

Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey
Campus Monterrey

Escuela de Ingeniería y Ciencias



Efecto de agentes reductores y/o procesamiento térmico sobre la actividad
de inhibidor de tripsina y solubilidad de concentrados proteicos de soya o
garbanzo

Tesis presentada por

Sara Avilés Gaxiola

Sometida a la

Escuela de Ingeniería y Ciencias

como un requisito parcial para obtener el grado académico de

Maestro en Ciencias

con Especialidad en Biotecnología

Monterrey Nuevo León, 04 de diciembre de 2017

Dedicatoria

Dedico este trabajo a Dios, por siempre guiarme por los caminos que debo seguir.

A mis padres Eugenia y Juan Salvador, por su apoyo y amor incondicional.

A mis hermanas Alejandra y Eugenia, por ser mis compañeras y mejores amigas.

A mis dos ángeles en el cielo, mi tío Adrián y mi mamá Gloria, mi mayor ejemplo de fortaleza.

A Rosendo, por su motivación, paciencia y amor.

“Porque Jehová da la sabiduría,
y de su boca viene el conocimiento y la inteligencia.”

Proverbios 2:6

Reconocimientos

Quisiera expresar mi reconocimiento y agradecimiento para todos aquellos que de alguna manera u otra, me apoyaron para culminar con éxito esta etapa de mi formación profesional.

Primeramente, gracias a Dios, por todas las oportunidades, por la fortaleza y la sabiduría.

A mis padres Eugenia y Juan Salvador, por dedicar su vida a educarme de la mejor manera y hacer de mi una persona de bien. Además, por brindarme los recursos necesarios y por manifestar apoyo y comprensión en todo momento.

A mis hermanas Alejandra y Eugenia, a Rosendo y a todas mis amigas por su comprensión, apoyo, cariño y por hacer siempre los tiempos difíciles, más fáciles.

A la Doctora Cristina Chuck Hernández, mi asesora de tesis, por que sin su conocimiento, orientación, consejos y sobre todo paciencia, nada de esto hubiera sido posible. Por siempre mostrar interés en que los diferentes productos de este trabajo de investigación salieran lo mejor posible y por haber estado tan involucrada en mi desarrollo académico durante todo este periodo.

A mis sinodales, Dr. Sergio Román Othón Serna Saldívar y Dr. Jorge Alejandro Benavides Lozano, por el tiempo dedicado para hacer las observaciones y comentarios necesarios que permitieron mejorar este trabajo de investigación.

Al Tecnológico de Monterrey por la beca académica y al CONACYT por el apoyo financiero brindado (CVU: 738500), al grupo de enfoque Nutriomics por el apoyo económico durante este trabajo de investigación, así como al Centro del Agua para América Latina y el Caribe (CAALCA), por las facilidades prestadas.

A mis profesores de posgrado por compartir su conocimiento con pasión y compromiso y finalmente a mis compañeros por enriquecer esta experiencia también a nivel personal.

¡Muchas gracias a todos!

Efecto de agentes reductores y/o procesamiento térmico sobre la actividad de inhibidor de tripsina y solubilidad de concentrados proteicos de soya o garbanzo

Por

Sara Avilés Gaxiola

Resumen

Se evaluó el efecto de dos agentes reductores (metabisulfito de sodio o L-cisteína) y/o tratamiento térmico (80 o 121°C) en la Actividad de Inhibidor de Tripsina (AIT) de soja y garbanzo. Las materias primas se caracterizaron desde el punto de vista fisicoquímico y además se determinó la actividad y peso molecular de los inhibidores de tripsina (ITs). En el análisis proximal se determinó que el mayor porcentaje en peso de la soja fue proteína, mientras que en garbanzo fueron los carbohidratos. Se identificó en soja un IT característico (≈ 20 kDa), mientras que en garbanzo se determinaron dos bandas electroforéticas con actividad de inhibidor no reportadas antes en la literatura (≈ 25 y 37 kDa). Al ejecutar los tratamientos de agentes reductores y temperatura, el más efectivo en soja fue la combinación de metabisulfito de sodio + 80°C, mientras que en garbanzo fue L-cisteína sin tratamiento térmico. Se lograron inactivaciones de 99.42 y 74.53 % respectivamente. Posterior a los tratamientos se evaluó la funcionalidad proteica de ambas materias primas. Se encontró que en soja, la solubilidad de agua se redujo en 44.24% mientras que la absorción de agua aumentó casi 4 veces respecto al control. Por otro lado, las propiedades de solubilidad e interacción con agua en garbanzo no se vieron afectadas de manera significativa. Respecto a la digestibilidad *in vitro*, se observó un ligero aumento en ambos materiales, sin embargo, no fue estadísticamente significativo ($\sim 1\%$). Tras los tratamientos de inactivación, se determinó que en garbanzo la estructura proteica secundaria no se modificó, mientras que en soja aumentó el porcentaje de β -plegada, bucles, α -hélice y cadenas no ordenadas mientras que las estructuras agregadas se redujeron en 9%. Se obtuvo también el perfil electroforético de los concentrados proteicos tratados para inactivar IT y de la mano de los resultados anteriores, se observó que garbanzo presentó el mismo patrón de bandas con respecto a su control, mientras que la soja mostró una disminución de especies de bajo peso molecular y un incremento de las bandas por encima de 150 KDa. Al analizar los cambios a una mayor escala, la microestructura de los concentrados de soja o garbanzo no se vio afectada, mientras que las propiedades de flujo y la actividad de agua (a_w) sí cambiaron de forma significativa. En conclusión, el mejor tratamiento para inactivar IT de leguminosas dependerá de la estructura propia de este factor anti nutricional. En el caso de garbanzo el uso de L-cisteína fue el más eficiente reduciendo la AIT, lo cual fue adecuado para mantener intactas las propiedades funcionales, la estructura secundaria y el perfil electroforético de las proteínas. En soja, el tratamiento térmico (80°C) combinado con metabisulfito de sodio tuvo el mayor efecto de inactivación de IT, sin embargo, esto cambió la estructura de las proteínas, su funcionalidad y en menor medida su perfil electroforético.

Lista de Figuras

Figura 2.1. Proyección del consumo de leguminosas en el mundo. Adaptada de Akibode & Maredia (2012).	5
Figura 2.2. a) Fuentes de proteína alimentarias en el mundo. Adaptada de Boland (2013); b) Fuentes de proteína alimentarias en India. Adaptada de Boari <i>et al.</i> (2014).	6
Figura 2.3. Distribución de la producción de soya en México. Adaptada de SAGARPA (2016)..	8
Figura 2.4. Producción de garbanzo por estado en México. Adaptada de CIEP (2013).	9
Figura 2.5. Estructura del inhibidor de tripsina tipo Kunitz de soya (Song & Suh, 1998).	14
Figura 2.6. Representación del inhibidor de tripsina Bowman-Birk de soya (Voss <i>et al.</i> , 1996). 15	
Figura 2.7. Métodos de inactivación de inhibidores de tripsina (ITs) en leguminosas. Adaptada de Avilés-Gaxiola <i>et al.</i> (2017).	18
Figura 3.1. Proceso de producción de harina de garbanzo decortinado desgrasada: a) remojo de semillas de garbanzo Blanco Sinaloa y decortinado manual; b) secado; c) producción de harina; d) desgrasado con hexano.	28
Figura 3.2. Equipo NANO-flex microtrac utilizado para determinar el tamaño de partícula de la materia prima.	31
Figura 3.3. Proceso de diálisis de concentrados proteicos.	32
Figura 3.4. Diagrama de flujo: método Biuret para determinación de proteína. BSA: <i>Bovine Serum Albumin</i>	32
Figura 3.5. Diagrama de flujo para la determinación de la AIT de acuerdo a los protocolos de Schwert & Takenaka (1955) y Dabhade <i>et al.</i> (2016).	33
Figura 3.6. Equipo de diafiltración de extractos selectivos de soya o garbanzo (Sartoflow Slice 200 Benchtop).	36
Figura 3.7. Diagrama del proceso de diafiltración utilizando el equipo <i>Sartoflow Slice 200 Benchtop</i>	36
Figura 3.8. Diagrama del proceso de electroforesis por tinción de plata de acuerdo a Chevallet <i>et al.</i> (2006).	38
Figura 3.9. Protocolo de zimografía reversa que siguió a la electroforesis. Desarrollado por Hanspal <i>et al.</i> (1982) y Le & Katunuma (2003).	40
Figura 3.10. Proceso de producción de concentrados proteicos por precipitación isoelectrica a partir de harina de soya o garbanzo.	42
Figura 3.11. Secador por aspersion ADL311S.	43
Figura 3.12. Protocolo de determinación de ISA e IAA.	44

Figura 3.13. Protocolo de determinación de ISN.	45
Figura 3.14. Protocolo para determinar IVPD.	46
Figura 3.15. a) Muestras adheridas a cinta de carbono; b) Equipo para recubrir con oro las muestras analizadas por SEM; c) Microscopio de Barrido Electrónico (SEM).....	48
Figura 4.1. Composición fisicoquímica (%) de fracciones anatómicas de garbanzo Blanco Sinaloa, así como del grano entero.....	51
Figura 4.2. Distribución del tamaño de partículas de soluciones de: a) harina de soya y b) garbanzo.	52
Figura 4.3. Perfil electroforético (SDS PAGE, acrilamida 15%, tinción coomassie) de garbanzo Blanco Sinaloa (GBS) y soya (purificados por diálisis).	53
Figura 4.4. Perfil electroforético (SDS PAGE, acrilamida 15%, tinción coomassie) de diferentes variedades de garbanzo tipo Desi (L, K, J, H, G y F) (purificados por diálisis).	55
Figura 4.5. Actividad de inhibidor de tripsina (U/mg) de harina de soya, garbanzo Blanco Sinaloa (GBS) y otras variedades de garbanzo (F, G, H, J, K y L). Estas últimas, a diferencia de GBS fueron tipo Desi.	56
Figura 4.6. Perfil electroforético (SDS PAGE, acrilamida 15%, tinción coomassie) de extractos selectivos de inhibidores de garbanzo Blanco Sinaloa (GBS) y soya utilizando PVP 1% (purificados por ultrafiltración).	58
Figura 4.7. Perfil electroforético (SDS PAGE, Tricina 10%, tinción plata) de extractos selectivos de inhibidores de garbanzo Blanco Sinaloa (GBS) y soya utilizando PVP 1%, previamente purificados por ultrafiltración.	58
Figura 4.8. Zimograma reverso con tripsina en condiciones no desnaturizante (SDS PAGE, 18%, caseína, tinción coomassie).	59
Figura 4.9. Zimograma reverso con tripsina en condiciones no desnaturizante (SDS PAGE, 18%, caseína, tinción <i>Amido Black</i>).	60
Figura 4.10. Actividad de inhibidor de tripsina (AIT) en fracciones anatómicas de garbanzo utilizando el protocolo desarrollado por Schwertz & Takenaka (1995) & Dabhade <i>et al.</i> (2016).	62
Figura 4.11. Actividad de Inhibidor de Tripsina (AIT, u/mg) de harina de soya sin tratar (control) y tratada: 1) 80°C, 2) L-cisteína, 3) metabisulfito de sodio, 4) L-cisteína + 80°C y 5) metabisulfito de sodio + 80°C.....	63
Figura 4.12. Actividad de Inhibidor de Tripsina (AIT, U/mg) de harina de garbanzo sin tratar (control) y tratada: 1) 121°C, 2) L-cisteína, 3) metabisulfito de sodio, 4) L-cisteína + 121°C y 5) metabisulfito de sodio + 121°C.....	65

Figura 4.13. Almidón gelatinizado después del tratamiento térmico a 121°C aplicado en harina de garbanzo.	70
Figura 4.14. Partículas de concentrado proteico de garbanzo adheridas a la cámara del secador cuando el extracto proteico se asperjó con una boquilla de 2.7mm de diámetro.	71
Figura 4.15. Actividad de inhibidor de tripsina de concentrado proteico de soya (CPS) y concentrado proteico de garbanzo (CPG) antes y después de su tratamiento de inactivación más efectivo (para CPS: meta-bisulfito de sodio + 80°C; para CPG: L-cisteína).	72
Figura 4.16. Perfil electroforético (SDS PAGE, acrilamida 15%, tinción coomassie) en condiciones no desnaturalizantes de los concentrados proteicos de soya y garbanzo controles (CPSC y CPGC) y tratamientos (CPST y CPGT).....	80
Figura 4.17. Micrografía de microscopía electrónica de barrido de los concentrados proteicos de soya: a.b. Control y c.d. tratados (Metabisulfito de sodio +80°C). Figuras del lado izquierdo x1000 y figuras del lado derecho x1500.	83
Figura 4.18. Micrografía de microscopía electrónica de barrido de los concentrados proteicos de garbanzo: a.b. Control y c.d. tratados (L-cisteína). Figuras del lado izquierdo x1000 y figuras del lado derecho x1500.	84
Figura 4.19. Actividad de agua de concentrado proteico de soya (CPS) y concentrado proteico de garbanzo (CPG) antes y después de su tratamiento de inactivación más efectivo (para CPS: meta-bisulfito de sodio + 80°C; para CPG: L-cisteína).....	85
Figura 4.20. Densidad bulto de concentrado proteico de soya (CPS) y concentrado proteico de garbanzo (CPG) antes y después de su tratamiento de inactivación más efectivo (para CPS: meta-bisulfito de sodio + 80°C; para CPG: L-cisteína).....	87
Figura 4.21. Densidad compactada de concentrado proteico de soya (CPS) y concentrado proteico de garbanzo (CPG) antes y después de su tratamiento de inactivación más efectivo (para CPS: metabisulfito de sodio + 80°C; para CPG: L-cisteína).	88
Figura 4.22. Cociente de Hausner de concentrado proteico de soya (CPS) y concentrado proteico de garbanzo (CPG) antes y después de su tratamiento de inactivación más efectivo (para CPS: meta-bisulfito de sodio + 80°C; para CPG: L-cisteína).....	89

