

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Y AGROPECUARIAS

DIVISION CIENCIAS VETERINARIAS



"OBTENCION Y EVALUACION DE UN AISLADO
PROTEINICO A PARTIR DE UNA LEGUMINOSA
SILVESTRE DEL ESTADO DE JALISCO
(Lupinus exaltatus Zucc.)"

T E S I S P R O F E S I O N A L
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A
P.M.V.Z. GABRIEL ALEJANDRO CARO OJEDA

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. PEDRO M. GARCIA LOPEZ
ASESORES DE TESIS: M. EN C. MARIO ALBERTO RUIZ LOPEZ
DR. JACINTO BAÑUELOS PINEDA

LAS AGUJAS, NEXTIPAC, ZAPOPAN, JAL. ENERO DEL 2000.

AGRADECIMIENTOS

CONACYT

La realización de este trabajo fue apoyada a través de los proyectos de investigación

Conacyt-Simorelos 970301021 y Conacyt Nacional 4047 P-B

Se agradece al CEPROBI-IPN por el apoyo técnico y supervisión en la elaboración del aislado proteínico.

Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Botánica y Zoología

Por el apoyo técnico y financiero a través de sus proyectos de investigación así como a los profesores por su asesoría para la realización de esta tesis.

TITULO

" OBTENCION Y EVALUACION DE UN AISLADO PROTEINICO A PARTIR DE UNA
LEGUMINOSA SILVESTRE DEL ESTADO DE JALISCO (*Lupinus exaltatus* Zucc.) "



DEDICATORIA

A Dios nuestro señor gracias por haberme dado vida, salud; por poner en mi camino personas tan valiosas que siempre me tendieron su mano .

A MIS PADRES

Gracias por el esfuerzo y la confianza que me demostraron para ayudarme a lograr una meta mas en mi vida.

A MIS HERMANOS

Les agradezco el apoyo que incondicionalmente me brindaron en todo momento de mi carrera.

A MIS TIOS

Por su apoyo moral y económico encaminado a la culminación de mi preparación profesional.

A MIS AMIGOS

Que en diferentes etapas me dieron la mano para salir adelante.



Alejandro

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN	X
INTRODUCCION.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
JUSTIFICACION.....	7
HIPOTESIS.....	8
OBJETIVOS.....	9
MATERIAL Y METODOS.....	10
RESULTADOS Y DISCUSION.....	17
CONCLUSIONES.....	26
BIBLIOGRAFIA.....	27

RESUMEN

Los lupinos son importantes por su alto contenido de proteína, aceite y alcaloides que varían del 35 al 45%, 7 al 20% y 2.0 al 5.0% respectivamente. De las especies de *Lupinus* que crecen en Jalisco, *L. exaltatus* es de las más abundantes, debido a que se distribuye en diversas localidades y presenta una alta densidad de población en los lugares donde crece. Sus semillas muestran valores promedio de proteína del 38.0%, pero su elevado contenido de alcaloides (2.4%) impide su aprovechamiento directo en la alimentación. Actualmente, para disminuir el contenido de alcaloides en los lupinos se han desarrollado métodos de extracción de proteínas. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue obtener un aislado proteínico por precipitación isoeléctrica de *L. exaltatus* en donde se obtuvo un producto con 95.0% de proteínas (N X 6.25) y 0.017% de alcaloides totales. El perfil aminoacídico reveló la presencia de todos los aminoácidos esenciales, con una concentración baja de metionina y cistina como limitantes. La capacidad de retención de agua y aceite de 1.30 y 1.23 ml/g de proteínas respectivamente son inferiores a los aislados de otras leguminosas, sin embargo el resto de las propiedades funcionales evaluadas son similares e incluso superiores a los de soya, asimismo se obtuvo un rendimiento de recuperación de proteína del 30%. Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten recomendar este procedimiento para el aprovechamiento de los lupinos silvestres de México como una fuente de proteínas e incorporarlos en la formulación de diversos productos en la industria alimentaria Mexicana.

INTRODUCCION

La implementación de cultivos agrícolas como fuente de alimento, se reduce a más o menos 30 especies vegetales que proporcionan más del 90% de los nutrientes de la dieta humana y animal (27).

Los principales cultivos son cereales como el trigo, maíz, avena, sorgo, cebada y arroz que son ricos en almidón y con un contenido de proteína del 7 al 14% que contrasta con la elevada proporción de proteína en las leguminosas como el chícharo, lenteja, frijol, cacahuete, lupinos y soya que varía del 17% al 40% (43).

En algunos países del mundo, donde la proteína animal es escasa o no se consume por razones religiosas o culturales las leguminosas representan la principal fuente proteínica en la alimentación (43).

La soya es la fuente de proteína vegetal más utilizada en la formulación de raciones alimenticias para animales y representa la principal leguminosa de grano empleada para elaborar concentrados y aislados proteínicos por procesos tecnológicos (12). Otras especies como la alfalfa y el cártamo respectivamente, son utilizadas en mucho menor proporción (25).

En México, solo los estados de Sonora, Sinaloa, Tamaulipas y Chiapas, reúnen las condiciones tecnológicas y agroecológicas adecuadas para el cultivo de la soya, con una producción anual de 522,576 toneladas (13); cantidad insuficiente para cubrir la demanda nacional. El déficit es cubierto en su mayor parte por la importación de soya proveniente de los Estados Unidos de Norte América que asciende a 2,447,948 toneladas anuales (14).

Esta dependencia ha provocado la incorporación de leguminosas no convencionales con altos contenidos de proteína, calcio, hierro, vitaminas del complejo B (27,39), además su cultivo beneficia directamente a la agricultura ya que en sus raíces se encuentran bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*) que enriquecen el suelo con N_2 y aumentan el rendimiento de las cosechas en cultivos de rotación (leguminosa-cereal) (40).

A pesar de su alto contenido de proteína las leguminosas como el haba, chícharo, frijol, soya, lenteja y lupino, entre otros, contienen factores tóxicos y antinutrientes como los inhibidores de tripsina, hemaglutininas o lectinas, fitatos, saponinas, alcaloides y glucósidos cianogénicos que deben ser eliminados de manera apropiada por diversos tratamientos sin disminuir su valor nutritivo (24, 38).

De las leguminosas alternativas a la soya se encuentran las especies del género *Lupinus*, que agrupan a más de 400 especies, en forma natural se distribuyen en las regiones del Mediterráneo y en casi todo el continente Americano (3, 26).

Se consideran interesantes porque sus semillas contienen una alta concentración de proteínas (35-40%), fibra (6-17%), aceite (5-16%) y alcaloides (1-5%) (10, 22).

El elevado contenido de alcaloides quinolizidínicos en las especies silvestres o amargas de los lupinos limita su uso directo en la alimentación ya que causan toxicidad general en vertebrados (44).

