de frijol extraído: 5.00; equivalente a 0.180 g. de Nitrógeno.

(2) Cada extracción se realizó en duplicado.

C U A D R O No. 2

**EXTRACCION DEL NITROGENO DEL FRIJOL CON
SOLUCION AL 5% KCl⁽¹⁾**

Extracción No.	Ml. de Solvente (2% KCl)	Nitrógeno en Extracto(2) g.	Nitrógeno en Residuo g.	Nitrógeno Extraído %	Nitrógeno Extraído + Residuo g.	Recuperación %
1	10	0.053	0.108	29.4	0.161	89.4
2	15	0.072	0.095	40.0	0.167	92.8
3	20	0.088	0.079	48.9	0.167	92.8
4	25	0.094	0.086	52.2	0.180	100.0
5	30	0.095	0.088	52.8	0.183	101.7
6	40	0.105	0.077	58.3	0.182	101.1
7	50	0.103	0.075	57.2	0.178	98.9

(1) Gramos de frijol extraído: 5.00; equivalente a 0.180 g. de Nitrógeno.

(2) Cada extracción se realizó en duplicado.

C U A D R O No. 3

**EXTRACCION DEL NITROGENO DEL FRIJOL
CON 70% ALCOHOL ETILICO⁽¹⁾**

Extracción No.	Ml. de Solvente (70% ETOH)	Nitrógeno en Extracto(2) g.	Nitrógeno en Residuo g.	Nitrógeno Extraído %	Nitrógeno Extracto + Residuo g.	Recuperación %
1	10	0.006	0.169	3.3	0.175	97.2
2	15	0.009	0.164	5.0	0.173	96.1
3	20	0.009	0.163	5.0	0.172	95.5
4	25	0.014	0.159	7.8	0.173	96.1
5	30	0.014	0.164	7.8	0.178	98.9
6	40	0.018	0.158	10.0	0.176	97.8
7	50	0.017	0.166	9.4	0.183	101.7

(1) Gramos de frijol extraído: 5.00; equivalente a 0.180 g. de Nitrógeno.

(2) Cada extracción se realizó en duplicado.

C U A D R O No. 4

**EXTRACCION DEL NITROGENO DEL FRIJOL CON
SOLUCION 0.2% DE NaOH⁽¹⁾**

Extracción No.	Ml. de Solvente 0.2% NaOH	Nitrógeno en Extracto(2) g.	Nitrógeno en Residuo g.	Nitrógeno Extraído %	Nitrógeno Extracto + Residuo, g.	Recuperación %
1	10	0.051	0.122	28.3	0.173	96.1
2	15	0.109	0.062	60.5	0.171	95.0
3	20	0.116	0.059	64.4	0.175	97.2
4	25	0.130	0.047	72.2	0.177	98.3
5	30	0.131	0.042	72.8	0.173	96.1
6	40	0.125	0.044	69.4	0.169	93.9
7	50	0.136	0.033	75.5	0.169	93.9

(1) Gramos de frijol extraído: 5.00; equivalente a 0.180 g. de Nitrógeno.

(2) Cada extracción se realizó en duplicado.

C U A D R O No. 5

EFECTO DEL NUMERO DE EXTRACCIONES CON EL MISMO SOLVENTE SOBRE LA CANTIDAD TOTAL DE NITROGENO EXTRAIDO⁽¹⁾

Extracción No.	Solvente usado	Volumen solvente ml.	Nitrógeno	
			extraído g.	Nitrógeno extraído %
1	0.2% NaOH	25	0.109	61.0
2	0.2% NaOH	25	0.020	10.9
3	0.2% NaOH	25	0.005	3.0
4	0.2% NaOH	25	0.006	3.2
Nitrógeno Total Extraído, g.			0.140	—
Nitrógeno total Extraído, %			—	77.7
Nitrógeno en Residuo, g.			0.022	—
Nitrógeno total Recuperado, g.			0.162	—
Nitrógeno total Recuperado, %			—	90.0
<hr/>				
1	5% KCl	30	0.101	56.1
2	5% KCl	30	0.019	10.5
3	5% KCl	30	0.004	2.2
4	5% KCl	30	0.003	1.5
Nitrógeno total Extraído, g.			0.127	—
Nitrógeno total Extraído, %			—	70.5
Nitrógeno en Residuo, g.			0.052	—
Nitrógeno total Recuperado, g.			0.179	—
Nitrógeno total Recuperado, %			—	99.4
<hr/>				
1	Agua	20	0.044	24.4
2	Agua	20	0.028	15.5
3	Agua	20	0.008	4.3
4	Agua	20	0.005	3.0
Nitrógeno total Extraído, g.			0.085	—
Nitrógeno total Extraído, %			—	47.2
Nitrógeno en residuo, g.			0.061	—
Nitrógeno total Recuperado, g.			0.146	—
Nitrógeno total Recuperado, %			—	81.1

(1) Gramos de frijol extraído: 5.00 g; equivalente a 0.180 g. de Nitrógeno.

C U A D R O No. 6

EXTRACCION DEL NITROGENO DEL FRIJOL USANDO
AGUA, 5% KCl y 0.2% NaOH⁽¹⁾

Solvente usado	Ml. de Solvente	Nitrógeno en extracto, g. (2)	Nitrógeno Extraído %
Agua	20	0.071	39.4
5% KCl	30	0.054	30.0
0.2% NaOH	25	0.018	10.0
TOTAL	—	0.143	79.4
Nitrógeno en residuo	—	0.025	13.9
TOTAL	—	0.168	93.3

(1) Gramos de frijol extraído = 5.00; Equivalente a 0.180 g. de Nitrógeno.

(2) Las cifras representan el promedio de 3 experimentos.