Lista de Tablas

Tabla 2.1. Precio y contenido de proteína de distintas fuentes de proteína en la dieta humana. ¹	6
Tabla 2.2. Factores anti nutrimentales (FANs) asociados a leguminosas y sus efectos a la salud humana.	11
Tabla 2.3. Actividad de inhibidores de tripsina (AIT, U/mg) de algunas leguminosas.	13
Tabla 2.4. Clasificación de las proteínas de acuerdo a su solubilidad.	25
Tabla 3.1. Fórmula para preparación de geles de acrilamida al 18% SDS-PAGE con caseína copolimerizada.	39
Tabla 4.1. Composición fisicoquímica de harina de soya usada como materia prima. ¹	50
Tabla 4.2. Rendimiento de las diferentes etapas de producción de concentrados proteicos de soya y garbanzo (control y tratados, el primero con metabisulfito + 80°C y el segundo con L-cisteína).	68
Tabla 4.3. Índices de solubilidad de agua y nitrógeno (ISA, ISN), de absorción de agua (IAA) y digestibilidad <i>in vitro</i> de proteína (IVPD) de concentrados proteicos de soya (CPS) y garbanzo (CPG) ¹	74
Tabla 4.4. Porcentajes de estructuras secundarias presentes en los concentrados proteicos de garbanzo y soya (controles y tratamientos), obtenidos a partir de la región amida I.	78
Tabla 4.5. Porcentaje de cumplimiento del requerimiento diario de la FAO (niños de 1-2 años) de concentrados proteicos de soya y garbanzo (controles y tratamientos).	81
Tabla 0.1. Abreviatura de unidades.	110

Contenido

Resumen	vii
Capítulo 1. Introducción	1
1.1. Hipótesis	4
1.2. Objetivos	4
1.2.1. Objetivo general	4
1.2.2. Objetivos Específicos	4
Capítulo 2. Marco Teórico	5
2.1. Proteínas vegetales.	5
2.2 Soya (<i>Glycine max</i>) y garbanzo (<i>Cicer arietinum</i>)	7
2.3. Propiedades nutricionales de soya y garbanzo.	9
2.4. Factores antinutrimientales en leguminosas	10
2.5. Efectos adversos de los inhibidores de tripsina (IT)	12
2.6. Características de inhibidores de tripsina de leguminosas.....	13
2.7. Análisis de inhibidores de tripsina de leguminosas	16
2.8. Métodos de inactivación de IT de leguminosas.	17
2.8.1. Métodos tradicionales para la inactivación de IT de leguminosas (procesamiento térmico).	18
2.8.2. Otros métodos físicos	19
2.8.4 Métodos químicos	21
2.9 Propiedades funcionales y digestibilidad <i>in vitro</i> de las proteínas.....	23
2.10 Importancia de la solubilidad de las proteínas en agua.....	27
Capítulo 3. Materiales y Métodos	28
3.1. Materias primas	28
3.2. Caracterización de materias primas	29
3.2.1. Análisis proximal	29

3.2.2. Distribución del tamaño de partícula	30
3.2.3. Perfil electroforético de la materia prima	31
3.2.4. Actividad de inhibidor de tripsina (AIT)	33
3.2.5. Determinación del peso molecular de los inhibidores de tripsina de soya o garbanzo.	35
3.2.5.1. Extracción selectiva de inhibidores de tripsina de soya o garbanzo con Polivinilpirrolidona (PVP)	35
3.2.5.2. Perfil electroforético de los extractos selectivos de inhibidores de tripsina.	35
3.2.5.3. Determinación de fracciones con actividad de inhibidor de tripsina mediante zimografía reversa.	38
3.3. Inactivación de inhibidores de tripsina de harina de soya o garbanzo con tratamiento térmico.	40
3.4. Inactivación de inhibidores de tripsina de harina de soya o garbanzo con agentes reductores.	41
3.5. Inactivación de inhibidores de tripsina de harina de soya o garbanzo con tratamiento térmico y agentes reductores	41
3.6. Obtención de concentrados proteicos de harina de soya o garbanzo tratada y sin tratar.	41
3.6.1. Extracción de aislados proteicos de soya o garbanzo por el método de punto isoeléctrico	41
3.6.2. Secado de concentrados proteicos de soya o garbanzo	43
3.7. Caracterización de concentrados proteicos de soya (CPS) o garbanzo (CPG) tratados y sin tratar.	43
3.7.1. Actividad de inhibidor de tripsina de CPS y CPG.	43
3.7.2. Caracterización funcional y digestibilidad <i>in vitro</i> de CPS y CPG.....	44
3.7.2.1. ISA e IAA	44
3.7.2.2. ISN.....	44
3.7.2.3. Digestibilidad <i>in vitro</i> de la proteína (IVPD).....	45
3.7.3 Perfil de aminoácidos de CPS y CPG	46
3.7.4. Estudio de la estructura secundaria de CPS y CPG por.....	46
FTIR	46

3.7.5. Perfil electroforético de CPS y CPG	47
3.7.6. Microscopía de Barrido Electrónico (SEM) para evaluación de microestructura de CPS y CPG.....	47
3.7.7. Determinación actividad de agua (Aw) y propiedades de flujo de CPS y CPG.	48
3.7.7.1. Actividad de agua (Aw).....	48
3.7.7.2. Densidad de bulto.....	48
3.7.7.3. Densidad compactada	49
3.7.7.4. Índice de Hausner o de fluidez	49
3.8. Análisis estadístico	49
Capítulo 4. Resultados y Discusión.....	50
4.1. Características de materia prima	50
4.1.1. Análisis proximal	50
4.1.2. Distribución del tamaño de partícula de harina de soya o garbanzo	52
4.1.3. Perfil electroforético de soya y diferentes variedades de garbanzo.....	53
4.1.4. Actividad de inhibidor de tripsina (AIT) de soya y diferentes variedades de garbanzo	56
4.1.5. Peso molecular de ITs de soya o garbanzo	57
4.1.5.1. Perfil electroforético de extractos selectivos de soya o garbanzo.....	57
4.1.5.2. Zimografía reversa en extractos de soya o garbanzo	59
4.2. Estudio del método para determinación de AIT.....	61
4.3. Efecto de agentes reductores (L-cisteína o metabisulfito de sodio) y/o procesamiento térmico sobre la AIT de harina de soya y garbanzo	62
4.3.1. Efecto de agentes reductores y/o procesamiento térmico sobre la AIT de harina de soya.....	62
4.3.2. Efecto de agentes reductores y/o procesamiento térmico sobre la AIT de harina de garbanzo	65
4.3.3. Selección de los tratamientos de inactivación más efectivos en harina de soya o garbanzo	67
4.4. Rendimiento del proceso de extracción proteica a partir de harina de soya y garbanzo por precipitación isoeléctrica.....	67

4.5. Características de concentrados proteicos de soya y garbanzo tratados con agentes reductores (L-cisteína o metabisulfito de sodio) y/o procesamiento térmico.....	72
4.5.1. Actividad de inhibidor de tripsina de Concentrados de Soya y Garbanzo (CPS y CPG)	72
4.5.2. Propiedades funcionales y digestibilidad <i>in vitro</i> de CPS y CPG.....	73
4.5.3. Estructura secundaria de concentrados proteicos de soya y garbanzo (CPS y CPG).	77
4.5.4. Perfil electroforético de CPS y CPG	79
4.5.5. Perfil de aminoácidos de concentrado de proteína de soya y garbanzo (CPS y CPG).	81
4.5.6. Microestructura de Concentrados de Proteína de Soya y Garbanzo (CPS y CPG) .	82
4.5.7. Propiedades de flujo y actividad de agua de Concentrados de Proteína de Soya y Garbanzo (CPS y CPG).	84
4.5.7.1. Actividad de agua	85
4.5.7.2. Densidad de bulto o cruda.....	87
4.5.7.3. Densidad compactada.....	88
4.5.7.4 Índice de Hausner o de fluidez	89
Capítulo 5. Conclusiones y Recomendaciones.....	91
5.1. Conclusiones	91
5.2. Recomendaciones	93
Bibliografía	94
Apéndice A	110
Artículos y ponencias	111
Artículo de divulgación publicado en Énfasis Alimentación.....	111
Artículo de revisión aceptado para publicación en Journal of Food Science	114
Artículo científico a someter	¡Error! Marcador no definido.
Ponencia en Congreso Internacional.....	148
Currículim Vítae.....	149

Capítulo 1. Introducción

Las leguminosas se encuentran entre los primeros productos alimenticios que fueron cultivados por el hombre hace aproximadamente 3000 años. En esta familia se incluyen 650 géneros y más de 18 000 especies, sembradas en 180 millones de hectáreas a lo largo del mundo (12 a 15% de la superficie disponible para agricultura, Meena *et al.*, 2015). La importancia de las leguminosas reside en su valor nutricional ya que proporciona cantidades significativas de carbohidratos (30 a 40%), fibra (8 a 28%), grasa (5 a 47%) y proteína (17 a 54%) a consumidores alrededor del mundo y sirven además como materia prima en la producción de aceites, *snacks*, harinas, aislados y concentrados proteicos.

La leguminosa con mayor producción a nivel mundial es la soya (*Glycine max*), uno de los cultivos más importantes y cuya demanda sigue creciendo dado el interés en su elevado porcentaje de proteína (alrededor del 36%). De hecho, esta materia prima se ha convertido ya en la fuente de proteína más importante del siglo XXI y su producción es dominada por 4 países: Estados Unidos de América (EUA), Brasil, Argentina y China.

Otra leguminosa de importancia mundial es el garbanzo (*Cicer arietinum L.*). La mayor parte de su producción y consumo (95%) toma lugar en países en vías de desarrollo, siendo India el productor más importante seguido de Pakistán, Turquía y México. En este último país, el garbanzo es la segunda leguminosa más producida después del frijol ambas con un contenido proteico de alrededor del 22.5% con concentraciones destacadas de lisina, arginina, potasio, fósforo, hierro, magnesio, así como vitaminas del complejo B. El garbanzo es también una buena fuente de antioxidantes y polifenoles, capaces de prevenir o tratar problemas de salud crónicos como diabetes, enfermedades cardiovasculares y obesidad (Basset *et al.*, 2010; El-Adawy, 2002).

En general, proteínas de origen vegetal como la de soya y garbanzo, representan el 65% de la ingesta de proteína en la dieta humana y se prevé que para 2050 la demanda se duplique debido la expectativa de crecimiento poblacional. Aunado a este aumento de habitantes, actualmente ya dos mil millones de personas alrededor del mundo tienen un deficiente de consumo proteico, por lo que el reto para prevenir la malnutrición y el hambre será aún mayor conforme pase el tiempo (Hoffman & Falvo, 2004).

Debido a este panorama, se espera que las proteínas vegetales sigan aportando un porcentaje elevado de calorías sobre todo porque son más económicas y sustentables con respecto a la de origen animal. A pesar de estas ventajas, el reto más importante para su uso es

la presencia de compuestos antinutrimientales, los cuales interrumpen o trastornan los procesos de digestión, principalmente cuando las semillas se consumen crudas o después de un cocimiento deficiente.

Entre los compuestos antinutrimientales de las leguminosas, destacan taninos, ácido fítico, saponinas, flavonoides, alcaloides, oxalatos, lectinas e inhibidores de tripsina (ITs) (Soetan & Oyewole, 2007). Los ITs son catalogados como proteasas de serina y por su tamaño, se clasifican en tipo Kunitz (20 kDa de peso molecular aproximado) y tipo Bowman-Birk (aproximadamente de 8 kDa). Estas moléculas reducen la absorción y digestión de las proteínas ingeridas al inhibir fuertemente a la tripsina y quimiotripsina en el intestino. Esta inhibición promueve un incremento en la producción enzimática, resultando en efectos adversos como daños a riñón y páncreas, retención de nitrógeno y retraso en el crecimiento, entre otros (Mondor *et al.*, 2009). Esta es la razón por la cual se recomienda que cualquier producto que contenga leguminosas en su formulación sea procesado de tal forma que el IT se encuentre inactivado (FAO, 2011).

Los tratamientos más utilizados para la inactivación de ITs son los térmicos, ya que además de reducir casi por completo la actividad de estos factores antinutrimientales, están estandarizados y su aplicación tanto a escala industrial como en el hogar se ha vuelto sencilla. El uso de tratamientos térmicos representa por supuesto un gasto energético y afecta de manera significativa las propiedades funcionales de los componentes de los alimentos, sobre todo los asociados a la solubilidad proteica (que puede verse reducida hasta en un 75%). Esta pérdida de solubilidad se atribuye a la formación de agregados proteicos (Ma *et al.*, 2011). Las harinas, concentrados y aislados tratados térmicamente, tienen entonces una aplicación limitada en alimentos, ya que su capacidad de interactuar con agua se ve reducida de forma importante.

Para superar las desventajas del tratamiento térmico, han surgido nuevos métodos de procesamiento que mejoran la calidad nutricional de las leguminosas, entre ellos el uso de agentes reductores, que a pesar de ser de los más prometedores, aún no ha sido tan estudiado en semillas diferentes a la soya y con limitada exploración de agentes reductores. El principio de acción de agentes reductores se basa en la reducción de enlaces disulfuro, importante base estructural de los ITs. Las principales ventajas del uso de estos compuestos químicos es que representan tanto un método que no requiere energía como una técnica de inactivación selectiva, ya que se sabe que de manera aproximada, únicamente el 5% de la estructura de las proteínas de las leguminosas, dependen de enlaces disulfuro (Tetenbaum & Miller, 2001). Al usar esta estrategia selectiva se esperaría que propiedades funcionales como la solubilidad, no se vieran afectadas. Entre los pocos estudios reportados del uso de agentes reductores en leguminosas

destacan dos en soya: 1) metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) con calor y 2) tris (2-carbozimetil) fosfina. Ambos estudios analizaron el efecto sobre ITs de soya y lograron inactivaciones mayores a 90%. Sin embargo, no se ha analizado el efecto que estos compuestos químicos tiene en las características de la proteína ni en la viabilidad de su consumo, sobre todo porque el tris (2-carbozimetil) fosfina ha sido reportado como agente cancerígeno (Friedman & Gumbmann, 1986; Tetenbaum & Miller, 2011). Dado que la estrategia de utilizar agentes reductores para inactivar inhibidor de tripsina se ha enfocado al IT de soya y en un par de compuestos, se vuelve de interés tanto evaluar el efecto en otras leguminosas como la búsqueda de nuevos agentes reductores, principalmente aquellos ya usados en la industria de alimentos.