Actualmente se han identificado más de 150 alcaloides en los lupinos con diez estructuras químicas diferentes(30). Individualmente estos alcaloides muestran diversos efectos tóxicos y farmacológicos. Así la anagirina causa malformaciones congénitas en terneros y la citisina teratogenicidad en pollos y conejos; mientras que la esparteina y la lupanina poseen actividad antiarrítmica cardíaca y antimicrobiana respectivamente. Ambas son estimulantes o depresores del SNC (31). El más tóxico es la citisina, seguido de la esparteina y la lupanina, el resto de los alcaloides no presentan toxicidad significativa (31).

Para evitar el efecto tóxico de los alcaloides, se han desarrollado métodos que permiten eliminarlos o disminuirlos a niveles inocuos, utilizando tratamientos químicos, físicos y biológicos (1, 6, 21, 36).

Con este propósito se han desarrollado variedades dulces mejoradas fitogenéticamente de las especies cultivadas de *Lupinus albus*, *L. luteus* y *L. angustifolius*, mediante el descubrimiento de mutantes naturales con bajos contenidos de alcaloides, con un porcentaje de alcaloides menor al 0.02% de alcaloides totales en sus semillas (15). Otros métodos utilizados para la reducción de alcaloides se basan en las técnicas tradicionales de desamargado, que consisten en el remojo de semillas,

cocción y un lavado prolongado (de 3 a 4 días) en corriente de agua, sin embargo con este proceso se eliminan cantidades significativas de proteína soluble, carbohidratos, vitaminas y minerales, entre otros además resulta costoso cuando se tratan grandes cantidades de semillas (10).

Con relación a lupinos silvestres (amargos), en nuestro país se han descrito más de 80 especies diferentes, de las cuales 12 crecen en el Estado de Jalisco distribuidas en 32 municipios. *Lupinus mexicanus* es la especie de más amplia distribución debido a que crece en el mayor número de municipios, mientras que *L. leptocarpus* es el de menor distribución localizado tan solo en dos municipios. Por otra parte *L. exaltatus* es la especie más abundante por su alta densidad de población, en particular en la región adyacente al nevado Colima (34).

Estudios previos llevados a cabo en semillas de 7 lupinos silvestres de la región occidente de México, muestran valores de proteína cruda (N X 6.25) del 35% al 42%, fibra cruda 14%-18%, extracto etéreo 7%-12%, extracto libre de nitrógeno (E.L.N) 32-38% y alcaloides totales del 2.5% al 5.0% (18, 35). Asimismo se observó que la lupanina es el alcaloide más abundantes en *L. exaltatus* representando más del 80% del contenido total de alcaloides en sus semillas (9).

Además se han realizado estudios de digestibilidad "in situ" en borregos, utilizando harina de semilla cruda de diferentes especies de lupinos silvestres, en donde se encontró una alta digestibilidad arriba del 80% (34). Sin embargo es necesario reducir los niveles de alcaloides (desamargado), para utilizarlos mas ampliamente en la alimentación animal ya que se tiene que la utilización de *Lupinus angustifolius* en la alimentación de lechones con niveles de alcaloides del 0.8% redujo el consumo de alimento y disminuye el crecimiento, en comparación con lechones que consumen dietas con harina de lupinos de 0.16 % de alcaloides (29).

El aprovechamiento de los lupinos amargos o silvestres del estado de Jalisco en la alimentación humana y/o animal, pudiera lograrse si se redujera el contenido total de alcaloides a niveles del 0.02%. Esto puede realizarse mediante selección y mejoramiento genético o con la extracción de proteínas para la elaboración de concentrados y aislados proteínicos. A pesar de que ambos procedimientos son técnicamente factibles, el proceso tecnológico resultaría más económico y de menor duración comparado con el

proceso de selección de mutantes dulces y fitomejoramiento.

La obtención de aislados proteínicos a partir de la soya, con un contenido mínimo de 90% de proteína por la remoción de los componentes no proteicos de sus semillas, es un proceso bien conocido desde los años 30, sin embargo, el primer aislado utilizado en la alimentación humana a partir de soya se elaboró en 1950.

A la fecha otras especies vegetales como la alfalfa, chícharo, cártamo, trigo, maíz, y avena se han empleado como materia prima en la extracción de proteínas en la elaboración de concentrados proteínicos vegetales con un contenido de proteína que varía del 30 al 73% (7, 12, 25, 28)

Tanto los concentrados como los aislados proteínicos se utilizan como agentes espumantes y emulsificantes, para dar viscoelásticidad, cohesión, gelificación y desnaturalización por el calor a la masa utilizada en la elaboración de productos de panadería (12).

Similamente estos productos son empleados como aditivos alimenticios para mejorar el rendimiento y calidad nutritiva de quesos, helados, postres, salchichas y jamones mediante un aumento en la capacidad de retención de grasa, viscosidad y gelificación de la mezcla formulada para su preparación(11).

Uno de los métodos más comunes utilizados en la obtención de aislados proteicos es por "precipitación isoelectrica" que se basa en la extracción proteínica de las diferencias de solubilidad de las fracciones globulínicas con respecto al pH; para su obtención se parte de harinas vegetales desgrasadas que han recibido un tratamiento térmico mínimo y la extracción se efectúa con agua y álcalis a pH 7.5-8.5; el residuo insoluble contiene principalmente polisacáridos que se eliminan por centrifugación. El extracto se acidifica a pH 4.5, lo que hace precipitar la mayor parte de la proteína en forma de crema que se separa del suero (fracción soluble) por centrifugación.

Los aislados de leguminosas contienen ciertos compuestos de bajo peso molecular como saponinas, fosfolípidos, isoflavonas y algunos glucósidos (4).

Para que sean incorporados como ingredientes en la alimentación humana los aislados proteínicos deben de contener una baja proporción de factores antinutricionales, fibra cruda y además tener un alto valor biológico, digestibilidad y una composición balanceada de aminoácidos.

Las diferentes proteínas presentes en los aislados y concentrados proteínicos elaborados a partir de lupinos son de baja digestibilidad y en promedio contienen una baja proporción de aminoácidos azufrados lo cual influye en la baja calidad nutricia observada en animales monogástricos alimentados con dietas basándose en harinas de semillas de lupinos(2, 17, 19).

Por otra parte sus propiedades funcionales que están determinadas por la proporción y tipo de aminoácidos presentes en las proteínas extraídas en cada una de las especies de lupinos utilizados como materia prima pueden clasificarse en tres grupos principales:

- 1) Propiedades de hidratación; absorción y retención de agua, adhesión, dispersabilidad, solubilidad y viscosidad.
- 2) Propiedades dependientes de las interacciones proteína- proteína; precipitación y gelificación.
- 3) Propiedades superficiales, tensión superficial de emulsificación y características espumantes de las proteínas (11).