C U A D R O No. 7

EXTRACCION DEL NITROGENO DEL FRIJOL USANDO
5% KCl, 0.2% NaOH y AGUA⁽¹⁾

Solvente usado	Ml. de Solvente	Nitrógeno en extracto, g. (2)	Nitrógeno Extraído %
5% KCl	30	0.106	58.9
0.2% NaOH	25	0.020	11.1
H ₂ O	20	0.007	3.9
TOTAL	—	0.133	73.9
Nitrógeno en residuo	—	0.025	13.9
TOTAL	—	0.158	87.8

(1) Gramos de frijol extraído: 5.00; equivalente a 0.180 g. de Nitrógeno.

(2) Las cifras representan el promedio de 3 determinaciones.

C U A D R O No. 8

EXTRACCION DEL NITROGENO DEL FRIJOL USANDO
0.2% NaOH, 5% KCl y AGUA

Solvente Usado	Ml. de Solvente	Nitrógeno en extracto g.	Nitrógeno extraído %
0.2% NaOH	25	0.108	60.0
5% KCl	30	0.005	2.8
Agua	20	0.015	8.3
TOTAL	—	0.128	71.1
Nitrógeno en residuo	—	0.027	15.0
TOTAL	—	0.155	86.1

(1) Gramos de frijol extraído: 5.00; equivalente a 0.180 g. de Nitrógeno.

(2) Las cifras representan el promedio de 3 determinaciones.

C U A D R O No. 9

EFFECTO DEL pH SOBRE LA SOLUBILIDAD DE LAS
PROTEINAS EXTRAIDAS DEL FRIJOL

pH	Determinación No.		Promedio
	1	2	
	g. N total ⁽¹⁾		
11.3	0.530	0.530	0.530
10.0	0.536	0.499	0.517
9.0	0.525	0.484	0.504
8.0	0.515	0.473	0.494
7.0	0.540	0.447	0.493
6.0	0.494	0.520	0.507
5.0	0.176	0.224	0.200
4.0	0.104	0.094	0.099
3.0	0.130	0.124	0.127
2.0	0.177	0.233	0.205

(1) En el extracto original.

C U A D R O No. 10

**FRACCIONAMIENTO DE LA PROTEINA DEL FRIJOL
EXTRAIDA CON HIDROXIDO DE SODIO**

	Prueba No. 1	Prueba No. 2	Promedio
Nitrógeno Total en 20 g. de Frijol	0.721	0.721	0.721
Nitrógeno Total Extraído (F1)	0.540	0.591	0.565
Nitrógeno en Residuo (F2)	0.144	0.108	0.126
Porcentaje de Extracción	74.9	82.0	78.4
Porcentaje en Residuo	20.0	15.0	17.5
Nitrógeno soluble después de llevar Soln. a pH4 (N Sol. en ácido) (F3)	0.125	0.112	0.118
Lavados del precipitado con agua destilada (N sol. en agua) (F4)	0.013	0.018	0.015
Lavados del precipitado con Sol. 5% KCl (N sol. en sales) (F5)	0.024	0.095	0.059
Residuo, Peso seco, g.	3.08	3.04	3.06
Residuo, % Nitrógeno	10.80	9.37	10.08
Residuo, Nitrógeno total (F6) Nitrógeno soluble en álcali	0.337	0.284	0.310
Nitrógeno total de Fracciones F3+F4+F5+F6	0.499	0.509	0.504
Nitrógeno recuperado del extraído	92.4	86.1	89.2
Nitrógeno recuperado del total	69.2	70.6	69.9

C U A D R O No. 11

CONTENIDO DE NITROGENO EN 268 MUESTRAS
DE FRIJOL

Frijol No.	% Nitrógeno
Guatemala negro 530	2.72
Guatemala rojo 560	2.93
Guatemala rojo 494	3.18
Guatemala blanco 497	3.20
Guatemala negro 520	3.19
Guatemala negro 534	3.14
Guatemala rojo 539	3.12
Guatemala blanco 546	3.11
Guatemala blanco 548	3.10
Guatemala rojo 349	3.19
Guatemala negro 550	3.08
Guatemala blanco 552	3.05
Guatemala rojo 553	3.02
Guatemala rojo 555	3.20
Guatemala blanco 561	3.18
Guatemala rojo 562	3.07
Guatemala blanco 566	3.20
Guatemala blanco 569	3.17
Guatemala rojo 573	2.94
Guatemala rojo 578	3.16
Guatemala marrón 580	2.98
Guatemala negro 582	3.15
Guatemala negro 586	3.14
Guatemala negro 589	3.16
Guatemala negro 593	3.10
Guatemala rojo 594	3.01
Guatemala negro 596	2.88
Guatemala negro 598	3.01
Honduras rojo 36	3.09
Honduras rojo 37	3.02
Nicaragua rojo 3	2.82
Nicaragua Marrón claro 6	3.14
Nicaragua marrón claro 21	2.98
Nicaragua rojo 22	3.17
Nicaragua rojo 23	2.64
Nicaragua blanco peq. 25	3.13
Nicaragua marrón 26	2.99
Nicaragua rojo 27	3.14
Nicaragua rojo 28	2.71
Nicaragua marrón 29	3.05
Nicaragua negro 32	3.03
Nicaragua marrón 33	3.01

Nicaragua marrón 34	3.10
Nicaragua rojo 35	2.83
Nicaragua marrón 36	2.94
Nicaragua rojo 52	3.15
Nicaragua rojo 53	2.94
Nicaragua marrón 65	2.92
Nicaragua marrón 71	3.19
Nicaragua marrón 72	3.14
Nicaragua rojo 76	3.14
Nicaragua marrón 92	3.13
Nicaragua rojo 93	3.07
Nicaragua negro 98	2.95
Nicaragua rojo 99	3.06
Nicaragua rojo 110	3.16
Guatemala negro 489	3.10
Guatemala rojo 463	3.36
Guatemala rojo 464	3.58
Guatemala pardo 469	3.55
Guatemala blanco 470	3.36
Guatemala negro 478	3.44
Guatemala negro 479	3.26
Guatemala negro 480	3.45
Guatemala negro 481	3.58
Guatemala negro 484	3.32
Guatemala negro 488	3.45
Guatemala negro 491	3.41
Guatemala negro 492	3.27
Guatemala negro 493	3.42
Guatemala rojo 495	3.36
Guatemala rojo 498	3.50
Guatemala rojo 500	3.34
Guatemala marrón 501	3.56
Guatemala negro 502	3.34
Guatemala blanco 503	3.59
Guatemala negro 505	3.41
Guatemala negro 506	3.48
Guatemala negro 508	3.40
Guatemala negro 509	3.24
Guatemala negro 512	3.40
Guatemala rojo 515	3.39
Guatemala rojo 516	3.57
Guatemala rojo 517	3.41
Guatemala rojo 518	3.50
Guatemala blanco 521	3.46
Guatemala negro 525	3.52
Guatemala negro 527	3.48
Guatemala negro 528	3.58