El objetivo de este trabajo fue entonces evaluar el efecto de agentes reductores permitidos y ampliamente utilizados en la industria de alimentos (L-cisteína y metabisulfito de sodio), sobre la actividad de ITs en soya y garbanzo, así como su efecto en las características funcionales y estructurales de su fracción proteica (solubilidad, estructura secundaria, digestibilidad *in vitro* y microestructura de los respectivos concentrados).

1.1. Hipótesis

El uso de agentes reductores (L-cisteína o metabisulfito de sodio), disminuye la actividad de inhibidor de tripsina en soya o garbanzo, sin afectar las funcionalidades de la fracción proteica, principalmente la solubilidad.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de agentes reductores en conjunto con el tratamiento térmico tradicional, en la actividad de inhibidor de tripsina, así como en la solubilidad proteica de soya o garbanzo.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar proximalmente la harina de soya y garbanzo.
- Determinar el perfil electroforético de soya y garbanzo.
- Determinar el peso molecular de los inhibidores de tripsina de soya y garbanzo.
- Evaluar el efecto de agentes reductores (L-cisteína o metabisulfito de sodio) sobre la actividad de inhibidor de tripsina de soya o garbanzo.
- Evaluar el efecto del procesamiento térmico sobre la actividad de inhibidor de tripsina de soya y garbanzo.
- Evaluar el efecto de la combinación del uso de agentes reductores y procesamiento térmico sobre la actividad de inhibidor de tripsina de soya y garbanzo.
- Determinar el mejor tratamiento de inactivación de inhibidor de tripsina en soya y garbanzo respectivamente.
- Evaluar el efecto de los mejores tratamientos sobre la extracción, solubilidad, digestibilidad, perfil electroforético, microestructura y estructura secundaria de proteína de soya o garbanzo.

Capítulo 2. Marco Teórico

2.1. Proteínas vegetales.

La población en el mundo se ha cuadruplicado en el último siglo, alcanzando los 7.4 miles de millones de habitantes, cifra que se espera aumente al menos en un 33% hacia el 2050. De acuerdo a la FAO, este crecimiento poblacional deberá ser acompañado de un incremento más que proporcional en la producción de alimentos para satisfacer las necesidades de las nuevas generaciones. Se estima que se requerirá producir 59% más comida comparado con lo que actualmente se tiene disponible en el planeta, siendo la demanda de proteína lo que supone mayores retos, ya que es la macromolécula más cara comparada con los carbohidratos y lípidos. Por esta razón la búsqueda de fuentes alternativas de proteína se vuelve uno de los más importantes objetivos de investigación. Las fuentes de proteína vegetales han sido de las más exploradas como estrategias para aumentar la producción de alimentos (Elferink & Schierhorn, 2016) y entre ellos, las leguminosas representan uno de los rubros que mayor crecimiento tiene proyectado (Figura 2.1).

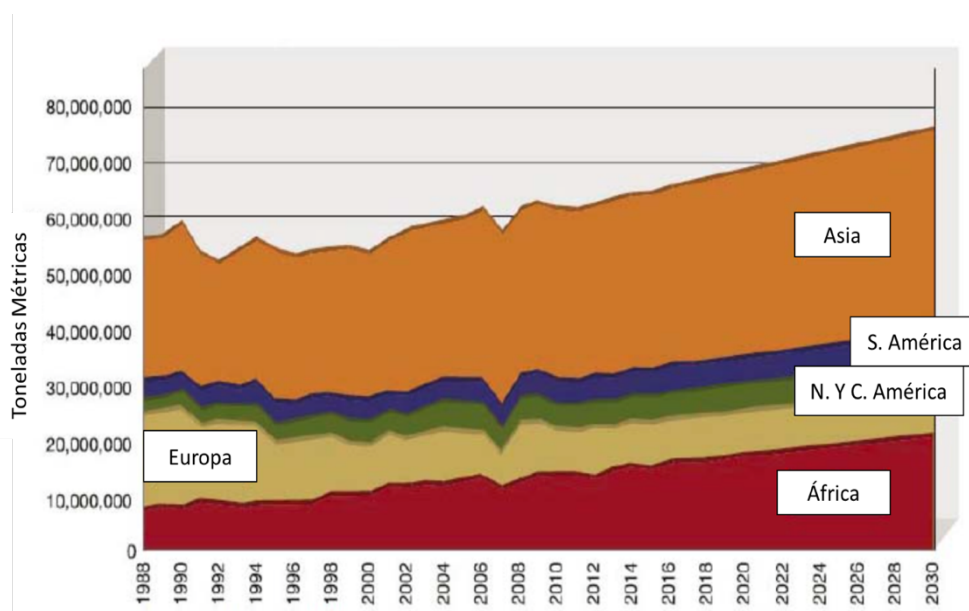


Figura 2.1. Proyección del consumo de leguminosas en el mundo. Adaptada de Akibode & Maredia (2012).

Las leguminosas y las oleaginosas, cubren en conjunto el 8% de la demanda proteica alrededor del mundo (Figura 2.2a) y en países como la India, hasta el 15% (Figura 2.2b). En conjunto con los cereales, estas fuentes vegetales representan una proteína de alto valor biológico, ya que mientras unas carecen de metionina y son ricas en lisina, otros son deficientes en lisina y ricos en metionina (Graham & Vance, 2003). Cuando se comparan tanto cereales como leguminosas, se encuentran algunas otras diferencias, entre ellas el contenido de proteína que va de 20 a 55% más en leguminosas con respecto a cereales.

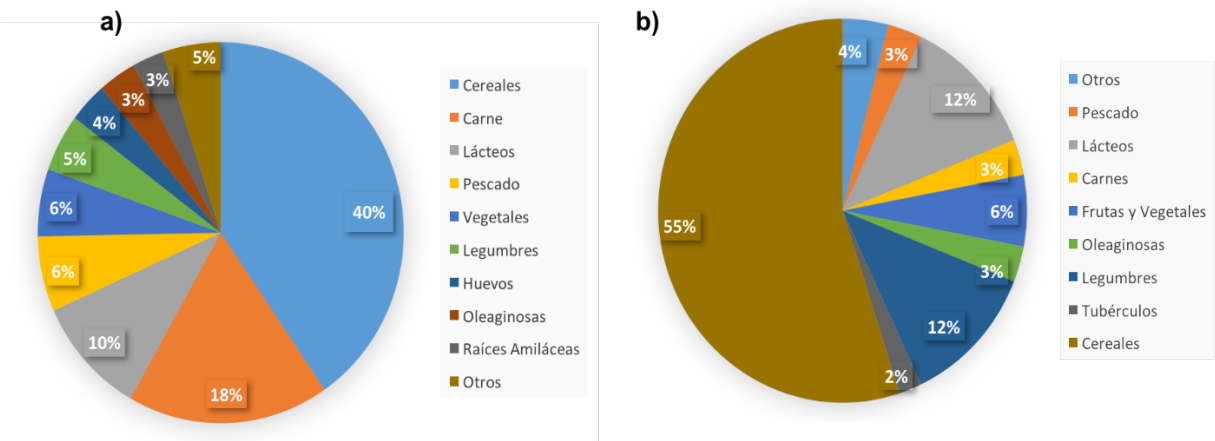


Figura 2.2. a) Fuentes de proteína alimentarias en el mundo. Adaptada de Boland (2013); b) Fuentes de proteína alimentarias en India. Adaptada de Boari et al. (2014).

Las proteínas vegetales presentan ventajas comparadas con aquellas de origen animal, como mejor sabor, menos grasa y carbohidratos, mayor vida de anaquel, y además un mucho menor precio por kg (Tabla 2.1). Estas ventajas hacen de las proteínas vegetales una excelente alternativa para cumplir la ingesta recomendada diaria de 0.8 g por cada kg de peso.

Tabla 2.1. Precio y contenido de proteína de distintas fuentes de proteína en la dieta humana. ¹

Fuente de proteína	Precio (MXN) por kg	Gramos de proteína por kg de alimento	Pesos (MXN)/ kg de proteína

Res	58.0 - 110.0	140 - 220	414.3 – 500.0
Cerdo	53.7 - 89.4	170 - 200	315.9 - 445.9
Pollo	34.7 - 71.3	200 - 280	173.4 - 256.6
Pavo	48.6 - 51.9	190 - 240	216.6 - 255.9
Soya	6.2 - 7.3	360	17.2 - 20.1
Garbanzo	22.0 - 48.0	240	91.7 – 200.0

[†] Precios obtenidos del Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados (SNIIM, 2017).

Se ha observado que la aceptabilidad y consumo de proteínas vegetales han ido en aumento en los últimos años, sobre todo en países desarrollados donde los consumidores buscan alimentos saludables. En EUA y Canadá, por ejemplo, la cantidad de productos a base de leguminosas aumentó 74% en el periodo comprendido entre 2010 al 2014 (Bard, 2016). Además, se ha pronosticado que el mercado de proteínas vegetales aumentará 5% al año, sobre todo con la formulación de *snacks*, bebidas, análogos de carnes, productos deportivos, confitería y productos listos para comer con base a aislados y concentrados proteicos (Mordor Intelligence, 2017).

2.2 Soya (*Glycine max*) y garbanzo (*Cicer arietinum*)

La oleaginosa con mayor producción y consumo a nivel mundial es la soya, la cual se siembra en alrededor del 6% de la tierra arable (Hartman *et al.*, 2011). Esta semilla es originaria de Asia y fue introducida gradualmente a América y Europa siendo hoy uno de los cultivos más importantes de diferentes regiones no autóctonas como EUA, Brasil y Argentina, países en donde el 45, 21 y 14% de la producción mundial se cosecha anualmente (Wilcox, 2004). México por otra parte produce solo 387 mil toneladas de soya anuales, muy por debajo de su demanda interna, lo que lo ha llevado a ser el segundo mayor importador de esta leguminosa solo después de China. En México los principales estados productores de soya son Tamaulipas y San Luis Potosí (Figura 2.3).

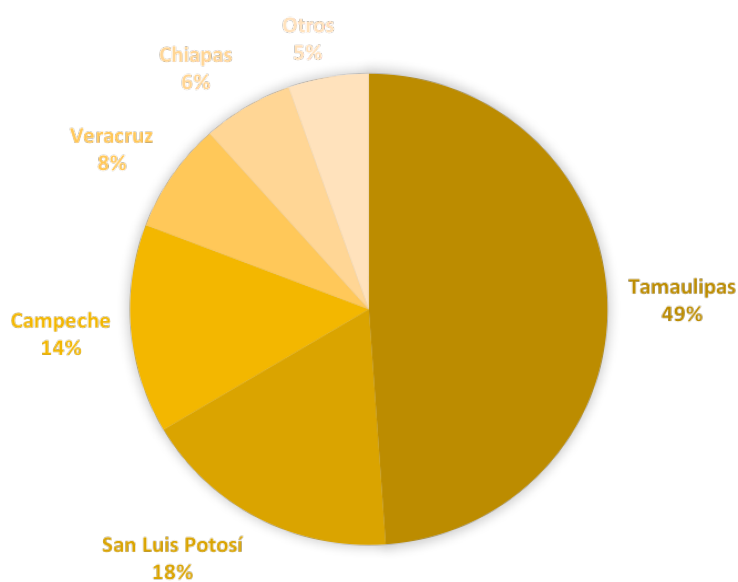


Figura 2.3. Distribución de la producción de soya en México. Adaptada de SAGARPA (2016).

85% de la soya producida en el mundo es convertida en dos productos: harina y aceite. De estos alimentos, el 98% es utilizado para uso animal y el 2% restante es para consumo humano, incluyendo la producción de aislados y concentrados proteicos (>90 y 65% de proteína en base seca respectivamente).

Por otro lado, el garbanzo, una semilla de origen turco, es la tercera leguminosa con mayor producción a nivel mundial (después del frijol y el chícharo). Las hectáreas correspondientes a su cultivo representan el 1.2% de la tierra arable en el mundo (Sekhon & Singh, 2007) todas concentradas en dos grandes variedades: Desi y Kabuli. Los primeros son granos pequeños, de testa gruesa y coloraciones que van desde marrón ligero a oscuro, mientras que los de tipo Kabuli son semillas grandes con una testa delgada y color blanquizco-cremoso. Estos últimos son los cultivados en México, pero el tipo Desi ocupa el 80% de la producción mundial, liderada por India (CGIAR, 2010). En México, el garbanzo es la segunda leguminosa más sembrada después del frijol con una cosecha anual de 172 mil toneladas, donde prácticamente el 100% pertenece al tipo Kabuli y el 90% de la superficie sembrada a la variedad Blanco Sinaloa-92 (Acosta *et al.*, 2014). Los principales estados productores en nuestro país son Sinaloa, Sonora y Baja California Sur (Figura 2.4) y a diferencia de la soya, esta producción se destina principalmente a consumo humano tanto dentro como fuera del país.

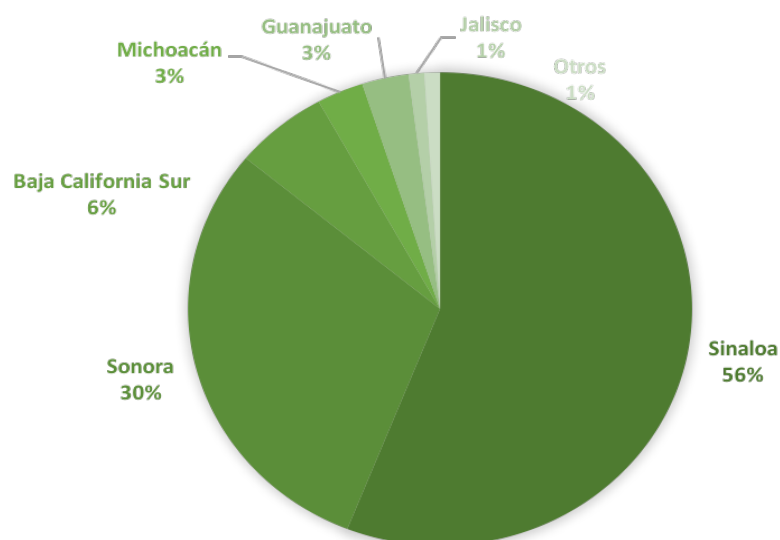


Figura 2.4. Producción de garbanzo por estado en México. Adaptada de CIEP (2013).