Los aislados y concentrados proteínicos preparados a partir de *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus*, muestran propiedades funcionales variables dependiendo del proceso de elaboración y de las variedades utilizadas como materia prima. Así los aislados proteínicos preparados a partir de *L. albus* variedades Multolupa y Buttercup muestran mejor solubilidad en agua, igual capacidad emulsificante y de solubilidad, pero una capacidad de elasticidad y gelificación inferior a los aislados de soya (16, 23).

La capacidad de formación y estabilidad de espuma de concentrados proteínicos de *L. mutabilis* son inferiores que los reportados para concentrados y aislados proteínicos de soya, girasol y el frijol mungo (32).

De esta manera el propósito del presente trabajo consistió en la producción de un aislado proteínico a partir de una especie silvestre del género *Lupinus* (*L. exaltatus*) nativo del estado de Jalisco, que aunado al conocimiento de la composición aminoacídica de sus diferentes proteínas que lo forman y sus propiedades funcionales, así como la disminución o eliminación de alcaloides tóxicos, pueden proporcionar las bases para el uso de una nueva fuente proteica en la elaboración de mejores o nuevos productos por la industria alimentaria jalisciense.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las leguminosas por su elevado contenido de proteínas, aproximadamente el doble de los cereales, son la fuente proteínica vegetal más utilizadas en la alimentación de animales.

Asimismo la soya es el grano más utilizado en la formulación de raciones alimenticias para la producción pecuaria en el mundo, y es empleada ampliamente como extensor o mejorador de la calidad nutritiva en una gran variedad de productos para la alimentación humana. Sin embargo, en México su producción es insuficiente para satisfacer la demanda nacional, debido a factores agro-ecológicos prevaletentes en la mayoría de las regiones agrícolas del país.

Por otra parte existen especies silvestres del género *Lupinus* que contienen de 35 a 40% de proteína, valores comparables a la soya. Sin embargo, no pueden ser consumidas directamente por animales o humanos por la presencia de alcaloides quinolizidínicos, que provocan diversos trastornos fisiológicos.

La extracción de proteínas a partir de semillas de lupinos silvestres libres de alcaloides con características funcionales aceptables para la elaboración de productos cárnicos, dietéticos y otros, es el proceso más idóneo mediante el cual pueden incorporarse a corto plazo nuevas fuentes proteínicas de origen vegetal en la alimentación humana o animal.

JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas, en nuestro país se han orientado estudios a la obtención óptima de proteína a partir de vegetales.

Entre los procesos más utilizados se encuentra la extracción de proteínas mediante la precipitación isoelectrónica, que es un proceso relativamente simple y que requiere de sustancias, materiales y equipo de bajo costo

Por lo que, la elaboración de un aislado proteínico a partir de especies nativas del género *Lupinus* representa una alternativa regional muy importante para obtener un ingrediente con un alto contenido proteínico y libre de alcaloides que pueda utilizarse como un aditivo o suplemento alimenticio.

HIPÓTESIS

Mediante precipitación isoelectrica es factible obtener aislados proteicos libres de sustancias tóxicas a partir de leguminosas, para su utilización en la alimentación humana y/o animal a partir de *Lupinus exaltatus*.

OBJETIVO GENERAL

Obtener un aislado proteínico por precipitación isoelectrica con bajo contenido de alcaloides a partir de *Lupinus exaltatus* con adecuadas propiedades funcionales y nutritivas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Extraer la proteína de las semillas de *L. exaltatus* mediante precipitación isoelectrica.
- 2.- Analizar la composición químico proximal a las harinas de semillas enteras, semilla descascarada y desgrasada, y al aislado proteínico. de *Lupinus exaltatus*
- 3.- Determinar las propiedades funcionales del aislado proteínico: solubilidad de nitrógeno, absorción de agua y aceite, capacidad de formación y estabilidad de espuma, mínima concentración de gelificación, así como el rendimiento de recuperación de las proteínas.
- 4.- Cuantificar el aumento o disminución de aminoácidos en el aislado proteínico respecto a la harina desgrasada utilizada en su preparación.
- 5.- Evaluar la presencia de alcaloides totales por efecto de la elaboración del aislado proteínico.
- 6.- Cuantificar por cromatografía de gas-capilar la disminución de los principales alcaloides (lupanina y esparteina) en los diferentes procesos del aislado proteínico.

MATERIAL Y METODOS.

Este trabajo se realizó en las instalaciones del Departamento de Botánica y Zoología (CUCBA) y el Centro de Investigación de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional CEPROBI-IPN Yauhtepec, Morelos.

Colecta del Material Vegetal.

El estudio se llevó a cabo con semillas de *Lupinus exaltatus* Zucc. que fueron colectadas en las partes bajas del Nevado de Colima en el Estado de Jalisco durante el periodo Julio-Septiembre de 1997. Para esto, se colectaron plantas completas para su identificación taxonómica realizada por especialistas del herbario del Instituto de Botánica de Universidad de Guadalajara. Una vez confirmada la identificación de la especie, se colectaron vainas de *Lupinus exaltatus* en estado óptimo de fructificación.

Análisis Químico Proximal.

Semillas completas y sanas de *L. exaltatus*, se deshidrataron a $60^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ en una estufa de aire forzado durante 48 horas. Posteriormente, se molieron en un molino eléctrico-mecánico con una criba # 20 (1 mm de \varnothing) y se le practicó por triplicado un análisis químico proximal (Materia seca, Proteína cruda N X 6.25, Grasa cruda, Fibra cruda, Cenizas y ELN de acuerdo a las técnicas descritas por Tejada (1992) (41).

Descascarado de Semillas Enteras.

La remoción de la testa de las semillas, se realizó con la ayuda de una licuadora "Osterizer" a cuyas aspas se les quitó el filo para evitar el menor daño a las semillas. 20 g de semillas enteras se molieron por un minuto a baja velocidad y enseguida se separó la testa de la semilla en forma manual. La molienda de la semilla descascarada se llevó a un tamaño de partícula de 1 mm en un molino "Ciclotec". La harina resultante se desgrasó a reflujo con éter de petróleo durante 48 horas y se le practicó un análisis químico proximal.

Obtención del Aislado Proteico por Precipitación Isoeléctrica.