Guatemala negro 529	3.21
Guatemala negro 531	3.42
Guatemala negro 532	3.25
Guatemala negro 535	3.36
Guatemala blanco 536	3.35
Guatemala negro 538	3.33
Guatemala blanco 540	3.54
Guatemala rojo 541	3.31
Guatemala negro 545	3.22
Guatemala negro 547	3.35
Guatemala rojo 551	3.34
Guatemala rojo 554	3.57
Guatemala negro 558	3.50
Guatemala blanco 559	3.38
Guatemala rojo 563	3.30
Guatemala rojo 564	3.30
Guatemala negro 571B	3.48
Guatemala blanco 572	3.30
Guatemala negro 574	3.28
Guatemala negro 576	3.29
Guatemala negro 577	3.38
Guatemala blanco 579	3.26
Guatemala negro 583	3.32
Guatemala negro 584	3.31
Guatemala blanco 585	3.30
Guatemala rojo 587	3.59
Guatemala blanco 588	3.42
Guatemala blanco 590	3.34
Guatemala negro 591	3.45
Guatemala rojo 592	3.24
Guatemala negro 595	3.57
Guatemala negro 597	3.46
Guatemala rojo 600	3.57
Guatemala negro 601	3.56
Honduras rojo 3	3.43
Honduras rojo 4	3.60
Honduras rojo 7	3.20
Honduras rojo 10	3.33
Honduras rojo 13	3.40
Honduras negro 14	3.32
Honduras blanco sucio pequeño 18	3.35
Honduras rojo 19	3.47
Honduras rojo 22	3.35
Honduras negro 23	3.32
Honduras negro 26	3.54
Honduras rojo 27	3.39
Honduras rojo 33	3.48
Honduras rojo 34	3.53

Honduras negro 39	3.29
Honduras rojo 40	3.20
Honduras rojo 41	3.29
Honduras rojo 42	3.29
Honduras rojo 43	3.40
Nicaragua rojo 1	3.32
Nicaragua marrón 2	3.30
Nicaragua rojo 4	3.30
Nicaragua marrón 7	3.42
Nicaragua rojo 8	3.34
Nicaragua marrón 9	3.48
Nicaragua marrón 11	3.57
Nicaragua rojo 12	3.48
Nicaragua rojo 13	3.22
Nicaragua marrón 16	3.46
Nicaragua beige 17	3.28
Nicaragua rojo 18	3.35
Nicaragua marrón 19	3.35
Nicaragua marrón 20	3.43
Nicaragua negro 24	3.52
Nicaragua rojo 30	3.34
Nicaragua rojo 31	3.53
Nicaragua rojo 37	3.43
Nicaragua marrón 38	3.30
Nicaragua marrón 39	3.39
Nicaragua marrón 40	3.42
Nicaragua marrón 41	3.48
Nicaragua rojo 42	3.52
Nicaragua marrón 43	3.36
Nicaragua negro 44	3.47
Nicaragua marrón 49	3.22
Nicaragua rojo 56	3.56
Nicaragua beige 51	3.32
Nicaragua rojo 56	3.32
Nicaragua rojo 57	3.43
Nicaragua rojo 58	3.24
Nicaragua rojo 59	3.30
Nicaragua rojo 60	3.46
Nicaragua marrón 62	3.22
Nicaragua rojo 63	3.21
Nicaragua rojo 64	3.54
Nicaragua marrón 66	3.52
Nicaragua rojo 67	3.59
Nicaragua marrón 68	3.35
Nicaragua beige 69	3.25
Nicaragua rojo 70	3.59
Nicaragua marrón 73	3.45
Nicaragua marrón 74	3.23

Nicaragua marrón 77	3.32
Nicaragua marrón 78	3.23
Nicaragua marrón 79	3.23
Nicaragua rojo 80	3.42
Nicaragua marrón 81	3.30
Nicaragua marrón 82	3.41
Nicaragua rojo 83	3.44
Nicaragua rojo 86	3.21
Nicaragua marrón 87	3.22
Nicaragua beige 88	3.25
Nicaragua marrón 94	3.23
Nicaragua rojo 95	3.23
Nicaragua marrón 97	3.41
Nicaragua rojo 101	3.33
Nicaragua rojo 102	3.36
Nicaragua rojo 103	3.53
Nicaragua rojo 104	3.33
Nicaragua rojo 105	3.48
Nicaragua rojo 106	3.39
Nicaragua rojo 107	3.44
Nicaragua rojo 108	3.29
Nicaragua rojo 109	3.29
Nicaragua rojo 111	3.53
Guatemala negro 565	3.49
Guatemala rojo vino opaco 472	4.08
Guatemala negro 473	3.82
Guatemala negro 475	3.79
Guatemala pardo moteado 477	3.83
Guatemala negro 482	3.84
Guatemala negro 485	3.71
Guatemala negro 486	3.79
Guatemala negro 496	3.80
Guatemala rojo 504	3.87
Guatemala negro 507	3.63
Guatemala blanco 522	4.43
Guatemala negro 523	3.68
Guatemala negro 524	3.83
Guatemala negro 526	4.47
Guatemala negro 533	3.96
Guatemala rojo 537	3.64
Guatemala negro 542	3.65
Guatemala rojo 543	3.67
Guatemala negro 544	3.75
Guatemala rojo 511	3.75
Guatemala negro 599	3.76
Honduras rojo 5	4.19
Honduras rojo 6	3.85
Honduras negro 12	3.73