De la producción mundial de garbanzo, aproximadamente el 50% se destina a consumo directo (grano seco en bolsa), el 27% va a la industria de la conserva (grano enlatado) y entre 20 y 25% es utilizado en la producción de harina. En los primeros dos casos es utilizado principalmente en ensaladas, sopas, pastas (hummus), *snacks*, postres e incluso es consumido fresco (garbanzo verde).

2.3. Propiedades nutricionales de soya y garbanzo.

La soya es la semilla con mayor contenido proteico en el mundo (hasta 37% base seca). Entre estas proteínas las más abundantes son las de almacenamiento (70%): glicinina y β -conglucina con pesos moleculares de aproximadamente 300 y 150 kDa respectivamente (Zarkadas *et al.*, 2007). La proteína de esta oleaginosa tiene un excelente contenido de aminoácidos esenciales como lisina, mientras que su aporte es limitado en azufrados, principalmente metionina (Wolf, 1970). La soya es además rica en vitaminas del complejo B (excepto B12) y contiene tocoferoles en su aceite, lo que le confiere propiedades antioxidantes. Es además rica en minerales como calcio, magnesio, hierro, potasio y fósforo. Uno de los

principales intereses nutraceuticos relacionados con esta leguminosa es su contenido de isoflavonas, principalmente daidzeína y genisteína, las cuales previenen el rompimiento de los huesos al evitar la pérdida de masa ósea y al promover la conservación de calcio. Las isoflavonas también han sido evaluadas de forma positiva en el tratamiento de cáncer, así como en la reducción de síntomas asociadas con menopausia y diabetes (Tidke *et al.*, 2015).

El garbanzo por otra parte, es una fuente importante de grasa y fibra. Su principal componente corresponde a la fracción de carbohidratos, llegando a ocupar hasta el 80% de su peso seco total. En el caso del garbanzo tipo Kabuli, la mayor parte de los carbohidratos corresponde a almidón, mientras que el resto está representado por celulosa, mono, di y oligosacáridos. El contenido de proteína del garbanzo varía de acuerdo a su etapa de maduración, pero puede ser reportado en un rango del 17 al 24%. En el garbanzo sin cáscara (dhal), el porcentaje de proteína puede alcanzar el 28.9%. Las proteínas del garbanzo se pueden clasificar como proteínas de reserva, en su mayoría globulinas (hasta 70%), glutelinas (10-20%) y albúminas (10-20%). Esta clasificación es de acuerdo a la afinidad de las proteínas a diferentes solventes en condiciones estandarizadas. El perfil proteico de esta leguminosa, se caracteriza por ser relativamente pobre en aminoácidos azufrados, como metionina y cisteína pero contiene cantidades elevadas de lisina y arginina. Otras proteínas encontradas en esta semilla corresponden a lectinas e inhibidores de proteasas (Aguilar-Raymundo & Vélez-Ruiz, 2013). La proteína de garbanzo tiene además una buena digestibilidad cuando se compara con otras leguminosas como frijol rojo (*Cajanus cajan* L.), frijol mungo o judía mungo (*Vigna radiata* L.), frijol negro (*Vigna mungo* L.) y cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) (Jukanti *et al.*, 2012).

Además, el garbanzo contiene cantidades importantes de minerales como calcio, potasio, fósforo y azufre y de vitaminas como piridoxina, folatos y provitamina A (carotenoides). Entre sus propiedades nutraceuticas destacan la antioxidante, por la presencia de fenólicos (en especial en las variedades Desi), y la prebiótica por la alta cantidad de almidón y oligosacáridos.

2.4. Factores antinutrimientales en leguminosas

A pesar de las ventajas asociadas al uso de semillas de leguminosas como fuente de proteína y nutrientes, la presencia de componentes antinutrimientales puede limitar su uso en determinadas condiciones de procesamiento.

Los factores anti nutrimentales (FANs) son considerados metabolitos secundarios con alta actividad biológica producidos por leguminosas como parte de su mecanismo de defensa ante herbívoros, insectos y plagas. Entre estos componentes se encuentran saponinas, taninos, flavonoides, alcaloides, inhibidores de proteasa (como inhibidores de tripsina), oxalatos, fitatos, lectinas, glucósidos cianogénicos, glucósidos cardiacos, cumarina y gossipol entre otros (Soetan & Oyewole, 2009). En la Tabla 2.2 se resume el efecto de algunos de los factores antinutrientales más estudiados de las leguminosas.

Tabla 2.2. Factores anti nutrimentales (FANs) asociados a leguminosas y sus efectos a la salud humana.

FAN	Efecto en la salud humana
Alcaloides	Desórdenes gastrointestinales y neurológicos. Su presencia en leguminosas se limita al lupino (<i>Lupinus spp.</i>).
Taninos	Se unen a enzimas digestivas y a proteína proveniente de la dieta, formando complejos no digeribles. Disminuyen además la palatabilidad de los alimentos.
Saponinas	Causan hipocolesterolemia al unirse al colesterol, haciéndolo no disponible para su absorción.
Lectinas	Generan aglutinación de glóbulos rojos.
Fitatos y oxalatos	Se unen a minerales como calcio, hierro, magnesio y zinc, volviéndolos no disponibles para su absorción.
Gossipol	Genera un aumento en los requerimientos de hierro, al cual tiene la capacidad de quelar.

Por los efectos causados en la salud, el FAN que causa más preocupación son los inhibidores de tripsina (IT), tanto que la FAO recomienda que cualquier producto que contenga ingredientes provenientes de leguminosas en su formulación sea tratado de manera tal que la actividad de este compuesto sea reducida lo más posible (2011). Los efectos de los ITs a la salud se detallan en la siguiente sección.

2.5. Efectos adversos de los inhibidores de tripsina (IT)

Hace algunas décadas la preocupación respecto al efecto de inhibidores de proteasa, incluyendo inhibidores de tripsina, era casi nula ya que raramente se daba el consumo de leguminosas crudas, sin embargo, en los últimos años se ha popularizado el consumo tanto de concentrados como de aislados proteicos, los cuales pueden ser incluidos en alimentos como bebidas sin previa cocción.

A partir de estos cambios en hábitos de ingesta de proteína vegetal, muchos estudios han sido realizados para conocer el efecto de los ITs en la salud. La mayoría han sido ejecutados en animales y muy pocos con humanos, pero han mostrado que el consumo de leguminosas crudas o tratadas pobremente en forma de harinas, aislados o concentrados proteicos ocasionan alargamiento del páncreas (hipertrofia e hiperplasia), así como una secreción muy elevada de enzimas digestivas. Al aumentarse la síntesis de enzimas digestivas (tripsina y quimotripsina), los organismos pierden grandes cantidades de aminoácidos, incluyendo los azufrados, lo que resulta en disminución de crecimiento en animales usados como modelos, sobre todo roedores y pájaros. En experimentos con modelos murinos se ha observado pérdida de peso en periodos pequeños, dado que el uso o absorción neta de proteínas se ve disminuida (Caballero de la Peña, 2015).

En el caso de los humanos, ITs han sido inyectados de manera aislada en el duodeno, y al igual que en el caso de pájaros, roedores y ratas, se ha observado un aumento en la secreción de tripsina, quimotripsina e incluso elastasa en el páncreas. Este suceso es debido a que los ITs suprimen la regulación por retroalimentación relacionado con las secreciones pancreáticas, mediante un incremento en la secreción de la hormona colecistoquinina por parte de la mucosa intestinal (Lajolo & Genovese, 2002).

El valor nutrimental de las leguminosas, dependerá entonces de los métodos de procesamiento y de la medida en que estos disminuyan o remuevan los diversos factores anti nutrimentales. Más adelante en este capítulo, se describirán los métodos hasta hoy reportados para reducir la actividad de los ITs.

2.6. Características de inhibidores de tripsina de leguminosas

Los IT de las leguminosas se clasifican en dos familias de acuerdo a su tamaño molecular: los inhibidores tipo Kunitz (ITKs), de aproximadamente 20 kDa o más y los tipo Bowman-Birk (ITBBs) de 8 a 14 kDa.

Algunas leguminosas como la soya, contienen ambos tipos de inhibidores, mientras que otras como el frijol común y lenteja solo presenten el tipo Bowman-Birk. La actividad de inhibidor de tripsina (AIT) depende del tipo de leguminosa, pero también de la especie, cultivo y región donde se cosechan las semillas (De Mejía *et al.*, 2003). En la tabla 2.3 se muestra un resumen de la actividad reportada de inhibidores de tripsina para diferentes leguminosas en unidades (U) por mg.

Tabla 2.3. Actividad de inhibidores de tripsina (AIT, U/mg) de algunas leguminosas.

Nombre científico	Nombre común	Actividad de inhibidor de tripsina (U/mg)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Frijol/ habichuela	3.1
<i>Cicer arietinum</i>	Garbanzo	15.0 - 60.4
<i>Lens culinaris</i>	Lenteja	7.4
<i>Pisum sativum</i>	Chícharo	2.2
<i>Vigna unguiculata</i>	Caupí	7.5
<i>Vicia faba</i>	Haba	4.5
<i>Arachis hipogea</i>	Cacahuete	5.6
<i>Cajanus cajan</i>	Gandú	4.8
<i>Glycine max</i>	Soya	94.1
<i>Vigna radiata</i>	Frijol mungo	1.8
<i>Lupinus spp</i>	Lupino	1.7

<i>Vigna mungo</i>	Frijol negro/ lenteja negra	1.0
<i>Phaseolus acutifolius</i>	Frijol tépari	18.0
<i>Vigna subterranea</i>	Guisante de tierra/ gandsú	13.0
<i>Phaseolus lunatus</i>	Judía de lima/ guaracaro	5.9

En cuanto a la estructura de estos inhibidores de proteasa, los de tipo Kunitz han sido estudiados principalmente en soya. Este inhibidor tiene 3 subdominios repetidos, cada uno de ellos conformado por 4 láminas β interconectadas por bucles. Dentro de su estructura se encuentran dos enlaces disulfuro y aunque ninguno de ellos está localizado en el sitio activo, se sabe que ambos juegan un papel importante estabilizando la estructura del ITK de soya (Figura 2.5).

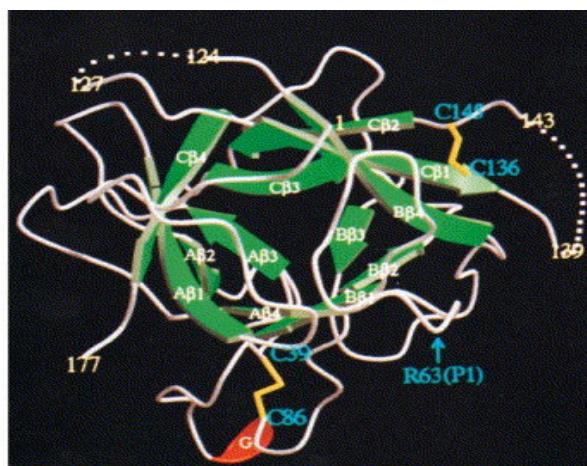


Figura 2.5. Estructura del inhibidor de tripsina tipo Kunitz de soya (Song & Suh, 1998).

Por otro lado, la estructura del inhibidor de tipo Bowman - Birk ha sido estudiada en chícharo, lenteja, frijol mungo, judía de lima y caupí, además de soya. Los ITBBs están conformados por dos dominios diferentes, uno para tripsina y otro para quimotripsina. Ambos están constituidos por dos motivos simétricos de horquillas β , cada uno con láminas β antiparalelas. La estructura de estos inhibidores contiene 7 puentes disulfuro en total, cuya ubicación varía de acuerdo al tipo de leguminosa. Por ejemplo, en soya el sitio activo contiene

uno de ellos, pero no en el caso del caupí. De cualquier manera, estos puentes son fundamentales en el mantenimiento y estabilidad de la estructura del inhibidor ante condiciones extremas (por ejemplo, pH y temperatura), ya que se sabe que estructuras proteicas con más de 5 enlaces disulfuro son estables a condiciones donde otras suelen desnaturalizarse de manera irreversible (Werner *et al.*, 1992; Voss *et al.*, 1996; Rao & Suresh, 2007). La Figura 2.6. muestra la estructura del ITBB de soja. Es importante mencionar que para garbanzo, la estructura de estos inhibidores aún no ha sido determinada.

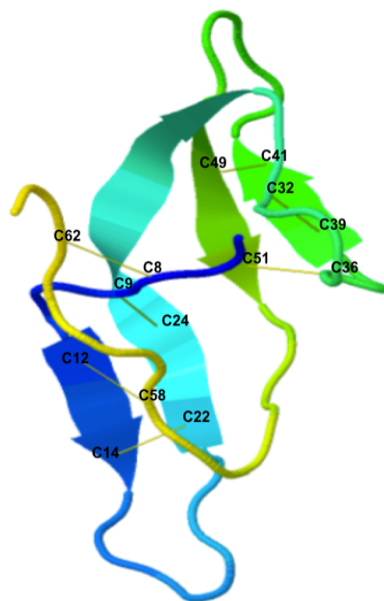


Figura 2.6. Representación del inhibidor de tripsina Bowman-Birk de soja (Voss *et al.*, 1996).

Los IT son específicos de las semillas de leguminosas, no habiéndose detectado actividad en hojas, raíces ni en vainas vacías. Sin embargo, la localización dentro de la semilla varía de acuerdo a la especie, por ejemplo, mientras que en soja y haba la AIT está concentrada mayormente en el cotiledón (>90%), en otras leguminosas como el garbanzo y el frijol verde (*Macrotyloma uniflorum*), esta actividad aunque mayoritaria en cotiledón, se encuentra distribuida en las diferentes partes anatómicas de sus semillas: cotiledón (77.2 a 75.8%), eje embrionario (11.9 al 15.5%) y testa (8.7 a 10.9%) (Sreerama *et al.*, 2010; Patras *et al.*, 2011; Valdez-Anguiano *et al.*, 2015).