EL proceso de precipitación se llevó a cabo de la siguiente manera: 10 g de harina desgrasada se solubilizaron con 100 ml de agua destilada en una parrilla con agitación eléctrica. Enseguida la solución se ajustó a pH 9 con la adición de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N (grado alimenticio) para la solubilización de las proteínas por agitación durante 30 min a una temperatura de 35°C, evitando que se formara espuma en la solución. Después de agitado se centrifugó a 5,000 r.p.m. por 15 min. en una centrifuga Beckman Avanti J-25, el sobrenadante resultante se filtró en papel Wathman # 4 y se ajustó el pH a 4.6 con ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N para su centrifugación a 10,000 r.p.m. durante 10 min. El sobrenadante se eliminó y el sedimento se liofilizó en un equipo Labconco Freeze Dryer 18", el polvo obtenido se homogeneizó en un mortero (16). Una vez obtenido el aislado proteico se le determinó sus propiedades funcionales que fueron las siguientes:

Determinación de las Propiedades Funcionales del Aislado Proteínico.

a) Solubilidad de Nitrógeno

La solubilidad del nitrógeno en el aislado proteico se determinó por el método de King *et al* (1985) (16). Para ello se suspendieron 0.5 g de aislado en 10 ml de agua destilada, adicionando cantidades adecuadas de HCl o NaOH al 0.1 N para ajustar en forma sucesiva el pH a 2, 4, 6, 8 y 10. Estas suspensiones se mezclaron en un agitador magnético durante 30 min. a temperatura ambiente y los extractos se centrifugaron a 5,700 r.p.m. durante 15 min. La solubilidad se expresó como el por ciento de proteína cruda (Determinada por el método Kjeldhal $N \times 6.25$) presente en el sobrenadante correspondiente.

b) Absorción de Agua

La absorción de agua se determinó según el método reportado por Sathe *et al* (1982) (37). En un tubo para centrifuga se colocaron 0.5 g de aislado proteínico adicionándole 5 ml de agua destilada, enseguida se agitó en un vortex durante 1 min. dejándolo reposar por un periodo de 30 min. El producto resultante se centrifugó a

1,600 r.p.m. por 25 min. y se midió el volumen de agua libre al centrifugar las muestras. El análisis se realizó por triplicado. La cantidad de agua absorbida se calculó restando el volumen de agua libre al volumen inicial, que en este caso fue de 5 mL expresándose en mL de agua/g de proteína.

c) Absorción de Aceite

La absorción de aceite se evaluó siguiendo el método de Sathe *et al* (1982) (37). En un tubo de centrifuga se colocaron 0.5 g de aislado proteínico más 3 mL de aceite de maíz luego se agitó en un vortex por 1 min., dejándose reposar por un período de 30 min. Al final del reposo la mezcla se centrifugó a 1,600 r.p.m. por 25 min. midiendo finalmente el volumen de aceite que quedó libre. La cantidad de aceite absorbido se determinó por la diferencia de volumen inicial de aceite (3 mL) y la cantidad de aceite libre después de la centrifugación, como mL de aceite absorbidos/g de proteína. El análisis se realizó por triplicado.

d) Capacidad de Formación y Estabilidad de Espuma

Estos parámetros se determinaron por el método reportado por Ordorica (1988) (25). En una probeta de 500 mL se prepararon suspensiones de 100 mL al 1% de proteína y se ajustaron al pH deseado (2,4,6,8 y 10), utilizando HCl al 0.1 N y NaOH al 0.1 N. Una vez alcanzado el pH se midió el volumen. Esta suspensión se batió durante 1 min. con una batidora manual e inmediatamente después del batido se midió el volumen de espuma formada. La cantidad de espuma desarrollada en estas condiciones se expresó como la capacidad de formación de espuma en por ciento (% C.F.E.) y el cálculo se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ C.F.E.} = \frac{\text{Volumen total después de agitación} - \text{Volumen antes de agitación}}{\text{Volumen antes de agitarlo}} \times 100.$$

Después el material se dejó en reposo durante 30 min. y una vez transcurrido este tiempo se midió de nuevo el volumen de espuma residual. La estabilidad de la espuma se expresó en porcentaje, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ E.E.} = \frac{\text{Volumen de espuma después del reposo}}{\text{Volumen total de espuma}} \times 100$$

En todos los casos se reportó el promedio de tres repeticiones.

e) Mínima Concentración de Gelificación.

Este parámetro se determinó por el método de Sathe *et al* (1982) (37). Para ello se prepararon suspensiones al 6, 8, 10, 12, 14 y 16 % de proteína p/v en 5 mL de agua destilada; posteriormente se ajustó a pH 4.9 (punto isoelectrico) con NaOH al 0.1 N colocando las suspensiones ajustadas en tubos de ensayo con tapa. Enseguida se colocaron a baño maría en ebullición durante 1 hora, una vez transcurrido este período, se enfriaron rápidamente en hielo, y después se mantuvieron por 2 h a 4 °C. La verificación de formación de gel se realizó por inversión del tubo.

Determinación de Aminoácidos.

Para la determinación de los aminoácidos se llevó a cabo una hidrólisis ácida del aislado proteínico y de la harina desgrasada de *Lupinus exaltatus* de la siguiente forma:

Dos miligramos de proteína del aislado proteínico y/o de la harina desgrasada se colocaron en ampollitas de 3 ml de capacidad y se les adicionaron 1 mL de ácido clorhídrico 6 N a cada ampollita con burbujeo de nitrógeno; se sellaron y se sometieron a condiciones de hidrólisis $145\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante 4 h según la técnica de Lucas y Sotelo (1984) (20), posteriormente el hidrolizado se filtró y se le agregó 5 ml de norleucina (5 mM) como estándar interno, se evaporó en rotavapor a 75 °C a sequedad. Enseguida se recuperó con solución lavadora y se neutralizó con NaOH 5 N, se ajustó el pH a 6.8 ± 0.2 y se aforó a 25 ml. Antes de ser inyectado el hidrolizado se diluyó tomando 1 mL y añadiendo 1 mL del amortiguador de dilución (pH = 1.5), con esto los aminoácidos pasan a su forma catiónica. Posteriormente se filtró a través de un dispositivo Millipore (0.45 μL de \varnothing) descartando las primeras 5 gotas. Con una microjeringa se inyectan de 100 a 200 μl del hidrolizado en la columna de intercambio iónico del autoanalizador de aminoácidos.

El cálculo del contenido de aminoácidos del aislado proteínico y la harina desgrasada se realizó mediante el método de integración de área tomando como referencia un estándar preparado a partir de aminoácidos puros (5).

La determinación del triptofano se determinó colorimétricamente (30) de la siguiente forma.

Fundamento:

Debido a que la hidrólisis ácida destruye el triptofano, se realiza una hidrólisis alcalina o enzimática. En esta caso se realizó una hidrólisis enzimática con pancreatina y pepsina.

Procedimiento:

A 1.0 gr. de muestra del aislado proteínico y harina desgrasada de *L. exaltatus* se le adicionaron 10 mL de pepsina al 0.3%, y se incubó a 37 °C durante 3 h con agitación ocasional. Enseguida se le adicionaron 10 ml de pancreatina al 0.4%, que se incubó a 37 °C por 24 h con agitación ocasional. Al termino de la incubación se aforó a 50 mL y se filtró. A 3 alícuotas de 2 mL del filtrado se le adicionó 7.5 mL de HCl (blanco), mientras que a los otros dos se les adicionó 7.5 mL de p-dimetilbenzaldehido (DMBA). Posteriormente se agitaron y se dejaron reposar 15 min. en la oscuridad. Enseguida se agregó 0.5 mL de nitrito de sodio, se agitó y se dejó reposar por 15 min. en la oscuridad para el desarrollo de coloración.