Honduras rojo 24	3.70
Honduras rojo 28	4.00
Honduras rojo 29	4.19
Honduras rojo 30	3.88
Honduras rojo 32	3.85
Honduras negro 38	3.77
Nicaragua blanco 36	3.97
Nicaragua rojo 47	3.99
Nicaragua rojo 61	3.73
Nicaragua beige 84	3.85
Nicaragua rojo 90	3.77
Nicaragua rojo 96	3.92
Nicaragua rojo 100	3.87
Guatemala rojo 465	3.68
Guatemala negro 466	3.67
Guatemala blanco 467	3.62
Guatemala negro 468	3.62
Guatemala negro 474	3.61
Guatemala negro grande brillante 476	3.62
Guatemala blanco amarillento 483	3.65
Guatemala negro 602	3.66
Honduras rojo 16	3.60
Honduras rojo 17	3.61
Honduras negro 20	3.63
Honduras rojo 21	3.69
Honduras rojo 25	3.68
Honduras blanco 31	3.65
Honduras rojo 35	3.62
Nicaragua marrón 10	3.66
Nicaragua rojo 14	3.64
Nicaragua rojo 45	3.62
Nicaragua rojo 48	3.69
Nicaragua rojo 55	3.64
Nicaragua beige 89	3.64
Nicaragua rojo 91	3.66

C U A D R O No. 12

CONTENIDO DE METIONINA, CISTINA Y LISINA
EN 129 SELECCIONES DE FRIJOL

Frijol	Metionina g. %	Cistina g. %	Lisina g. %
Guatemala negro 530	0.204	0.121	1.72
Guatemala negro 534	0.198	0.169	0.92
Guatemala rojo 539	0.196	0.149	1.20
Guatemala blanco 546	0.176	0.162	0.84
Guatemala blanco 548	0.188	0.125	0.91
Guatemala rojo 549	0.215	0.149	1.02
Guatemala negro 550	0.204	0.203	1.00
Guatemala negro 489	0.192	0.116	1.24
Guatemala blanco 552		0.144	0.92
Guatemala blanco 553	0.160	0.165	0.88
Guatemala rojo 555	0.182	0.158	0.98
Guatemala rojo 560	0.174	0.174	0.96
Guatemala blanco 561	0.210	0.152	1.56
Guatemala rojo 494	0.183	0.104	1.63
Guatemala blanco 497	0.159	0.086	1.80
Guatemala negro 520	0.194	0.123	2.02
Guatemala blanco 566	0.142	0.091	1.67
Guatemala negro 586	0.114	0.135	1.83
Guatemala negro 596	0.105	0.140	1.72
Nicaragua rojo 23	0.182	0.112	1.22
Nicaragua rojo 27	0.169	0.106	1.47
Nicaragua rojo 35	0.156	0.143	1.29
Nicaragua rojo 71	0.090	0.179	1.36
Nicaragua rojo 28	0.103	0.114	1.55
Nicaragua rojo 52	0.133	0.161	1.71
Nicaragua rojo 99	0.120	0.129	1.74
Guatemala rojo 463	0.241	0.171	1.24
Guatemala rojo 464	0.242	0.129	1.46
Guatemala pardo 469	0.238	0.142	1.21
Guatemala blanco 470	0.202	0.125	1.17
Guatemala negro 478	0.209	0.071	1.38
Guatemala negro 479	0.228	0.077	1.28
Guatemala negro 480	0.218	0.082	1.44
Guatemala negro 481	0.206	0.076	1.47
Guatemala negro 484	0.184	0.092	2.09
Guatemala negro 488	0.200	0.121	1.45
Guatemala negro 491	0.345	0.096	1.34
Guatemala negro 492	0.222	0.152	1.47
Guatemala negro 493	0.224	0.122	1.52

Guatemala rojo 495	0.173	0.118	1.63
Guatemala rojo 498	0.181	0.108	2.15
Guatemala marrón veteado de negro 501	0.192	0.123	1.62
Guatemala negro 502	0.186	0.110	1.75
Guatemala blanco 503	0.195	0.128	1.28
Guatemala negro 505	0.182	0.115	1.42
Guatemala negro 506	0.183	0.100	1.45
Guatemala negro 508	0.184	0.103	1.57
Guatemala negro 509	0.203	0.104	1.58
Guatemala negro 512	0.189	0.106	1.60
Guatemala rojo 516	0.211	0.118	1.87
Guatemala rojo 517	0.225	0.146	1.85
Guatemala rojo 518	0.215	0.128	2.17
Guatemala blanco 521	0.186	0.108	1.95
Guatemala negro 525	0.178	0.111	1.73
Guatemala negro 527	0.190	0.126	2.27
Guatemala negro 528	0.191	0.132	2.02
Guatemala negro 529	0.167	0.129	1.45
Guatemala negro 571B	0.132	0.100	1.56
Guatemala blanco 574	0.123	0.104	1.71
Guatemala blanco 579	0.136	0.158	2.13
Guatemala rojo 587	0.078	0.174	1.76
Guatemala negro 597	0.091	0.113	1.54
Honduras rojo 42	0.169	0.164	1.74
Nicaragua rojo 13	0.170	0.157	1.88
Nicaragua marrón 59	0.092	0.116	1.52
Nicaragua marrón 66	0.124	0.116	1.70
Nicaragua marrón 74	0.092	0.119	1.31
Nicaragua marrón 78	0.149	0.168	1.82
Nicaragua marrón 82	0.108	0.109	1.44
Nicaragua marrón 87	0.113	0.137	1.76
Nicaragua marrón 94	0.084	0.159	1.65
Nicaragua rojo 101	0.105	0.145	1.83
Nicaragua rojo 103	0.103	0.162	1.85
Nicaragua rojo 108	0.114	0.179	2.00
Guatemala rojo 500	0.177	0.120	1.68
Guatemala rojo 515	0.192	0.145	1.59
Guatemala negro 531	0.208	0.139	1.30
Guatemala negro 532	0.184	0.148	—
Guatemala negro 535	0.232	0.151	1.83
Guatemala blanco 536	0.192	0.153	1.12
Guatemala negro 538	0.207	0.132	1.13
Guatemala blanco 540	0.197	0.159	1.54
Guatemala rojo 541	0.195	0.158	0.74
Guatemala negro 545	0.191	0.136	1.04
Guatemala negro 547	0.198	0.150	0.97