En cuanto a la localización celular, los inhibidores de proteasa se encuentran formando partes de cuerpos proteicos en pared celular, espacio intercelular y citosol; sin embargo, también se han encontrado diferencias de acuerdo al tipo de leguminosa. Por ejemplo, para el frijol mungo, se ha determinado que sus ITs no se encuentran en cuerpos proteicos, sino más bien en el citosol, mientras que para soya, tanto ITK como ITBB, además de las localizaciones mencionadas, se han encontrado en el núcleo celular. En cuanto a los ITs de garbanzo, no existe información referente a su localización celular (Chrispeels and Baumgartner, 1978; Horisberg & Vonlathen 1983; Birk, 1985; Hernández-Nistal, 2009).

2.7. Análisis de inhibidores de tripsina de leguminosas

Se han desarrollado diferentes métodos que permiten determinar la actividad de ITs antes y después de diversos tratamientos de inactivación, sin embargo, el más utilizado es el establecido por Kakade *et al.* (1974), el cual es a su vez una versión más precisa del publicado originalmente por Kakade *et al.* (1969). Este método engloba tanto el proceso de extracción de ITs como el del análisis subsecuente, y se prefiere dado que supera la subestimación de AIT generada al pasar por algunos tratamientos de inactivación, especialmente aquellos que están relacionados con desnaturalización proteica como los procesos térmicos, extrusión, ultrasonido, descompresión instantánea controlada (DIC), radiación infrarroja y tratamientos con ácidos y bases.

En cuanto al proceso de extracción, se recomienda que sea llevado a cabo con NaOH 0.01 M en un pH que vaya de 8.4 a 10. Los tiempos de extracción pueden variar. Por ejemplo, para las leguminosas no sometidas a un tratamiento como el térmico, se recomienda 1 h, mientras que para aquellas tratadas se recomiendan 3 h. Esto tiene el objetivo de exponer los residuos de aminoácidos de los sitios activos de ITs que puedan encontrarse aun con actividad catalítica, ya que, en ocasiones, se vuelven inaccesibles para la formación del complejo tripsina-IT requerido para el análisis. De igual manera, los protocolo de extracción sugieren no centrifugar los extractos, dado que en caso de la existencia de ITs asociados a cuerpos de inclusión (ya sea por procesamiento térmico o por el tipo de leguminosa), se podría también dar una subestimación de su actividad.

Existen otros métodos de análisis reportados siendo todos muy semejantes y/o basados en el de Kakade *et al.* (1974). Por ejemplo, para algunas leguminosas como las habas, Valdebouze *et al.* (1980) sugieren añadir al medio de extracción polivinipirrolidona (PVP) 1%, con la finalidad de reducir interferencias causadas por los taninos. Todos los métodos de análisis reportan la actividad total de IT, no diferenciando entre la que se atribuye a ITKs o ITBBs.

Algunos autores han determinado que reducciones de AIT mayores a 95% están ligadas a mejoras *in vivo* en modelos animales, como ganancia de peso y mejor eficiencia proteica comparado con el consumo de leguminosas crudas. De igual manera, se ha observado la desaparición de otros problemas asociados a una alta actividad de ITs, como agrandamiento o hiperplasia pancreática (Liener & Thompson 1980; Alonso *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2008).

2.8. Métodos de inactivación de IT de leguminosas.

Con la finalidad de mejorar la calidad nutricional de las leguminosas, se han desarrollado distintos procesos alimentarios cuyo objetivo es disminuir al máximo la actividad de ITs. En la Figura 2.7, se presenta un resumen con los métodos que han sido reportados al momento para reducir la actividad de inhibidor de tripsina en semillas de leguminosas. Estos se pueden clasificar en tres grandes grupos de acuerdo a su principio de inactivación: físicos, biológicos y químicos.

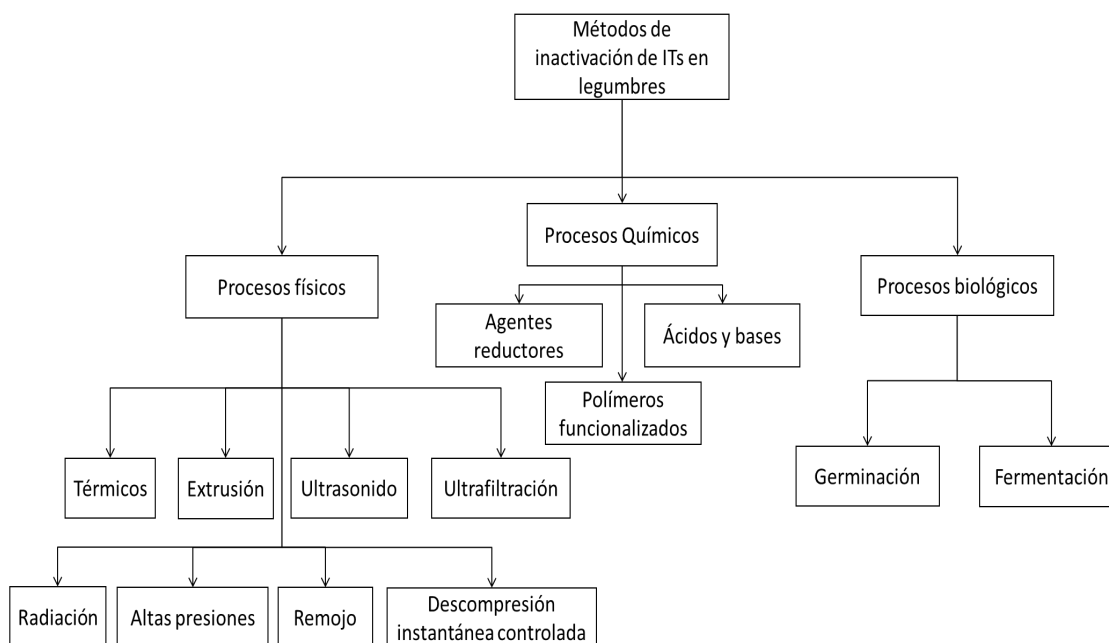


Figura 2.7. Métodos de inactivación de inhibidores de tripsina (ITs) en leguminosas. Adaptada de Avilés-Gaxiola et al. (2017).

2.8.1. Métodos tradicionales para la inactivación de IT de leguminosas (procesamiento térmico).

El procesamiento térmico es ampliamente aceptado como la forma más efectiva de mejorar el valor nutricional general de las semillas de leguminosas tanto en el hogar como a nivel industrial. El uso de temperaturas elevadas mejora la digestibilidad de las proteínas, principalmente a través de la inactivación de FANs termolábiles, especialmente los ITs. El tratamiento térmico promueve la ruptura de los enlaces intermoleculares responsables de mantener la estructura terciaria de los ITs, lo que provoca cambios en la conformación del sitio activo. Algunos de los métodos incluidos en esta clasificación, son: cocción, autoclave, microondas y tostado.

Los estudios sobre la acción de altas temperaturas sobre ITs, se han llevado a cabo desde principios del siglo XX, cuando se demostró que la digestibilidad *in vitro* de proteínas era menor en las semillas crudas que en las cocidas. En ese entonces, investigadores encontraron que esto podría estar relacionado con componentes presentes en las semillas crudas (Borchers & Ackerson, 1947). Uno de los estudios más antiguos data de 1948 (Westfall & Hauge), donde se

dio a conocer que los ITs de soya eran termosensibles, siendo totalmente inactivados a temperaturas superiores a los 108°C durante intervalos de tiempo que iban de 15 a los 30 min. A partir de entonces, han surgido numerosas publicaciones sobre el uso de procesamiento térmico en varios tipos de leguminosas, las cuales han sido muy útiles para determinar la efectividad de estos sobre la actividad de ITs.

En el caso de soya, se ha encontrado que todos los tratamientos térmicos disminuyen prácticamente en su totalidad la AIT en temperaturas superiores a 80°C y tiempos variados. Estas condiciones han sido validadas también en leguminosas como: chícharo, frijol mungo, lenteja, frijol común, habas y cacahuate (Habiba, 2002; Mubarak, 2005; Ma *et al.*, 2011; Embaby, 2010).

A pesar de su buen desempeño en leguminosas como las mencionadas en el párrafo anterior, existen otras semillas como el frijol adzuki, el frijol verde y garbanzo en donde los tratamientos térmicos no han sido igual de efectivos y solo por mencionar el ejemplo de los frijoles enlistados, se ha encontrado que sus ITs se mantienen activos aun expuestos a 90°C por 60 min (Klomklao *et al.*, 2010; Kumar & Gowda, 2013). En el caso específico del garbanzo, se ha determinado que esta semilla requiere tiempos y temperaturas aún más elevadas para lograr inactivaciones significativas y en comparación con la soya requiere 80 min más de hervido y 20 min más de tratamiento en autoclave (Alajaji & El-Adawy, 2006).

Aun cuando el tratamiento térmico es un método rápido y efectivo para inactivar ITs en la mayoría de las leguminosas, la elevada temperatura, también daña diversas proteínas, entre ellas las de almacenamiento que son las más abundantes en este tipo de semillas. El efecto sobre proteínas de almacenamiento cambia el perfil funcional, entre ellos la solubilidad que se ve reducida hasta en un 50%. A temperaturas por encima de los 80°C, aminoácidos como lisina, metionina, cisteína, así como vitaminas termolábiles son irreversiblemente dañados. Otro inconveniente es que generar energía para este tipo de tratamientos representa un costo elevado e impacta de manera negativa al medio ambiente, lo que ha motivado la búsqueda de alternativas de inactivación de ITs. A continuación, se mencionan los más importantes con base a la figura 2.7 y más detalle se puede consultar en la reciente revisión de Avilés-Gaxiola *et al.* (2017).

2.8.2. Otros métodos físicos

Entre los tratamientos físicos diferentes a la aplicación de calor se encuentran la radiación, altas presiones, extrusión y ultrasonido. Todos ellos han buscado la inactivación de los ITs

mediante un cambio estructural catastrófico para su funcionalidad, afectando tanto estructuras secundarias como terciarias de manera indiscriminada. Todos estos tratamientos al ser no selectivos afectan, al igual que el térmico, al resto de las proteínas y compuestos presentes en la matriz alimentaria.

La extrusión por ejemplo es un proceso físico que integra fenómenos térmicos y mecánicos al forzar al producto a pasar a través de un orificio pequeño cambiando la conformación proteica de la matriz tratada. La radiación por otro lado, transfiere energía térmica a través de ondas electromagnéticas, mientras que el ultrasonido corresponde a la aplicación de ondas mecánicas que, al producir burbujas y el colapso de las mismas en el medio, afectan la estructura de las proteínas presentes. En el caso de las altas presiones, este tratamiento incluye el uso de hasta 600 MPa de presión (unas seis mil atmósferas), con lo cual se inactivan enzimas y desnaturalizan proteínas en general, al interrumpir el balance intermolecular proteína-solvente y afectar sobre todo interacciones de carácter hidrofóbico.

En la mayoría de estos tratamientos físicos, las inactivaciones tienen un rendimiento medio, por lo que suelen combinarse con otra técnica para aumentar de esta forma su efectividad. El tratamiento de altas presiones hidrostáticas por ejemplo, es combinado con procesamiento térmico reduciendo así el tiempo y temperatura necesaria para disminuir en más de 80% la AIT de soya (Guerrero-Beltrán *et al.*, 2009).

En general los métodos físicos hasta aquí mencionados, tienen como desventajas los altos costos energéticos, reducción del contenido de vitaminas y afectación significativa de las propiedades funcionales de las proteínas de estas semillas. Por poner un par de ejemplos, se ha encontrado que la extrusión afecta la capacidad emulsificante y aumenta la absorción de agua, mientras que la radiación disminuye de manera considerable la solubilidad (Baker & Mustakas, 1973; Yalcin & Basman, 2015).

Entre los métodos físicos también se encuentran el remojo y la ultrafiltración, cuyo objetivo es la remoción o aislamiento de los IT del resto de los componentes de la semilla. Ambos métodos se ejecutan con la finalidad de reducir al mínimo los cambios en propiedades funcionales y además bajar el gasto energético asociado al resto de los métodos físicos. En los trabajos reportados con estos métodos se encontró que, a pesar de estas ventajas, los rendimientos han sido limitados y el tiempo de tratamiento suele ser alto. En el caso del remojo, se ha logrado remover hasta el 35% de los ITs presentes en leguminosas en periodos de hasta

96 h. En el caso de la ultrafiltración se ha reportado la eliminación de máximo 9.47% de los ITs de semillas como garbanzo (Mondor *et al.*, 2009; Mumba *et al.*, 2004).

2.8.3. Métodos biológicos

Los métodos biológicos se basan en la inactivación de FANs de carácter proteico (como los ITs) usando proteasas. La germinación, es un proceso catabólico natural llevado a cabo por todas las plantas superiores que tiene como objetivo el uso de los nutrientes almacenados en el cotiledón para desarrollar y hacer crecer una nueva planta una vez que la semilla sale de su estado de latencia. Durante este proceso, las proteasas rompen proteínas celulares y enzimas para obtener aminoácidos libres que son usados en el crecimiento autótrofo de la planta. Los resultados obtenidos mediante este método biológico dependen en gran medida de las condiciones y el tiempo de brote, destacando ventajas como el aumento y mejor biodisponibilidad de nutrientes. Los rendimientos y eficiencia de inactivación por otra parte son bajos, alcanzándose, con 5 días de tratamiento, un máximo de 25% de reducción en la AIT en el caso del garbanzo (El-Adawy, 2002).

La fermentación también ha sido probada como una alternativa biológica para mejorar las propiedades nutricionales de las leguminosas. Durante la fermentación, toman lugar procesos catabólicos de transformación de moléculas complejas en elementos simples por acción de microorganismos. Estos procesos incluyen alta actividad proteolítica que incrementa la degradación de proteínas. Este método ha sido probado en soya utilizando *Aspergillus oryzae*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Saccharomyces cerevisiae* en fermentaciones en estado sólido por periodos de hasta 5 días logrando inactivaciones de hasta 99% de los ITs de esta leguminosa (Adeyemo & Onilude, 2013). La conveniencia de su uso se ha limitado únicamente a soya destinada a la elaboración de productos tradicionales como salsa de soya, miso y tempeh.