Los tubos se leyeron a 590 nm, usando el tubo del blanco para ajustar a cero el espectrofotómetro. Se corrió una curva estándar de triptofano de 0 a 100 µg, con alícuotas de 0.0, 0.4, 0.8, 1.0, 1.6 y 2.0 mL de la solución estándar de triptofano y llevando a 2.0 ml con agua destilada.

Cálculos:

$$\text{g de triptofano/100 g de muestra} = \frac{t \times A \times 10}{a \times m \times \%P}$$

Donde:

t = µg de triptofano, obtenido por interpolación

A = aforo

a = alícuota

m = mg de muestra

% P = porcentaje de proteína en la muestra

Los resultados se reportaron como g de triptofano/100 g de proteína.

Cuantificación de Alcaloides Totales.

La determinación de alcaloides totales se realizó a la semilla cruda, semilla descascarada-desgrasada y al aislado proteico en forma cuantitativa por el método titulométrico según Gross (1982) (10) que consistió en lo siguiente.

Fundamento:

Los alcaloides se transforman en sus bases con la adición de hidróxido de potasio (KOH) para una extracción más rápida y completa, se utiliza además alumina (óxido de aluminio) por ser más adsorbente y de secado rápido; la extracción de los alcaloides se hace con cloroformo que posteriormente se separa del extracto alcaloideo. Como solución indicadora se utiliza el etil ester tetrabromofenoftaleina diluido en etanol y se titula con 0.001 N de ácido P- tolun sulfónico en cloroformo.

Procedimiento:

A 1.0 g de muestra finamente molida (criba #40) se le adicionó 1 mL de KOH al 15%, se homogeneiza la muestra y se le agregó 3 g de alumina, posteriormente se mezcló en un mortero hasta obtener un polvo seco blanquecino. Este polvo se filtra con la adición de 25 ml de cloroformo 3 veces, el filtrado se evaporó con un rotovapor a 30 °C y vacío. A 2.0 mL del extracto se le añadieron unas gotas del indicador etil-eter tetrabromofenoftaleina y se tituló con ácido P-tolun sulfónico al 0.001N. Con el volumen requerido para virar la solución de azul a amarillo se calculó el contenido de alcaloides de la muestra.

Asimismo se realizó la identificación y cuantificación de los alcaloides más tóxicos y mayoritarios, lupanina y esparteina, a la semilla cruda, semilla descascarada-desgrasada y al aislado proteico siguiendo la técnica de Muzquiz (1993) (24).

Fundamento:

El método cuantifica alcaloides individuales con estructura quinolizidínica por medio de cromatografía de gas-capilar. La extracción de los alcaloides se basa en la propiedad que presentan los alcaloides libres o basificados de no disolverse en agua, pero si en solventes orgánicos poco polares como el diclorometano, en cambio los alcaloides con carga son solubles en agua, pero insolubles en solventes apolares

Procedimiento:

Se pesaron 0.5 g de muestra finamente molida homogeneizada con 5 mL de ácido tricloroacético al 5%, por 1 min., enseguida se centrifugó por 5 min. a 3,000 rpm. El sobrenadante se recuperó en un embudo de separación, esta operación se repitió dos veces más (3 en total). El sobrenadante se alcalinizó con 1 mL de NaOH 10 M y el extracto alcaloideo se recuperó con 5 mL de diclorometano (3 veces), el cual es evaporado a sequedad con la ayuda de un rotovapor a 30 °C y vacío, y se recuperó con 5 mL de metanol (MeOH). Por último se añadieron 200 µL de cafeína como estándar interno, se filtró (Millipore 0.5 µm de Ø) e inyectó 1 µL al cromatógrafo de gases (Perkin-Elmer Autosystem, con columna capilar SPB-1 de 25 m. de longitud x 0.4 mm de Ø y detector de nitrógeno-fósforo).

Los alcaloides se cuantificaron utilizando la curva de calibración del alcaloide mayoritario en cada especie y como referencia al estándar interno. Para la identificación de los alcaloides se utilizaron estándares de iupanina y esparteina (donados por el Dr. Wink del Instituto de Biología Farmacéutica, Universidad de Heidelberg, Alemania).

RESULTADOS Y DISCUSION

Análisis Químico Proximal.

Los resultados del análisis químico proximal de la harina de semillas completas (HSC), mostraron un contenido de proteína (N x 6.25) de 36.97%. Este valor fue similar al reportado para *L. albus* (36.7%) pero inferior al de *L. luteus* (41.8%) y *L. mutabilis* (42.6%) (22,42). Por otra parte el valor de proteína cruda para la harina de semilla descascarada y desgrasada (HSDD) se incrementó en un 58% respecto a la HSC por la remoción de la testa y grasa de la semilla, cuyo valor fue de 52.78%. Mientras que el porcentaje de proteína del aislado proteínico (AP) correspondió a 95%, valor similar a los reportados para la mayoría de los aislados proteínicos preparados a partir de leguminosas (Cuadro 1). La ausencia de fibra cruda en la HSDD debido a la remoción mecánica de su testa confirma que los carbohidratos estructurales (paredes celulares) se encuentran en esta parte de la semilla y representan un 14.58%, valor similar a los encontrados en *L. angustifolius* y *L. luteus* con niveles de 15.0 y 16.5 respectivamente (22).

Cuadro 1. Análisis químico proximal (n = 3) de harinas y aislado proteínico de *Lupinus exaltatus*

	HSC ¹	HSDD ²	AP ³
Materia seca, %	91.91	90.35	93.48
Proteína(N x 6.25),%	36.97	52.78	95.00
Extracto etéreo, %	6.64	1.35	0.57
Fibra cruda, %	14.58	0.0	0.0
Ceniza, %	3.66	4.24	2.00
E.L.N., %	30.06	31.98	

¹Harina elaborada a partir de semilla completa

²Harina elaborada a partir de semilla descascarada y desgrasada

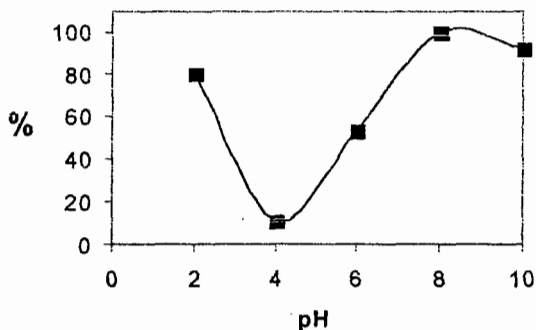
³Aislado proteínico

Propiedades Funcionales del Aislado Proteínico de *L. exaltatus*.

a) Solubilidad de Nitrógeno

La determinación de nitrógeno soluble en el AP determinado a valores de pH 2, 4, 6, 8 y 10 mostró que la mayor solubilidad ocurrió a valores de pH alejados del punto isoeléctrico (4.5) del AP (Figura 1). Las pruebas de solubilidad a pH 2, 8 y 10 mostraron los mayores porcentajes de solubilidad. El rango de solubilidad del nitrógeno del AP estuvo comprendido entre el 80 y 100% en soluciones con un pH menor o mayor al pH de extracción proteica (pH 9.0). En general la solubilidad proteínica más baja se observó a valores de pH 4.0 y 6.0 comportamiento esperado ya que las proteínas se precipitan a un punto isoeléctrico de pH 4.5 (16).