Guatemala rojo 551	0.204	0.131	1.00
Guatemala rojo 554	0.250	0.141	0.96
Guatemala negro 558	0.192	0.147	1.20
Guatemala negro 559	0.205	0.150	1.05
Guatemala negro 533	0.249	0.170	1.51
Guatemala negro 537	0.202	0.162	1.19
Guatemala rojo 542	0.267	0.173	0.95
Guatemala rojo 543	0.218	0.192	0.92
Guatemala rojo 544	0.214	0.170	0.91
Guatemala negro 565	0.172	0.147	1.75
Guatemala negro 602	0.117	0.161	1.73
Honduras rojo 5	0.139	0.134	2.22
Honduras rojo 14	0.130	0.161	1.82
Honduras rojo 29	0.135	0.106	1.72
Honduras blanco 31	0.168	0.186	1.84
Honduras rojo 32	0.173	0.178	1.61
Nicaragua marrón 10	0.149	0.151	1.93
Nicaragua rojo 45	0.174	0.132	1.63
Nicaragua rojo 47	0.123	0.169	1.48
Nicaragua rojo 55	0.103	0.130	1.77
Nicaragua rojo 90	0.137	0.157	1.76
Guatemala rojo 465	0.233	0.154	1.38
Guatemala negro 466	0.246	0.155	1.36
Guatemala blanco 467	0.201	0.148	1.26
Guatemala negro 468	0.230	0.130	1.27
Guatemala rojo vino opaco 472	0.254	0.149	1.34
Guatemala negro pequeño 473	0.276	0.127	1.29
Guatemala negro pequeño 474	0.222	0.178	1.38
Guatemala negro pequeño 475	0.231	0.103	1.15
Guatemala negro grande brillante 476	0.214	0.084	1.46
Guatemala blanco 477	0.246	0.070	1.43
Guatemala pardo moteado 482	0.202	0.112	2.33
Guatemala blanco amarillento 483	0.202	0.076	1.47
Guatemala negro 485	0.254	0.115	1.20
Guatemala negro 486	0.210	0.141	1.39
Guatemala negro 496	0.206	0.131	1.73
Guatemala negro 504	0.198	0.127	1.62
Guatemala rojo 507	0.186	0.094	1.53
Guatemala negro 522	0.248	0.123	2.11
Guatemala blanco 523	0.219	0.116	1.81
Guatemala negro 524	0.188	0.096	1.85
Guatemala negro 526	0.226	0.136	2.14

C U A D R O No. 13

DISTRIBUCION DE LAS MUESTRAS SEGUN SU
CONTENIDO DE NITROGENO, METIONINA, CISTINA Y
L I S I N A

Contenido de Nitrógeno.		Contenido de Metionina.		Contenido de Cistina.		Contenido de Lisina.	
Número de muestras	%	Número de muestras	%	Número de muestras	%	Número de muestras	%
3	2.69	6	0.087	5	0.075	2	0.80
2	2.80	9	0.107	3	0.084	9	0.91
7	2.91	9	0.126	5	0.094	7	1.02
14	3.02	6	0.145	10	0.103	5	1.14
23	3.12	12	0.164	15	0.113	14	1.25
34	3.23	29	0.183	13	0.122	11	1.36
54	3.34	28	0.202	19	0.132	18	1.48
44	3.45	14	0.221	12	0.141	16	1.59
29	3.55	10	0.240	17	0.151	19	1.71
28	3.66	4	0.259	14	0.160	13	1.82
11	3.77	1	0.278	10	0.170	3	1.93
10	3.88	0	0.297	4	0.179	4	2.05
4	3.99	0	0.316	2	0.189	5	2.16
1	4.09	0	0.335	0	0.198	2	2.27
2	4.20	1	0.355	1	0.208	1	2.39
0	4.31	—	—	—	—	—	—
1	4.42	—	—	—	—	—	—
1	4.52	—	—	—	—	—	—
Promedio	3.44	—	0.183	—	0.134	—	1.51
D.S.	<u>+0.017</u>		<u>+0.040</u>		<u>+0.024</u>		<u>+0.030</u>

V. DISCUSION

Los resultados obtenidos de los experimentos en los cuales el frijol fué tratado con solventes individuales, indican que la solución de hidróxido de sodio es la más eficiente para extraer las proteínas de este grano, ya que con esta solución fué posible extraer hasta el 75% del nitrógeno. Después del hidróxido de sodio, los solventes más efectivos fueron el agua y la solución de cloruro de potasio, los cuales extrajeron cantidades similares del nitrógeno del frijol. Finalmente, la solución alcohólica fué la menos efectiva, demostrando que el frijol no contiene mayor concentración de proteínas solubles en ese solvente, contrario a la proteína de los cereales, en los cuales las proteínas solubles en alcohol constituyen la mayor concentración (41, 47). Resultados similares a los informados en este trabajo fueron encontrados en frijoles por otros investigadores (19, 20, 30, 35, 41, 45).