2.8.4 Métodos químicos

Los tratamientos químicos se basan en el uso de sustancias que tienen la capacidad de alterar la estructura molecular a través de interacciones químicas. Dentro de estos métodos se encuentran el uso de ácidos y bases y la aplicación de agentes reductores.

En el primer caso el objetivo es inactivar ITs con el uso de condiciones extremas de pH, ambientes en los cuales se fomentan las interacciones electrostáticas no estables entre residuos de aminoácidos, afectando la totalidad de estructuras proteicas presentes en la matriz alimenticia. Para este método, se han probado compuestos químicos como hidróxido de sodio (NaOH), de amonio (NH_4OH) y bicarbonato de sodio (NaHCO_3) durante tratamiento térmico. El uso de ácidos y bases en combinación con procesamiento térmico ha permitido bajar la temperatura de tratamiento de entre 10 y 26°C e inactivar hasta el 92% de AIT de soya (Guerrero-Beltran *et al.*, 2009). Como es de esperar, existen productos secundarios en este tipo de inactivación, los cuales afectan las propiedades nutricionales de aislados y concentrados proteicos. Algunos ejemplos de reacciones secundarias son: 1) formación de nuevos aminoácidos como la lisinoalanina, cuyo consumo ha probado causar daños renales en modelos murinos y 2) racemización de aminoácidos que está relacionada con la disminución de la digestibilidad de proteínas y la formación de compuestos tóxicos (Friedman 1999; Gilani & Sepehr 2003).

La formación de estos compuestos, depende de factores como la concentración de ácidos y bases, el tiempo de exposición y el tipo de proteína (Nishino y Ohshima 1995). Además, es indudable que esta estrategia de inactivación afecta las propiedades funcionales de las proteínas, sin reportes contundentes a la fecha, lo cual representa sin duda un área de oportunidad en la investigación científica. Otro método de inactivación considerado como químico, sugiere el uso de copolímeros funcionalizados, por ejemplo, dimetracrilato de etilenglicol funcionalizado con aminas, cuyo objetivo es unir y desnaturalizar compuestos no deseados como ITs y lipoxigenasas, mediante la combinación de interacciones iónicas e hidrofóbicas (Jasti *et al.*, 2015). A pesar de que el reuso potencial de los copolímeros hace de esta una técnica prometedora, no se han ejecutado pruebas toxicológicas.

Agentes reductores

El objetivo de los agentes reductores, es inactivar ITs mediante la interrupción de sus enlaces disulfuro, los cuales como ya se mencionó, son importantes en la estabilidad de la estructura terciaria de este FAN. En pocas investigaciones se ha analizado el efecto de estos compuestos en la AIT. Sessa *et al.* (1988) por ejemplo, evaluaron el uso de metabisulfito de sodio ($\text{NA}_2\text{S}_2\text{O}_5$) en soya en combinación con tratamiento térmico, concluyendo que los ITs eran inactivados hasta en 94%. Sin embargo, los efectos de este compuesto sobre propiedades funcionales y estructura proteica, no han sido analizados.

En la segunda y última investigación encontrada sobre el uso de agentes reductores para inactivar IT, se estudió el uso de tris (2-carboxietil)-fosfina (TCEP) directamente sobre ITK aislado de soya, y aunque se lograron inactivaciones de más del 90%, es importante evaluar el efecto en los ITs en presencia del resto de los componentes de la matriz, además el TCEP es un reconocido agente carcinógeno por lo que no se podría utilizar en la producción de alimentos (Tetenbaum & Miller, 2001).

En vista del efecto de estos agentes reductores sobre la estructura de IT, la evaluación de productos aprobados en la industria de alimentos, como hidrocloreto de L-cisteína, ácido ascórbico y sulfito de sodio tiene un buen potencial para desarrollar tecnologías sobre todo en el tratamiento de leguminosas diferentes a la soya. Como ya se ha discutido en este marco teórico, los IT de algunas leguminosas no han sido aún estudiados con detalle, así que el efecto de tratamientos diferentes a los térmicos representa una buena área de oportunidad de investigación tanto básica como aplicada. Es interesante mencionar que los compuestos enlistados previamente como agentes reductores de aplicación en alimentos, sobre todo el hidrocloreto de L-cisteína y ácido ascórbico se usan en panificación para reducir enlaces disulfuro de gluten con la intención de hacer la masa más extensible y fácil de manejar. El objetivo de estos aditivos es claro y su aplicación representa una estrategia selectiva para inactivar ITs en leguminosas. Un método así dirigido podría ayudar a superar problemas asociados al resto de los tratamientos, porque en primera, no requiere altas cantidades de energía ni tiempos elevados de procesamiento y en segunda su uso brinda la posibilidad de no afectar al resto de las proteínas de la matriz tratada, conservando por lo tanto sus propiedades funcionales.

En la siguiente subsección se describe con más detalle la importancia de propiedades como solubilidad en ingredientes proteicos de origen vegetal.

2.9 Propiedades funcionales y digestibilidad *in vitro* de las proteínas.

El término “propiedades funcionales” hace referencia a aquellas características fisicoquímicas de los alimentos que están relacionadas a su utilidad y que nada tienen que ver con la nutrición. Las propiedades funcionales de las proteínas tienen un papel fundamental en el comportamiento físico que tendrán y definirán sus posibles usos como ingredientes. Las proteínas contribuyen a obtener las características deseadas del alimento del que forman parte.

Las propiedades funcionales se pueden clasificar en dependientes de interacciones proteína-proteína (gelificación), propiedades superficiales (emulsificación y características espumantes), hidrodinámicas (viscosidad) y de hidratación. Estas últimas hacen referencia a capacidades como la absorción de agua de las proteínas y a la solubilidad de las mismas (Cheftel *et al.*, 1989). Más detalle sobre estas propiedades de interacción con el agua son descritas a continuación:

a. Solubilidad

La solubilidad de las proteínas es considerada como la porción de nitrógeno que se encuentra en un estado soluble bajo ciertas condiciones ambientales, es decir, la porción de proteína de una muestra que es disuelta en un solvente determinado. Esta propiedad depende de la composición y secuencia de aminoácidos, peso molecular, conformación y contenido de grupos polares y no polares y a su vez puede ser afectada por factores como: fuerza iónica, pH, tipo de solvente y temperatura entre otros.

El mecanismo por el cual la fuerza iónica afecta la solubilidad proteica es poco entendido, sin embargo, se cree que fenómenos de solvatación, *salting in* y *salting out*, están involucrados. Por ejemplo, una fuerza iónica elevada, favorece las interacciones hidrofóbicas entre las proteínas, promoviendo su agregación, ya que a altas concentraciones de sales las uniones a las moléculas de agua son competidas tanto por moléculas de sales como por moléculas proteicas (Zayas, 1997). En relación al pH es importante recordar que el grado de solubilidad de una proteína en un sistema acuoso es el resultado de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre las moléculas de las proteínas. Si la repulsión electrostática entre las moléculas de la proteína es mayor a las interacciones hidrofóbicas, la proteína será más soluble, por otro lado, cuando las proteínas presentan carga neta de cero (punto isoeléctrico), las fuerzas de atracción predominan y las moléculas tienden a asociarse, haciéndose insolubles. Por lo tanto, para que las interacciones entre las proteínas y su solvente incrementen, en el caso del agua, el pH debe ser ya sea mayor o menor al punto isoeléctrico (Zayas, 1997).

Otro de los factores que influye en el grado de solubilidad de las proteínas es por supuesto el tipo de solvente. En la Tabla 2.4 se describe la clasificación de las proteínas de acuerdo a su afinidad con diferentes solventes de acuerdo a Osborne (1907).

Tabla 2.4. Clasificación de las proteínas de acuerdo a su solubilidad.

Fracción proteica	Solvente
Albúminas	H ₂ O
Globulinas	H ₂ O + sales
Prolaminas	Alcohol
Glutelinas	Alcalis, Mercaptoetanol

Datos tomados de Ju *et al.* (2001).

La temperatura es otro factor que influye en la solubilidad proteica, ya que a temperaturas extremas estas tienden a desnaturalizarse, perdiendo su estructura cuaternaria, terciaria y en ocasiones secundaria. Esto ocasiona un cambio o alteración en las interacciones proteína-solvente promoviendo la exposición de grupos hidrofóbicos y por lo tanto la agregación proteica y pérdida de solubilidad (Zayas, 1997). La solubilidad de una proteína se puede utilizar como indicador del grado de desnaturalización de las mismas durante importantes procesos industriales como extracción, purificación y aislamiento.

b. Absorción de agua

Como ya se ha mencionado, las propiedades funcionales más importantes de las proteínas están relacionadas con su interacción con el agua. La capacidad que tienen las proteínas de retener el agua propia de su matriz y la añadida durante la aplicación de fuerzas, presión, centrifugación y/o calentamiento (g H₂O/ g proteína) se denomina propiedad de “absorción de agua”. Al igual que la solubilidad, este parámetro está relacionado con otras propiedades, por ejemplo, viscosidad y gelatinización (Zayas, 1997).

La capacidad de absorción de agua depende de la composición y de la conformación de las moléculas de proteína, así como de factores ambientales como pH, fuerza iónica y temperatura. Por ejemplo, cuando la carga neta de las proteínas es cero (en su punto isoeléctrico), la absorción de agua es menor, ya que como se mencionó anteriormente, en este estado predominan las interacciones proteína-proteína. Una vez que el pH es modificado por debajo o por encima del punto isoeléctrico, la carga neta de las proteínas sufre un cambio que les permite interactuar y unir más moléculas de agua (Badui-Dergal, 2006).

La absorción de agua es un factor limitante en la aplicación de proteínas en los alimentos, ya que juega un papel muy importante en la textura, color y propiedades sensoriales de los productos. Por ejemplo, en productos cárnicos y masas horneadas se desea una textura suave y jugosa, que a su vez depende de esta propiedad. También este parámetro determina si la proteína se va a comportar como gel, como precipitado o como una dispersión coloidal. Además, provee de información de interés específico, por ejemplo, en el caso de polvos proteicos, indica si estos deben ser añadidos a una mezcla de manera directa o rehidratados previamente.

c. Digestibilidad

Existen parámetros que ayudan a determinar la calidad nutricional de las proteínas, sobre todo la cantidad de aminoácidos esenciales, biodisponibilidad de los mismos y la digestibilidad integral de la proteína. La digestibilidad está definida como la proporción de nitrógeno de la proteína que es absorbida tras su ingesta. La proteína de origen animal cuenta con valores de digestibilidad más altos que las vegetales, diferencia asociada sobre todo al contenido de aminoácidos esenciales. Las proteínas vegetales carecen de uno o dos aminoácidos esenciales, por lo que se recomienda el consumo variado de vegetales en dietas con restricción de ingesta animal. Una ventaja de combinar fuentes vegetales de proteína, es que el contenido de grasas saturadas y colesterol es menor, mientras se complementa el perfil de aminoácidos esenciales (Hoffman & Falvo, 2004).

Además de la conformación proteica, existen otros factores que afectan la digestibilidad de la proteína de origen vegetal, por ejemplo, la unión a otros componentes de la matriz alimenticia y la presencia de factores anti nutrimientales naturales y artificiales. Los factores anti nutrimientales naturales, son los ya mencionados inhibidores de proteasas y taninos que disminuyen la capacidad de las enzimas digestivas de desdoblar a las proteínas y aprovechar así estos nutrientes. En el caso de los artificiales, se refiere a los que son ocasionados por las condiciones de procesamiento como tratamientos térmicos, solventes orgánicos, ácidos y bases, etc., ya que estas condiciones afectan la disponibilidad de los aminoácidos haciéndolos menos digeribles. Por ejemplo, cuando se oxidan los aminoácidos sulfurados (sulfóxido de metionina, metionina sulfona y ácido cisteico), con la formación de grupos Maillard (azúcares libres unidos a grupos $-NH_2$) y la racemización de aminoácidos (Gilani, 2005).

2.10 Importancia de la solubilidad de las proteínas en agua.

Esta propiedad es de suma importancia en la industria de alimentos, tanto que es usualmente la primera en ser determinada al caracterizar una proteína, ya que el grado de solubilidad en agua de la misma, brinda información importante sobre otras propiedades como capacidad emulsificante, de gelificación y espumante y por lo tanto de los posibles usos que se le puede dar como parte de matrices alimenticias (Butt & Batool, 2010). Se ha sugerido que la solubilidad de las proteínas es el factor funcional más importante, ya que esta propiedad permite la formación de dispersiones coloidales finas con una estructura macroscópica homogénea, por lo que se recomienda que toda proteína usada en alimentos sea parcial o completamente soluble en agua, en especial para aquellas que van a ser utilizadas como parte de productos líquidos y bebidas (el caso de la mayoría de los concentrados y aislados proteicos).

El objetivo de esta tesis fue probar la efectividad de dos agentes reductores permitidos en la industria de alimentos (metabisulfito de sodio e hidrocloreuro de L-cisteína) en la reducción de ITs de soya o garbanzo y evaluar el efecto de estos tratamientos sobre la solubilidad de concentrados proteicos obtenidos a partir de estas leguminosas.

Capítulo 3. Materiales y Métodos

3.1. Materias primas

Para evaluar el efecto de los agentes reductores se usaron dos materias primas:

- 1) Harina de soya desgrasada industrial (Ragasa lote No.150704, Monterrey, Nuevo León, México).
- 2) Harina de garbanzo Blanco Sinaloa obtenida a partir de semillas cosechadas en la temporada de 2015 en Angostura, Sinaloa, México.

Para obtener la harina, las semillas de garbanzo fueron decorticadas manualmente después de un proceso de remojo en agua a temperatura ambiente por 12 h (Figura 3.1a). Las semillas ya decorticadas fueron sometidas a un proceso de secado a 60°C por 6 h en un deshidratador (Cabela modelo T5160D, Sidney, Nebraska, EU, Figura 3.1b). La semilla decorticada y seca fue pulverizada en un molino UDY (Fort Collins, Colorado, EU, Figura 3.2c) y desgrasada en dos extracciones sucesivas de 3 h con hexano a temperatura ambiente (1:3, Figura 3.2d). El solvente fue removido por decantación y el remanente evaporado 16 h en una campana de extracción.