Figura 1. Solubilidad de N del aislado proteínico de *L. exaltatus*



b) Absorción de Agua y Aceite

Los resultados de absorción de agua y aceite son presentados en el Cuadro 2. La absorción de agua y aceite por el AP fue de 1.23 y 1.33 mL/g de proteína respectivamente. La capacidad de absorción de agua por el aislado proteínico fue similar a la reportada por Sathe *et al* (1982) (37), para un concentrado proteínico de *L. mutabilis* y más alto que el reportado para la harina de frijol (1 mL/g), pero más bajo que para la harina de soya (2.4 mL/g), concentrado de soya (3.6 mL/g), harina de girasol (1.8 mL/g), y concentrado proteínico de girasol (3.9 mL/g). La baja absorción de agua observada en AP de *L. exaltatus* puede ser debida a la presencia de grasa residual y a la baja disponibilidad de aminoácidos polares ya que estos últimos son responsables de los sitios primarios de interacción entre el agua y las proteínas (11). La absorción de aceite del AP de *L. exaltatus* (1.33 mL/g) fue también menor que para las albúminas (3.29 mL/g), globulinas (3.23 mL/g) y concentrado proteínico de frijol mungo (4.12 mL/g).

Cuadro 2. Capacidad de absorción de agua y aceite y mínima concentración de gelación (n=3) del aislado proteínico de *L. exaltatus*.

Propiedades	(mL/g de proteína)	CP ¹ (p/v)
Capacidad de absorción de agua	1.30	
Capacidad de absorción de aceite	1.23	
Mínima concentración de gelación		6.0

¹Concentración de proteína.

c) Propiedades Espumantes

Los resultados de la capacidad de formación y estabilidad de espuma a diferentes pH (2,4,6,8,10) después de 30 min. se muestran en el Cuadro 3.

La capacidad de formación de espuma y estabilidad a pH 4 fue nula mientras que a pH 2, 6, 8 y 10 estuvo comprendida de 300 a 625 y 280 a 635, respectivamente.

Cuadro 3. Capacidad de formación de espuma del aislado proteínico de *L. exaltatus* a diferentes valores de pH.

PH	Volumen/mL después del batido	Incremento de volumen (mL)	Volumen (mL) a 25 °C después de 0.5 h
2	725	625	635
4	120	20	0
6	415	315	280
8	515	415	390
10	720	620	590

d) Mínima concentración de gelificación

La mínima formación de gel se obtuvo en la suspensión del 6 % respecto a la concentración de proteína (Cuadro 2), valor similar al encontrado en los aislados proteicos de soya.

Aminoácidos.

La composición aminoacídica de HSDD y AP se muestra en los Cuadros 4 y 5. Se puede observar un claro efecto por el proceso de obtención del aislado proteico; en cuanto a los aminoácidos indispensables se observa un incremento de lisina (3.8 a 6.6 g/16 g de N), treonina (6.8 a 10.5 g/16g de N) e histidina (3.2 a 4.16 g/16 g de N) y una ligera disminución de isoleucina (del 14%), triptofano (10%) y valina (1.7%); sin embargo los aminoácido azufrados (metionina + cistina) y los aromáticos (fenilalanina +

tirosina) sufrieron un decremento considerable del 34 %.

La fracción aminoacídica del aislado proteico de *L. exaltatus* presenta un mayor contenido de lisina, valina e histidina que los reportados en aislados proteicos de soya y de *L. mutabilis* pero menor de aromáticos, isoleucina y triptofano (12,32). El contenido de histidina, valina y lisina en las globulinas de *L. angustifolius* es menor al del aislado proteico de *L. exaltatus*. La variación en la composición aminoacídica de extractos y aislados proteicos a partir de las mismas leguminosas se debe a diferencias interespecies y no a una modificación proteínica durante su elaboración (33).

Cuadro 4. Contenido de aminoácidos indispensables en harina de semilla desgrasada-descascarada (HSDD) y en aislados proteicos de *Lupinus exaltatus* (APLE) y de soya (SUPRO) (g aa/16 g de N)

Aminoácido	HSDD	APLE	% Recuperación	¹ SUPRO
Isoleucina	5.05	4.34	85.94	4.9
Leucina	10.17	7.21	70.89	8.2
Lisina	3.82	6.64	173.82	6.3
Metionina + Cisteina	2.77	1.85	66.0	2.6
Fenilalanina + Tirosina	11.17	7.3	65.4	9.0
Treonina	6.87	10.5	152.84	3.8
Triptofano	1.0	0.9	90.0	1.3
Valina	5.9	5.8	98.3	5.0
Histidina	3.2	4.16	130.0	2.6

¹ Hoogenkamp 1991. Vegetable protein

Cuadro 5. Contenido de aminoácidos no indispensables en semillas descascarada-desgrasada (HSDD) y en el aislado proteico (AP) de *Lupinus exaltatus* (g aa/16 g de N)

Aminoácido	HSDD	AP	% Recuperación
Ac. Aspártico	10.49	7.5	71.5
Ac. Glutámico	22.5	23.1	100.00
Alanina	2.1	2.0	95.24
Arginina	9.0	7.7	85.55
Prolina	4.72	2.9	61.44
Glycina	3.0	3.1	100.00
Serina	9.8	6.81	69.49

Al comparar los valores de aminoácidos del AP con el patrón de referencia de la FAO/OMS/UNU (1985) (8) se puede observar que cubre con todos los requerimientos de aminoácidos para adultos y en general para niños, a excepción del triptofano y de los azufrados (Cuadro 6).

Cuadro 6. Valores comparativos del contenido de aminoácidos del aislado proteínico de *L. exaltatus* (APLE) con el patrón de aminoácidos de la FAO/OMS/UNU (1985).

Aminoácidos (mg/16 g de nitrógeno)	Necesidades requeridas				
	Lactantes Media	Preescolares (2-5 años)	Edad escolar (10-12 años)	Adultos	APLE
Histidina	2.6	1.9	1.9	1.6	4.16
Isoleucina	4.6	2.8	2.8	1.3	4.34
Leucina	9.3	6.6	4.4	1.9	7.21
Lisina	6.6	5.8	4.4	1.6	6.64
Metionina + Cisteína	4.2	2.5	2.2	1.7	1.85
Fenilalanina + tirosina	7.2	6.3	2.2	1.9	7.3
Treonina	4.3	3.4	2.8	9.0	10.5
Triptófano	1.7	1.1	9.0	5.0	0.9
Valina	5.5	3.5	2.5	1.3	5.8
Total					
Incluyendo la histidina	46.0	33.9	24.1	12.7	48.7
sin incluir la histidina	43.4	32.0	22.2	11.1	44.54

BIBLIOTECA NACIONAL

La calificación química de la proteína revela que el aminoácido limitante en el AP es la metionina, al igual que en los reportados en los aislados de leguminosas, sin embargo la mayoría de los aminoácidos cubren los requerimientos de la FAO (Cuadro 7).