A pesar de que es favorable haber encontrado que el agua, el cloruro de potasio y el hidróxido de sodio pueden extraer más del 50% del nitrógeno del frijol, esta característica es desventajosa ya que dificulta la separación posterior de las proteínas, por tener una solubilidad amplia en los solventes específicos. Esto sugiere que las propiedades físico químicas de las proteínas del frijol son muy parecidas entre sí. Estas conclusiones están confirmadas por los resultados de los experimentos en los cuales se usaron diferentes secuencias de solventes en la misma muestra. Los datos indican que el solvente usado de primero extrajo más proteína que los solventes usados después.

En todos los experimentos, se encontró que alrededor del 20% del nitrógeno no era extraído, aún aplicando en manera continua los tres solventes, agua, cloruro de potasio y el hidróxido de sodio.

Sería de mucho interés poder caracterizar química y biológicamente el nitrógeno extraído con agua, ya que las poblaciones de Centro América consumen el "caldo de frijol". Esto es de especial importancia para el caso de niños menores de 5 años, que como se muestra en la figura No. 3, ingieren cantidades relativamente altas de este material (15, 21, 23, 28). Asimismo, se sabe que el frijol contiene inhibidores de la tripsina y que estos podrían estar localizados en el extracto acuoso (24, 27, 30) y sería de interés poder conocer su actividad antitriptica antes y después de la cocción, que se ha demostrado destruye estos factores (32).

Los resultados del presente estudio también indicaron que las proteínas extraídas con hidróxido de sodio tienen su menor

solubilidad, o tienen su punto isoelectrico entre el pH 4 y 5, lo cual, según se ha informado, es característico de estas proteínas. (19, 20).

Usando la información obtenida, tanto en lo referente a la extracción con solventes individuales y las características de las proteínas extraídas según el pH, se diseñó un proceso de extracción y fracción aumento de las proteínas del frijol. Sin embargo, los resultados no fueron tan buenos como se hubiera deseado, a pesar de que aparentemente el fraccionamiento se pudo reproducir en cierto grado. El proceso consistió en extraer las proteínas con solución de hidróxido de sodio, ya que este solvente fué el que dió mejor extracción al ser usado individualmente. Con este solvente se pudo extraer 78.4% del nitrógeno total. El siguiente paso consistió en elevar el pH a 4.5 con el objeto de precipitar todas las proteínas menos aquellas que fueran solubles en ácido. Este paso indicó que aproximadamente 20% de las proteínas extraídas con hidróxido de sodio eran solubles también en solución ácida. El precipitado fué luego lavado con agua para conocer si todavía existían en él las proteínas solubles en este solvente. Sin embargo, la cifra aproximadamente de 3% sugiere que las proteínas solubles en agua son las mismas que las solubles en solución ácida (pH 4.5). El precipitado fué luego lavado con cloruro de potasio, en el cual solamente 10% del nitrógeno extraído fué solubilizado. Finalmente, el residuo que representa alrededor del 55% fué el verdadero nitrógeno soluble en solución alcalina.

El fraccionamiento estudiado resultó en una recuperación relativamente baja no solo del nitrógeno total extraído sino también del total en la muestra. No se pueden explicar estos datos, a menos que la alcalinidad del medio de extracción haya sido responsable de pérdidas de nitrógeno a causa de hidrólisis. A pesar de esto el fraccionamiento preliminar estudiado ofrece posibilidades para mejorarlo, lo cual debería ser objeto de estudios posteriores.

Hubiera sido también de interés haber caracterizado las proteínas de nitrógeno o proteína soluble en solución alcalina bajo el punto de vista químico y nutricional. El análisis del material por su contenido proteico sugiere que todavía estaba impuro ya que contenía solamente 10% de nitrógeno o sea alrededor de 62.5% de proteína.

Los resultados de la segunda parte de este trabajo son de mucho interés práctico, ya que esta información puede ser utilizada por agrónomos para seleccionar o cruzar variedades de

frijol con mayor cantidad de proteína total o de aminoácidos. Recientemente se ha informado que un gen conocido como opaco-2 mejora significativamente la calidad o valor nutritivo del maíz (46). Es asimismo posible que algo similar ocurra con el frijol, pero no se ha encontrado, ya que el número de estudios de esta naturaleza es relativamente pequeño en este grano. El maíz y el frijol se complementan muy bien bajo el punto de vista nutricional (10, 28). Ahora bien, la dieta del poblador rural centroamericano sería superior a la actual si pudiera consumir maíz con el gen opaco-2 y un frijol de mayor contenido de metionina que el actual, ya que la mezcla de maíz y frijol muestra una deficiencia de este aminoácido (10).

Los resultados indicaron una gran variación en el contenido de nitrógeno, con algunas muestras con 4.52% de nitrógeno. Esta variación ya se había informado anteriormente (34) sobre todo entre diferentes clases de leguminosas más bien que dentro de *Phaseolus vulgaris*. Fué también de mucho interés encontrar una variación grande en metionina, lo que permite seleccionar muestras con mayor contenido de este aminoácido. Estudios anteriores han informado poca variabilidad en este aminoácido entre selecciones y por el medio ambiental (44), sin embargo, el número de muestras estudiadas fué siempre pequeño. En cuanto a cistina, la variación fué menor que la de metionina, lo cual se esperaba, ya que aquel aminoácido está relacionado metabólicamente con el segundo. En el caso de lisina, la variación también fué relativamente poca, lo cual es de interés ya que se sabe que la mayor parte de las semillas leguminosas son ricas fuentes de este aminoácido.

Como se indicó anteriormente, esta información es de suma importancia y debería ser utilizada por los agrónomos con el fin de poder seleccionar el frijol no solo en base a su rendimiento sino también en base a su valor nutritivo. Los resultados de la solubilidad del nitrógeno pueden también tener una aplicación práctica para detectar o controlar la edad del frijol en almacenamiento o las condiciones de almacenaje y las características físicas de cocción. Esto sin embargo debe de ser investigado.