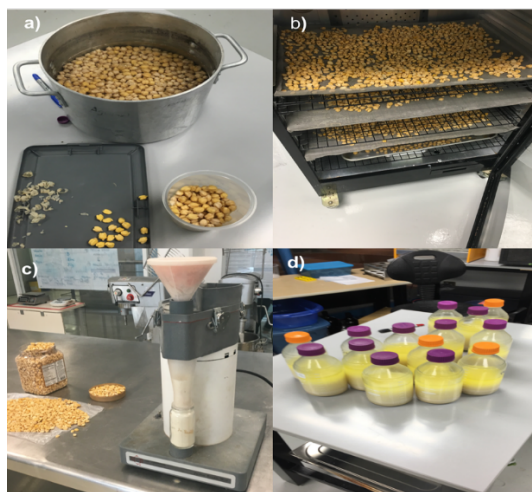


Figura 3.1. Proceso de producción de harina de garbanzo decorticado desgrasada: a) remojo de semillas de garbanzo Blanco Sinaloa y decorticado manual; b) secado; c) producción de harina; d) desgrasado con hexano.

3.2. Caracterización de materias primas

3.2.1. Análisis proximal

Se realizó la caracterización fisicoquímica de la materia prima: harina de soya desgrasada y harina desgrasada de garbanzo Blanco Sinaloa decorticado. Todas las pruebas se hicieron al menos por triplicado y el detalle de los métodos se describe a continuación:

Humedad

La determinación de humedad se realizó mediante un método gravimétrico en estufa Shellab modelo 1321F (Cornelius, Oregon, EUA) a 100 ± 5 °C (AOAC 925.10, 1992) y se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = (MH - MS) / MH * 100$$

Donde

MH = muestra húmeda (g); MS = muestra seca (g)

Proteína cruda

La proteína cruda se determinó con el método micro-Kjeldahl bajo el protocolo oficial de la AOAC 978.02 (1992). Los factores utilizados para convertir porcentaje de nitrógeno a proteína fueron: 6.71 para soya y 6.25 para garbanzo (estándar de alimentos). Los cálculos se hicieron con las siguientes fórmulas:

$$\% N_2 = \text{mL gastados HCl} \times \text{normalidad HCl} \times 0.014 \times 100 / \text{g de muestra}$$

$$\% \text{ proteína, base húmeda} = \% N_2 * \text{factor de conversión}$$

Grasa cruda

La determinación de grasa cruda se realizó mediante el método Goldfish (AACC 30-20.01, 2000). Se usó éter de petróleo en lugar de éter etílico. El porcentaje de grasa se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Grasa cruda, base húmeda: } PG / PM * 100$$

Donde:

PM = peso muestra (g); PG = [peso vaso con grasa (g) – peso vaso sin grasa (g)]

Fibra cruda

Se determinó la fibra cruda mediante el método oficial de la AOAC 962.09 (1992), en el que se usa una hidrólisis ácida seguida de una digestión alcalina (ácido sulfúrico 1.25% v/v e hidróxido de sodio 1.25% v/v respectivamente), para cuantificar el contenido celulósico presente en la muestra. Se calculó el porcentaje mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Fibra cruda, base húmeda} = (A - B) / C * 100$$

Donde:

A = peso del crisol con el residuo seco (g); B = peso del crisol con la ceniza (g); C = peso de la muestra (g)

Cenizas

Las cenizas de las muestras se determinaron mediante el método gravimétrico oficial de la AOAC 923.03 (1992). Se utilizó una mufla Thermo Scientific modelo FB1415M (Dubuque, Iowa, EUA) a $550 \pm 3^\circ\text{C}$ por 4 h. El resultado se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas, base húmeda} = (MC / MH) * 100$$

Donde:

MH = peso muestra húmeda (g); MC = peso muestra calcinada (g)

Extracto libre de nitrógeno

El extracto libre de nitrógeno se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Extracto libre de Nitrógeno} = 100 - (\% \text{ grasa} + \% \text{ proteína} + \% \text{ fibra cruda} + \% \text{ ceniza} + \% \text{ humedad})$$

3.2.2. Distribución del tamaño de partícula

La distribución del tamaño de partícula se determinó utilizando el sistema NANO-flex Microtrac modelo 180°DLS (San Diego, California, EUA) equipado con el software FLEX de Microtrac Inc (Figura 3.2). Este sistema utiliza un método de referencia controlado para determinar el tamaño de partícula basado en la dispersión dinámica de luz (Wang *et al.*, 2010).

De acuerdo a las recomendaciones del proveedor cada muestra fue analizada por triplicado durante 3 min en una dispersión con muestra/agua bidestilada 40% (m/v). Los resultados reportados fueron el promedio de las réplicas.

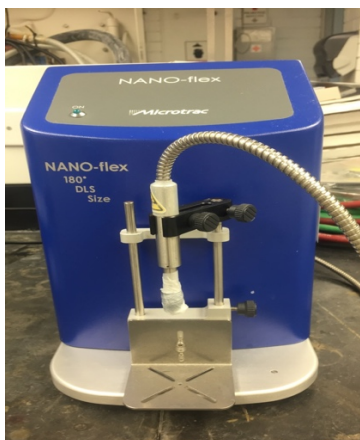


Figura 3.2. Equipo NANO-flex microtrac utilizado para determinar el tamaño de partícula de la materia prima.

3.2.3. Perfil electroforético de la materia prima

Para obtener el perfil electroforético de las materias primas se obtuvieron concentrados proteicos de acuerdo a lo descrito en la sección 3.5 y se dializaron con una membrana de tamaño de corte de 6-8 kDa Spectrum modelo 132670 (Compton, California, EUA), usando agua bidestilada como medio externo (Figura 3.3).

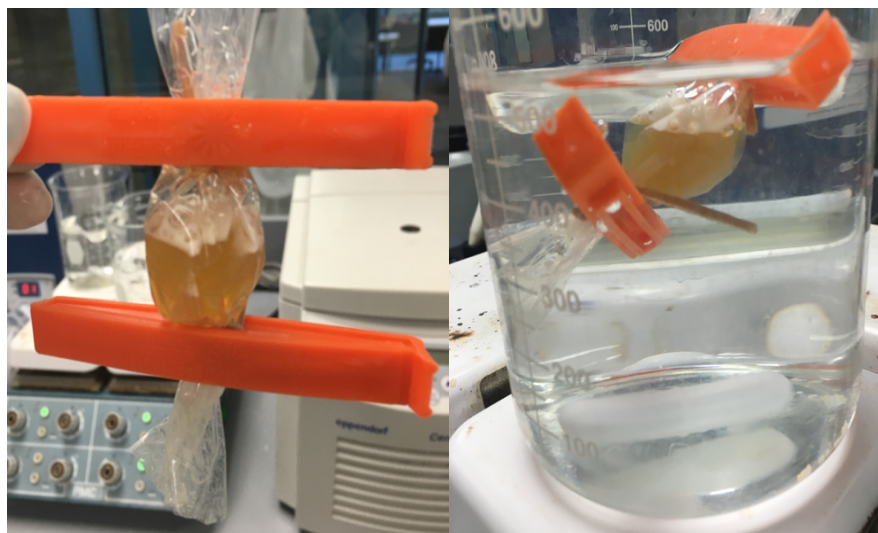


Figura 3.3. Proceso de diálisis de concentrados proteicos.

Se determinó la concentración proteica de los extractos purificados mediante el método de Biuret (Figura 3.4) usando albúmina de suero bovino (BSA, A1933, CAS Number: 9048-46-8, Sigma Aldrich) como estándar de acuerdo lo reportado por Lubran (1978).

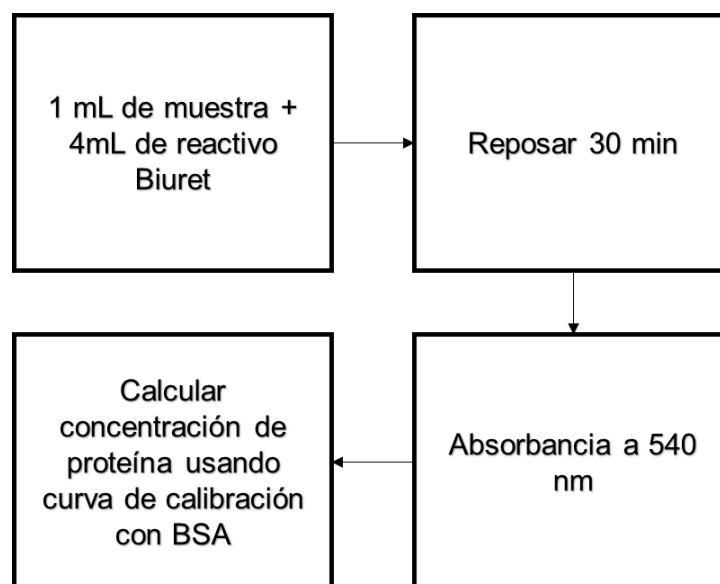


Figura 3.4. Diagrama de flujo: método Biuret para determinación de proteína. BSA: *Bovine Serum Albumin*.

Posteriormente, las muestras purificadas fueron disueltas en agua bidestilada y *buffer* desnaturizante (1:4:5). El *buffer* desnaturizante fue preparado con 5% β -mercaptoetanol, 2% SDS p/v, 10% glicerol v/v, 0.025% azul de bromofenol p/v en Tris-HCl pH 6.8 62.5 mM. Las muestras disueltas fueron hervidas a 100°C durante 5 min y cargadas (16.6 μ g de proteína por carril) en un gel de poliacrilamida de 15% (SDS-PAGE) de acuerdo al protocolo descrito por Laemmli (1970) utilizando una celda de electroforesis Mini-Protean II de Bio-Rad (Hercules, California, EUA).

La separación proteica fue llevada a cabo a 100 V hasta que el colorante alcanzó el borde inferior del gel antes de teñirlo con Azul Brillante de Coomassie R-250 de acuerdo a Neuhoff *et al.* (1985). El gel fue escaneado en un escáner de imágenes GE healthcare (Chicago, Illinois, EUA). Todos los reactivos aquí mencionados fueron adquiridos de Bio-Rad.

3.2.4. Actividad de inhibidor de tripsina (AIT)

La AIT se evaluó sobre extractos obtenidos a partir de 1 g de harina en 50 mL de NaOH 0.01 M. La mezcla fue agitada 3 h (pH 8.4-10.0) antes del análisis (Schwert & Takenaka, 1955; Hamerstrand *et al.*, 1981; Dabhade *et al.*, 2016) con *hidrocloruro de N α -Benzoyl-L-arginina etil ester* (BAEE) como el sustrato de tripsina. El enlace éster de BAEE es hidrolizado por tripsina liberando *N α -Benzoyl-L-arginina*, compuesto que absorbe a 253 nm. La producción de este cromóforo es proporcional al incremento de absorbancia y la actividad de tripsina es calculada como la cantidad de enzima que cataliza un incremento de absorbancia de 0.001 por minuto a 25°C y a pH 7.6.

Todos los reactivos aquí utilizados fueron adquiridos de Sigma Aldrich (tripsina de páncreas bovino, T4799 – CAS Number: 9002-07-7; BAEE, B45000 – CAS Number: 2645-08-1). El espectrofotómetro utilizado fue marca HACH modelo DR-5000 (Loveland, Colorado, EUA).

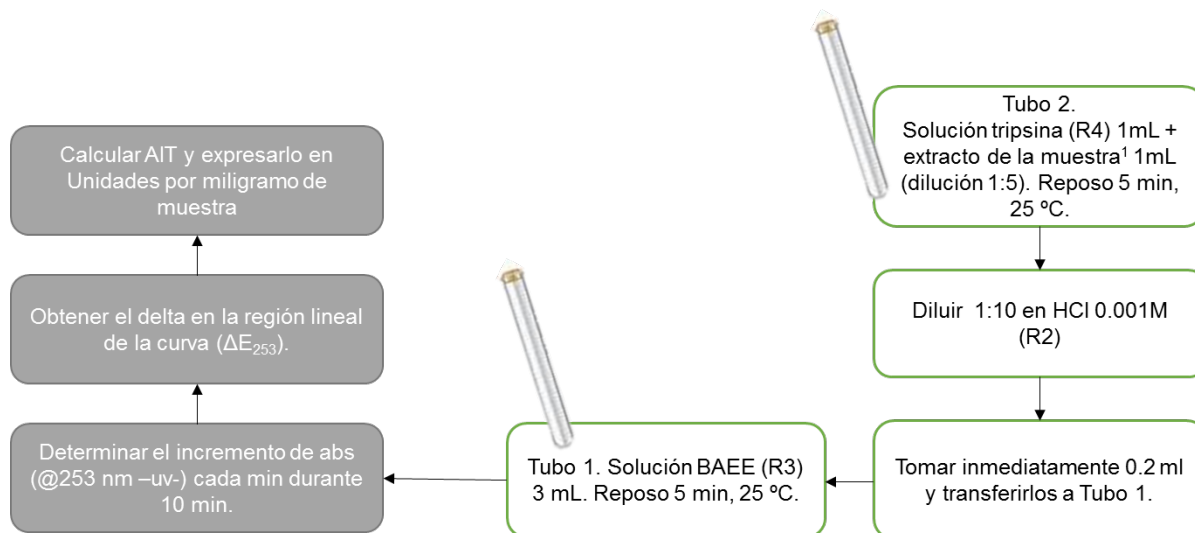


Figura 3.5. Diagrama de flujo para la determinación de la AIT de acuerdo a los protocolos de Schwert & Takenaka (1955) y Dabhade *et al.* (2016).

Para la actividad inicial de tripsina, en lugar de utilizar extracto (muestra), se usó 1 mL de *buffer* de fosfatos (R1). ¹ El extracto fue el obtenido con el protocolo de Hamerstrand *et al.* (1981).

Los reactivos utilizados fueron:

R1: Buffer de fosfato de potasio 0.067 M pH 7.6. Se disolvieron 4.6 g de KH_2PO_4 en 300 mL de agua bidestilada y se aforó a 500 mL. Se disolvieron 7.6 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en 300 mL de agua bidestilada y se aforó a 500 mL. Se tituló el K_2HPO_4 con el KH_2PO_4 a un pH de 7.6.