Cuadro 7. Calificación química de la proteína del aislado proteico de *Lupinus exaltatus*

Aminoácido	Aislado proteico	** Patrón FAO/OMS/UNU
Isoleucina	> 100	2.8
Leucina	> 100	6.6
Lisina	> 100	5.8
Metionina + cistina	* 74	2.5
Fenilalanina + tirosina	> 100	6.3
Triptofano	81.8	1.1
Valina	> 100	3.5
Histidina	> 100	1.9

Calificación química = $\frac{\text{g de aminoácidos en la muestra problema}}{\text{g de aminoácidos en la muestra patrón}} \times 100$

*Aminoácido limitante

** Patrón de FAO/OMS/UNU para niños de 2-5 años (1985). El patrón de preescolares es utilizado para calcular la calificación química debido a que este grupo de población tiene una mayor restricción de los requerimientos dados por la FAO/OMS/UNU.

Alcaloides.

En el Cuadro 8 se puede observar el porcentaje de alcaloides totales en semilla cruda, descascarada-desgrasada y en el AP de *L. exaltatus*, así como el contenido de lupanina y esparteina. El porcentaje de alcaloides totales en semilla cruda (1.8) resultó más bajo que los reportados por otros autores (9), esta variación puede ser debido a que las muestras analizadas provienen de otras localidades y años de colectas, ya que se ha descrito que existe una influencia ambiental sobre el contenido de alcaloides (Roberts y Wink 1998). Asimismo se puede observar en el aislado proteico una reducción del 99.0% de alcaloides con respecto a la semilla cruda, lo que significa una eliminación casi completa de los alcaloides totales, así como una reducción de lupanina y esparteina del 99.1 y 95.8% respectivamente, por lo que se obtiene un producto sin riesgo de toxicidad que puede ser utilizado sin problemas en productos de consumo humano.

Cuadro 8. Contenido de alcaloides totales, lupanina y esparteina en semilla cruda, semilla descascarada-desgrasada y en el aislado proteico de *L. exaltatus*

<i>L. exaltatus</i>	Alcaloides totales ¹	Lupanina ²	Esparteina ²
Semilla cruda	1.8	3.95	0.024
S. desgrasada y descascarada	1.5	3.34	0.024
Aislado Proteico	0.017	0.036	0.001
% de reducción en el aislado proteico	99.0	99.1	95.8

¹ g/100 g de muestra

² mg/g de muestra

CONCLUSIONES

1. La obtención del aislado proteico por precipitación isoeléctrica resulto adecuada para *L. exaltatus*, ya que se obtuvo un producto con alto contenido de proteína, superior al 90% y con un aceptable rendimiento.
2. Las propiedades funcionales del aislado proteico a partir de *L. exaltatus* resultaron de buena calidad como para ser utilizadas sobre todo en productos cárnicos y embutidos.
3. Aunque el proceso presentó la desventaja de la disminución de aminoácidos azufrados y aromáticos, por otra parte se obtuvieron incrementos en aminoácidos importantes como la lisina.
4. En general la calificación química de los aminoácidos reveló una buena calidad de la proteína del aislado proteico.
5. Una de las mayores ventajas del proceso es la significativa reducción de alcaloides totales del 99%, así como de lupanina y esparteina mayores al 95%.
6. Finalmente se concluye que el aislado proteico obtenido con lupinos silvestres es un producto con alto contenido proteico y de buena calidad, así como inocuo, que pudiera ser utilizado en la industria de los alimentos tanto para humanos como para animales.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Agosin E., Díaz D., Aravena R. y Yáñez E. 1989. Chemical and nutritional characterization of lupine tempeh J. Food Sci. 54:102-107
- 2.- Alamanou S., Bloukas J.G., Paneras E.D. y Doxastakis G. 1996. Influence of Protein Isolate from Lupin Seeds (*Lupinus albus* ssp. Graecus) on Processing and Quality Characteristics of Frankfurters. Meat Science. 42 (1): 79-93.
- 3.- Anónimo. 1979. Tropical legumes: resource for the future. Report of an ad hoc panel of the Advisory Committee on Technology Innovation. National Academy of Science. Washington, U.S.A. pag: 86-92.
- 4.- Badui D. S. 1993. Química de los alimentos. 3ra. Edición. Ed. Alhambra Mexicana. México D.F. pp: 123-209,557-558,615-637
- 5.- Benson J.V. Jr. y Patterson J.A. 1979. Chromatographic Advances in Amino Acid and Peptide Analysis using Spherical Resins and Their Applications in Biochemistry and Medicine. Chromatographic Advance with Spherical Resins. pag: 1-73.
- 6.- Chango A., Bau H.M., Villaume C., Mejean L. y Nicolas J.P. 1993. Effects de la fermentation par *Rhizopus oligosporus* sur la composition chimique des lupins blanc doux, jaune doux et jaune amer. Sciences des Aliments 13:285-295
- 7.- Cheftel J.C., Cuq J.L., Lorient D. 1989. Proteínas alimentarias. Bioquímica - Propiedades Funcionales-Valor Nutricional-Modificaciones Químicas. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pag: 49-105.
- 8.- FAO/OMS/UNU. 1985. Energy and protein requeriments. Report af a joint FAO/OMS/UNU consultation. World Health Organization Technical Report Science 724.
- 9.- García L. P. M., Muzquiz E. M, Ruiz L. M, Zamora N. F., Bañuelos P. J. y Ruiz M. J. 1998. Determinación de alcaloides en semillas de tres especies de *Lupinus* silvestres del estado de Jalisco, México. 7 Congreso Latinoamericano de Botánica y XIV Congreso Mexicano de Botánica. 18-24 de Octubre de 1998. México, D.F.
- 10- Gross R. 1982. El cultivo y utilización del Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). Estudio FAO: Producción y Protección vegetal. Roma. pag: 236.
- 11.- Hall G.M. 1996. In: Methods of testing protein functionality. Edited by: Hall G.M. Chapman and Hall. UK.