VI RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objeto estudiar la solubilidad de las proteínas del frijol (*Phaseolus vulgaris*) con el propósito de tratar de fraccionarlas en componentes por diferencias en solubilidad y poder eventualmente caracterizarlas en términos del contenido de aminoácidos y nutricionalmente. Además, se estudió la variación en el contenido de nitrógeno total, metio-

nina, cistina y lisina de un grupo relativamente grande de variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*), con el propósito de poder seleccionar variedades de un contenido mayor de esos nutrientes, especialmente nitrógeno y metionina.

Los resultados de extracción del nitrógeno de la semilla de frijol indicaron que el uso individual de los siguientes solventes: agua, solución al 5% de KCl, solución alcohólica al 70% y solución al 0.2% de NaOH extrajeron todos más del 50% del nitrógeno con excepción de la solución alcohólica, la cual pudo extraer un máximo de 10%. Aparentemente, la solución al 0.2% de NaOH fué la más efectiva de todos los solventes. También se encontró que 4 extracciones sucesivas de la misma muestra con cada solvente, usado individualmente no mejoraba la cantidad total de nitrógeno extraído con agua, pero sí las cantidades extraídas con cloruro de potasio o hidróxido de sodio en comparación con una sola extracción.

El uso de los tres solventes usados sucesivamente en la misma muestra también resultó en una mayor extracción del nitrógeno que cuando se empleaba sólo uno, sin embargo, no se encontró selectividad o preferencia del solvente por el nitrógeno de la semilla, ya que el primer solvente usado extraía la mayor cantidad en nitrógeno.

Las proteínas o el nitrógeno extraído con solución al 0.2% de NaOH precipitan al ajustar el pH de la solución a un pH de 4 a 5. A pH más ácidos se notó un ligero aumento en solubilidad. Usando las características de solubilidad y el efecto de pH se trató de desarrollar un sistema de fraccionamiento, el cual no fué del todo satisfactorio, requiriendo más investigación. Usando este método, la mayor cantidad de nitrógeno se encontró de nuevo en la solución alcalina.

El análisis de 238 muestras por nitrógeno demostró una variación de 2.69 a 4.52% con un promedio de 3.40%, indicando la posibilidad de seleccionar variedades de *Phaseolus vulgaris* con mayor contenido proteico. De las 238 muestras, 131 contenían más de 3.34% de nitrógeno.

Solamente 129 muestras fueron analizadas por metionina, cistina y lisina. La metionina varió entre 0.087 a 3.55% con un promedio de 0.183%. La cistina demostró un valor mínimo y máximo de 0.075 y 0.208% respectivamente, mientras que la lisina varió entre 0.80 a 2.39 con un promedio de 1.51%. Estos datos sugieren la posibilidad de seleccionar variedades de frijol por estos aminoácidos para mejorar la nutrición de los pobladores que reciben una gran parte de su proteína de este grano.

VII. REFERENCIAS

- 1.—A.O.A.C. Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, 9 th. ed. Washington D. C. 1960.
- 2.—Arroyave, G., J. Méndez y R. Bressani. Contenido de diversos nutrientes en alimentos procedentes de Centro América. Arch. Venez. Nut. 6: 101, 1955.
- 3.—Baptist, N. G. Essential amino acids of some common tropical legumes and cereals. Brit. J. Nut. 8: 218, 1954.
- 4.—Basu, K. P. and M. K. Haldar. J. Indian Chem. Soc. 16:209, 1939.
- 5.—Basu, K. P., M. C. Nath and M. O. Ghani. Indian J. Med. Res. 23: 789, 1936.
- 6.—Bhagrath, K. and M. Sreenivasaya. Current Sci. 3: 354, 1937.
- 7.—Borchers, R. and C. W. Ackerson. The nutritive value of legume seeds. X. Effect of autoclaving and the trypsin inhibitor test for 17 species. J. Nut. 41: 339, 1950.
- 8.—Braham, J. E., M. Vela, R. Bressani y R. Jarquín. Efecto de la cocción y de la suplementación con aminoácidos sobre el valor nutritivo de la proteína del gandul (*Cajanus indicus*). Arch. Venez. Nut. 15: 19, 1965.
- 9.—Bressani, R. and A. T. Valiente. All vegetable protein mixtures for human feeding. VII. Protein complementation between polished rice and cooked black beans. J. Food Science 27: 401, 1962.
- 10.—Bressani, R., A. T. Valiente and C. E. Tejada. All-vegetable protein mixtures for human feeding. VI. The growth promoting value of combination of lime-treated corn and cooked black beans. J. Food Science, 27: 394, 1962.
- 11.—Bressani, R., L. G. Elías and A. T. Valiente. Effect of cooking and amino acid supplementation on the nutritive value of black beans (*Phaseolus vulgaris*) Brit. J. Nut. 17: 69, 1963.
- 12.—Bressani, R., J. Méndez y N. S. Scrimshaw. Valor nutritivo de los frijoles centroamericanos. III. Variaciones en el contenido de proteína, metionina, triptofano, tiamina, riboflavina y niacina de muestras de *Phaseolus vulgaris* cultivadas en Costa Rica, El Salvador y Honduras. Arch. Venez. Nut. 10: 71, 1960.
- 13.—Bressani, R., L. G. Elías and D. A. Navarrete. Nutritive

- value of Central American beans. IV. The essential amino acid content of samples of black beans, red beans, rice beans and cowpeas of Guatemala. *J. Food Science* 26: 525, 1961.
- 14.—Bressani, R., E. Marcucci, C. E. Robles and N. S. Scrimshaw. Nutritive value of Central American beans. I. Variations in the nitrogen, tryptophane and niacin content of ten Guatemalan black beans (*Phaseolus vulgaris*, L) and the retention of the niacin after cooking. *Food Res.* 19: 263, 1954.
 - 15.—Castillo, A. S. y M. Flores. Estudios dietéticos en El Salvador. II. Cantón Platanillos, Municipios de Quezaltepeque, Departamento de La Libertad. Sup. No. 2 Bol. OSP Pub. Cient. del INCAP, pag. 54, 1955.
 - 16.—Chattopadhyay, H. and S. Banerjee. Effect of germination on the biological value of proteins and the trypsin inhibitor of some common Indian Pulses *Indian J. Med. Res.* 41: 185, 1953.
 - 17.—Cravioto, R. B., E. E. Lockhart, R. K. Anderson, F. de P. Miranda and R. S. Harris. Composition of typical Mexican foods. *J. Nutrition* 29: 317, 1945.
 - 18.—Elias, L. G., R. Colindres and R. Bressani. The nutritive value of eight varieties of cowpea (*Vigna sinensis*). *J. Food Science* 29: 118, 1964.
 - 19.—Evans, R. J., J. L. Henry and J. L. St. John. Peptization and precipitation of nitrogenous constituents of dry peas. *Ind Eng. Chem.* 40: 458, 1948.
 - 20.—Evans, R. J. and M. H. Kerr. Extraction and Precipitation of Nitrogenous Constituents of Dry Navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.* 11: 26, 1963.
 - 21.—Flores, M., Z. Flores and M. Y. Lara. Food intakes of guatemalan indian children, ages 1 to 5. *J. Amer. Diet. Assoc.* 48: 480, 1966.
 - 22.—Flores M. Food patterns in Central America and Panama. In: *Tradition Science and Practice in Dietetics (Proc. of 3rd. Internat. Congress of Dietetics)* London 10-14 July 1961. Yorkshire, Great Britain, Wm. Byles and Sons Ltd. of Bradford. p. 23, 1961.
 - 23.—Flores, M., E. Reh. Estudios de hábitos dietéticos en poblaciones de Guatemala. I. Magdalena Milpas Altas Sup. No. 2 Bol. OSP, Publ. Cient. INCAP; p. 90, 1955.
 - 24.—Fraenkel-Conrat, H., R. C. Bean, E. D. Ducay and H. S. Olcott. Isolation and characterization of a trypsin inhibi-

- tor from lima beans. Arch. Biochem. Biophys. 37: 393, 1952.
- 25.—Jaffé, W. G. Limiting essential amino acids of some legume seeds. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 71: 398, 1949.
- 26.—Jaffé, W. El valor biológico comparativo de algunas leguminosas de importancia en la alimentación venezolana. Arch. Venez. Nut. 1: 107, 1950.
- 27.—Jaffé, W. G. Protein digestibility and trypsin inhibitor activity of legume seeds. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 75: 219, 1950.
- 28.—Jones, D. B., E. F. Gersdorff and S. Phillips. Proteins of the black bean of the Mayas, *Phaseolus vulgaris*. J. Biol. Chem. 122: 745, 1938.
- 29.—Kakade, M. L. and R. J. Evans. Nutritive value of different varieties of navy beans. Quaterly Bulletin (Michigan State Univ). 48: 89, 1965.
- 29a.—Kakade, M. L. and R. J. Evans. Chemical and enzymatic determination of available lysine in raw and heated navy beans (*Phaseolus vulgaris*). Can. J. Biochem. 44: 648, 1966.
- 30.—Kothary, K. and K. Sohoni. Protein of double beans (*Faba vulgaris moench*) 1. Isolation, Fractionation and amino acid composition of the proteins. 2. Studies in vitro digestion. J. Sci. Ind Res. 30: 225, 1960.
- 31.—Lantz, E. M., H. W. Gough and A. M. Campbell. Effect of variety, location and years on the protein and amino acid content of dried beans. J. Agric. Food Chem. 6: 58, 1958.
- 32.—Liener, I. E. Toxic factors in edible legumes and their elimination. Amer. J. Clin. Nut. 11: 281, 1962.
- 33.—Osborne, T. B. J. Am. Chem. Soc. 16: 633, 703, 757, 1894.
- 34.—Patwardhan, N. V. Pulses and beans in human Nutrition. Amer. J. Clin. Nut. 11: 12, 1962.
- 35.—Powrie, W. D. Extraction of nitrogenous constituents from the navy beans seed (*Phaseolus vulgaris*). J. Agric. Food Chem. 9: 67, 1961.
- 36.—Report of the FAO/CCTA Technical Meeting on legumes in agriculture and human nutrition in Africa. FAO Rome, Italy, 1959.
- 37.—Richardson, L. R. Southern peas and other legume seeds

- as a source of protein for the growth of rats. *J. Nutrition* 36: 451, 1948.
- 38.—Ritthausen, H. J. *Pract. Chem.* 103: 204, 1883.
- 39.—Scharrer, K. and R. Schreiber. *Bodenk u Pflazenernähr* 30: 360, 1943.
- 40.—Sherwood, F. W., V. Wildon and W. J. Peterson. Effect of cooking and of methionine supplementation on the growth-promoting property of cowpea (*Vigna sinensis*) protein. *J. Nutrition* 52: 199, 1954.
- 41.—Smith, C. R. Jr., F. R. Earle and I. A. Wolff Comparison of the solubility characteristics of selected seed proteins. *J. Agric. Food Chem.* 7: 133, 1959.
- 42.—Steel, B. F., H. E. Sauberlich, M. S. Reynolds and C. A. Bauman. Media for *leuconostoc mesenteroides* P-60 and *leuconostoc citrovorum* 8081. *J. Biol. Chem.* 177: 533, 1949.
- 43.—Swaminathan, M. *Indian J. Med. Res.* 25: 847, 1938.
- 44.—Tandon, O. B., R. Bressani, N. S. Scrimshaw and F. Le Beau. Nutritive value of beans. Nutrients in Central American beans. *J. Agric. Food Chem.* 5: 137, 1957.
- 45.—Waterman, H. D., C. O. Johns and D. B. Jones Conphaeolin. A new globulin from the navy beans, *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol. Chem.* 55: 93, 1923.
- 46.—Mertz, E. T., L. S. Bates and O. L. Nelson. *Science* 145: 279, 1964.
- 47.—Mertz, E. T. and R. Bressani. Studies on corn proteins I. A new method of extraction. *Cereal Chem.* 34: 63, 1957.