- 12-. Hoogenkamp H.W. 1991. Vegetable protein. Technology value in meat and poultry products. Ed. By: Protein Technologies International Inc. USA
- 13- INEGI. Anuario Estadístico del Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos. 1994. Importación en miles de nuevos pesos. Tomo I. INEGI.
- 14.- INEGI El Sector Alimenticio en México. Edición 1995. INEGI-CONAL
- 15-. Jambrina A.J.L. 1983. La genética de los alcaloides en el género *Lupinus*. Serie Producción Vegetal No. 51. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Madrid, España. pag: 12.
- 16- King J., Aguirre C. y de Pablo S. 1985. Functional Properties of Lupin Protein Isolates (*Lupinus albus* cv. Multolupa). Journal of Food Science. 50: 82-87.
- 17- Kolar C.W., Richert S.H., Decker C.D., Steinke F.H. y Vander Zanden R.J. 1985. New protein foods. Vol. 5. Seed storage proteins. Food Science and Technology. A series of monographs. pag: 259-299.
- 18- Larios T.B. y Padilla V.S. 1994. Análisis químico proximal y coeficiente de digestibilidad "In situ" de dos especies de leguminosas silvestres (*Lupinus* spp). Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Guadalajara. México.
- 19- López A.R.L. 1995. Determinación de las condiciones óptimas para obtención de Aislados Proteínicos de *Lupinus* sp por Micelinización y sus Propiedades funcionales. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Culiacán. México
- 20- Lucas, B. y Sotelo, A. 1984. Aminoacid determination in pure protein, foods and feeds using two different acid hidrolisis methods. Anal Biochem. 123: 349-356
- 21- Lucisano M., Pompei C. y Rossi M. 1984. Oil and alkaloidremoval from (*Lupinus termis*) by extraction with hexane. Lebens. Wiss. Tech. 17:324-327
- 22.- Mac Dowell L.R. 1974. Latin American Tables of feed Composition. University of Florida Gainesville, Fl. U.S.A.
- 23.- Malgarini, G. y Hudson, B.J. 1980. Valutazione delle caratteristiche chimiche ed alcuna propieta funzionali di prodotti derivatidal lupinos (*Lupinus albus*), Riv. Ital.Sost. Grasse., 57, 378
- 24.- Muzquiz M., Burbano C., Cuadrado C. y De La Cuadra C. 1993. Determinación de Factores Antinutritivos Termorresistentes en Leguminosas. I: Alcaloides. Ministerio de Agricultura, Pesca y alimentación. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Madrid, España. 8 (3): 351-361.

- 25- Ordorica C.A.F. 1988. Obtención de aislados proteicos por micelización y precipitación Isoelectrica a partir de pastas de Cártamo. Tesis Doctorado en Biotecnología en Plantas. CINVEAV IPN México.
- 26- Orero B.A. 1980. The *Lupinus* species and other grain legumes: a necessary strategy in order to counteract soy imports in Spain. In: Proceedings of the First International Lupine Workshop. Agricultural and Nutritional Aspects of lupines. Lima-Cuzco, Perú 12-21, April. Published by: Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit. German Agency For Technical Coopwration (GTZ). Federal Republic of Germany.
- 27.- Paredes L.O. 1986. La biotecnología de plantas: una herramienta estratégica en los programas agroalimentarios de México. Ciencia y desarrollo. 68: 26-46.
- 28.- Paredes L.O., Ordorica F.C., Guevara L.F. y Covarrubias A.M. 1982. Las Proteínas Vegetales: presente y Futuro en la Alimentación. Prospectiva de la Biotecnología en México. México D.F. pag 331-347.
- 29.- Potkansky A., Frankiewicz A., Krajna J. y Gulewicz K. 1993. Effect of application of partly debittered blue lupin seeds on rearing results of piglets. Lupin Newsletter 16: 13-17.
- 30.- Rama D.M.V. y Krishnan 1974. Colorimetric estimation of tryptophan content of pulses. Journal of Food Science and Technology. 11, 213-216.
- 31.- Roberts, M.F. y Wink, M. 1998. Alkaloids. Biochemistry, Ecology, y Medicinal Applications. Ed. Plenum Press, Inc. New York y London
- 32.- Rodríguez P.T., Aliaga T., Schoeneberger H. y Gross R. 1981. Establecimiento de las condiciones optimas a nivel de Laboratorio y de Planta Piloto para la preparación de un aislado proteínico de *Lupinus mutabilis*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 31 (4): 782-796.
- 33.- Rubio L.A., Grant G., Piotr W.O., Scisnowski, Brown D. Bardocz S. y Pusztai A. 1995. The utilization of Lupin (*Lupinus angustifolius*) and Faba Bean Globulins or Lactalbumin but the Nutritional Value of Lupin Seed Meal Is Lower only than That of Lactalbumin. J. Nutr. 125: 2145-2155.
- 34.- Ruiz L.M.A. 1994. Disponibilidad nutricional de tres especies silvestres de *Lupinus* (Leguminosae) del estado de Jalisco. Tesis de Maestria en Ciencias. Universidad de Guadalajara. México.
- 35.- Ruiz M.J.J. 1995. Composición química y determinación de alcaloides de tres especies silvestres de *Lupinus* (Leguminosae) del estado de Jalisco. Tesis de licenciatura. División de Ciencias Agronómicas. Universidad de Guadalajara. México.

- 36.- Santana F.M.C., Fialho A.M., Sa-Correia Y. y Empis J.M.A.1996. Towards microbial degradation of quinolizidine alkaloids in lupin processing. In: Proceedings of the Eighth International Lupin Conference. May 11-16, California, USA
- 37.- Sathe S.K., Deshpande S.S., y Salunkhe D.K. 1982. Functional Properties of Lupin Seed (*Lupinus mutabilis*) Proteins and Protein concentrates. Journal of Food Science. 47: 491-497.
- 38.- Sotelo L.A., Hernandez I.M. y Arteaga C.M.E. 1978. Inhibidores de tripsina y hemaglutininas en algunas leguminosas comestibles Archivos de Investigación Médica. México, D.F. 9 (1): 1-14.
- 39.- Sotelo A. 1981. Leguminosas silvestres, -Reserva- de proteínas para la alimentación del futuro. Información Científica y Tecnológica. 3 (54): 28-32.
- 40.- Sylvester B.R., Kipe N.J.A., Harris D.J. y Valencia C.A. 1987. Simbiosis Leguminosa-Rizobio: Evaluación, Selección y Manejo. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. Pag. 8-22.
- 41.- Tejada De H. I. 1992. Manual de Laboratorio para Análisis de Ingredientes Utilizados en la Alimentación Animal. Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México. A.C. México D.F. pag. 17-27.
- 42.- Vásquez M., Knapp E., Guzman E. y Zacarías I. 1989. Proteínas de lupino dulce (*Lupinus luteus*, var. Aurea/Weico y *Lupinus albus*, var. Multolupa). I. Extracción y Filtración por Sephadex. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 39 (2): 150-158.
- 43.- Whitaker J.R. y Tannenbaum S.R. 1977. Food proteins. Ed. Avi Publishing Company, Inc. United States of America. pag. 542-570.
- 44.- Wink, M. 1993. Phytochemistry and Agriculture. Ed. Clarendon Press. Oxford Science Publication. London