R2: Solución de ácido clorhídrico 0.001 M. Se agregó 0.1 mL de ácido clorhídrico con gravedad específica de 1.18 g mL^{-1} y se aforó a 1 L con agua bidestilada.

R3: Solución BAEE. Se disolvieron 8.6 mg de BAEE (BAEE, B45000, SIGMA) en 100 mL del *buffer* de fosfatos (R1).

R4: Solución de tripsina. La tripsina (tripsina de páncreas bovino, T4799, SIGMA) se disolvió a una actividad aproximada de 9000 U/mL en 0.001 M HCl (R2) frío. Esta solución se preparó en cada prueba al menos 2 h antes de ser usada y se mantuvo en refrigeración durante la prueba.

Para calcular la AIT se utilizaron las siguientes fórmulas:

1. Actividad de tripsina (AT, U/mL) = ΔE_{253} solución tripsina x 100,000
2. Actividad de tripsina en la muestra (ATM, U/mL) = ΔE_{253} Muestra x 100,000
3. Actividad de inhibidor de tripsina (AIT, U/mL) = (AT – ATM) x 5
4. Actividad de inhibidor de tripsina (AIT, U/mg) = $[\text{AIT (U/mL)} \times 50 / 1000] / 3^a$

^a El número 3 es un factor de conversión requerido para expresar los resultados en las unidades USP (*United States Pharmacopeia*) de la enzima donde 1 unidad USP = 3 unidades BAEE.

El 100,000 usado en AT y ATM resulta de los diferentes factores de dilución usados en el protocolo: 1) factor de dilución de la solución de tripsina con la muestra (2); 2) dilución con HCl 0.001 M (10); 3) dilución BAEE (5) y 4) la definición de unidad de actividad enzimática (0.001). En el caso del factor usado en la AIT (5), este fue el usado para diluir el extracto antes del ensayo y los valores aplicados en la última fórmula (AIT en g de muestra), indican la cantidad de hidróxido de sodio usados en la preparación del extracto a partir de 1000 mg de harina. El último valor de la fórmula (3), se usó para convertir los resultados de unidades BAEE a unidades USP (*United States Pharmacopeia*). En la figura 3.5 se muestran con detalle las etapas usadas para la determinación de AIT.

3.2.5. Determinación del peso molecular de los inhibidores de tripsina de soya o garbanzo.

Previo a la identificación del peso molecular de los ITs de soya o garbanzo por zimografía reversa (sección 3.2.5.3), fue necesario realizar una extracción selectiva de inhibidores de proteasa a partir de la materia prima y posteriormente identificar por electroforesis la presencia de los ya conocidos, en este caso los ITs de soya (~8 y ~21 kDa), para asegurar que la extracción selectiva se hubiera realizado con éxito. A continuación, se explican estos protocolos.

3.2.5.1. Extracción selectiva de inhibidores de tripsina de soya o garbanzo con Polivinilpirrolidona (PVP)

Los inhibidores de proteasa fueron extraídos de la materia prima (harina de soya o garbanzo), de acuerdo al protocolo desarrollado por Pichare & Kachole (1994). Para una extracción óptima de inhibidores de proteasa por este método, se recomienda utilizar harina desgrasada. A la harina desgrasada de soya o garbanzo se le añadió PVP 1% (p/p) (PVP40 – CAS Number: 9003-39-8, Sigma-Aldrich), cuya principal función es la unión y el atrapamiento de polifenoles. La extracción se llevó a cabo con 6 volúmenes de una solución HCl 0.05 M respecto a la harina (p/v). El proceso se extendió durante 2.5 h y fue ejecutado en una incubadora VWR modelo 1500E (Radnor, Pennsylvania, EU) a 115 rpm. La suspensión obtenida fue centrifugada a 3,600 rpm por 10 min para remover material particulado y el sobrenadante fue utilizado para el análisis posterior.

3.2.5.2. Perfil electroforético de los extractos selectivos de inhibidores de tripsina.

Para asegurar la extracción selectiva de los inhibidores de proteasas, se utilizó el extracto obtenido anteriormente para hacer un gel de electroforesis. El extracto fue diafiltrado con una membrana de ultrafiltración de 5 kDa en un equipo Sartoflow Slice 200 Benchtop (Gotinga, Baja Sajonia, Alemania) (Figura 3.6), posteriormente se hizo un ajuste de pH (7 con HCl 15% v/v) y sólidos (11% usando agua bidestilada). La diafiltración se ejecutó a 1.5 bar de presión y con un flujo de 8 mL /min. Detalles del proceso se muestran en la figura 3.7.

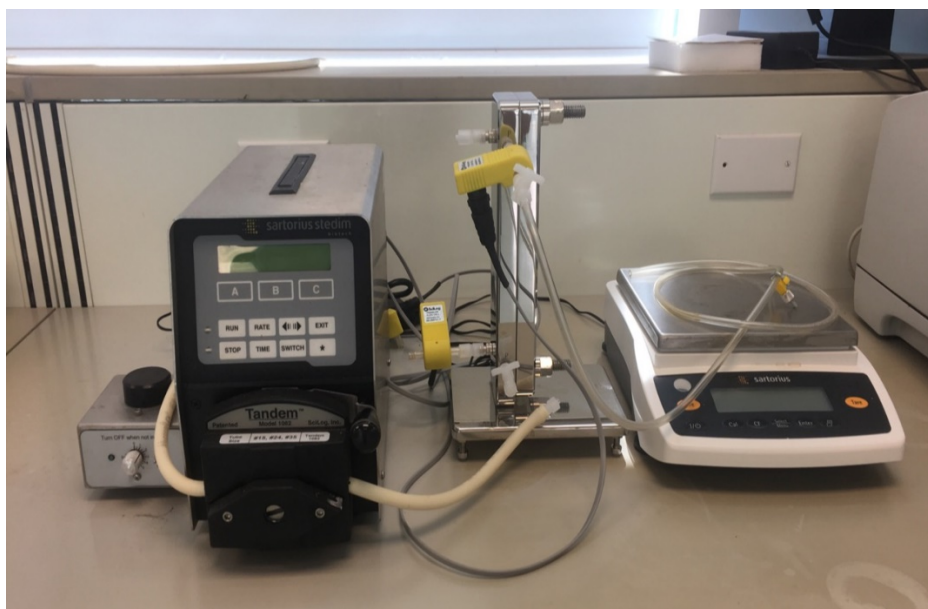


Figura 3.6. Equipo de diafiltración de extractos selectivos de soya o garbanzo (Sartoflow Slice 200 Benchtop).

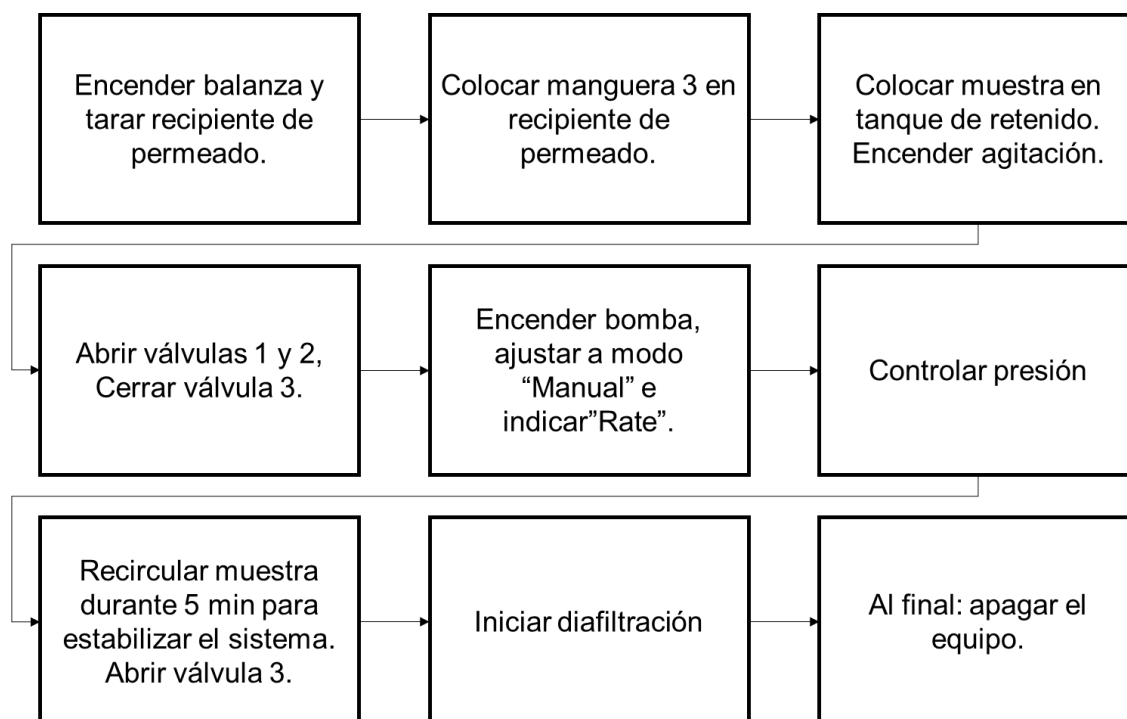


Figura 3.7. Diagrama del proceso de diafiltración utilizando el equipo *Sartoflow Slice 200 Benchtop*.

Una vez purificados los extractos selectivos, se llevó a cabo la electroforesis por dos técnicas:

- a) Gel desnaturalizante de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) con Azul Brillante de Coomassie para teñir de acuerdo al protocolo descrito por Laemmli (1970) y ya detallado en sección 3.2.3.
- b) Gel tricina 10% (SDS-PAGE) con tinción de plata de acuerdo a los protocolos descritos por Scägger (2006) & Chevallet *et al.* (2006). Esta última estrategia se llevó a cabo para obtener una mejor resolución de las proteínas presentes en los extractos ya que la tinción con plata asegura una excelente sensibilidad, además de que el sistema tricina (SDS-PAGE) comúnmente se usa para separar proteínas que se encuentran en el rango de 1-100 kDa. Es el sistema preferido para la resolución de proteínas menores a 30 kDa (el caso de los inhibidores de tripsina).

Es interesante hacer notar que la diferencia en las características de separación de las dos técnicas (acrilamida y tricina) se relaciona de manera directa con la diferencia de valores de pK de los grupos funcionales de estos compuestos químicos, lo que define la movilidad electroforética (Schägger, 2006).

En los geles se evaluaron diferentes concentraciones de proteína (25, 15 y 12 μg) y se cargaron 20 μL por carril (5 μL de *buffer* reductor y extracto proteico, aforado con agua bidestilada).

El protocolo fue desarrollado de acuerdo a lo establecido por Schägger (2006) utilizando geles de tricina 10% (SDS-PAGE) de 1 mm de grosor, corridos a 120 V. El protocolo referente a la tinción con nitrato de plata se describe en el diagrama de la Figura 3.8. Los reactivos aquí utilizados fueron adquiridos de Bio-Rad a excepción de la tricina (T0377 – CAS Number: 5704-04-1, Sigma-Aldrich) y el nitrato de plata (792276 – CAS Number: 7761-88-8, Sigma-Aldrich).

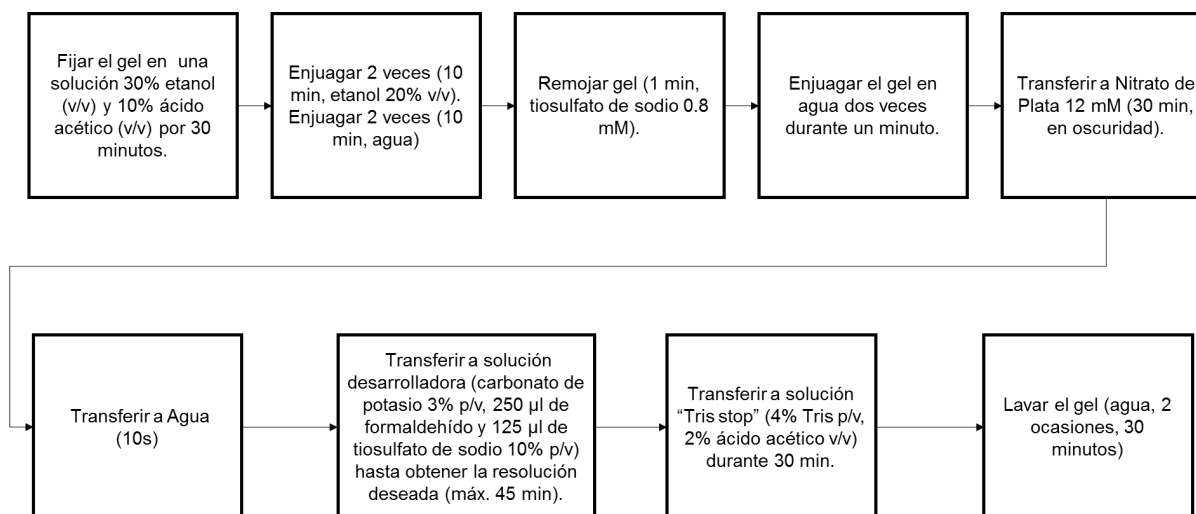


Figura 3.8. Diagrama del proceso de electroforesis por tinción de plata de acuerdo a Chevallet et al. (2006).

3.2.5.3. Determinación de fracciones con actividad de inhibidor de tripsina mediante zimografía reversa.

El método de zimografía reversa es una técnica que permite caracterizar inhibidores de proteasa. Se basa en la separación de estas moléculas en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) que contenga una proteína-substrato copolimerizada en el gel (caseína, MP Biomedical, Solon, Ohio, EU). Este gel es posteriormente incubado con la proteasa blanco, tripsina. La proteína substrato únicamente permanecerá en aquellos espacios donde se encuentran ubicados los inhibidores de tripsina y serán visualizados por medio de tinción.

En esta zimografía se usaron dos métodos de tinción: Azul Brillante de Coomassie (R-250, Bio-Rad) y *Amido Black* (A8181 – CAS Number; 1064-48-8, Sigma-Aldrich). Este último de acuerdo a Miller (2014) asegura, por su coloración, un mayor contraste al momento de visualizar el barrido de los geles y por lo tanto una mejor caracterización de las fracciones con inhibidores de tripsina.

Las muestras (extractos selectivos purificados por ultrafiltración, secciones 3.2.5.1 y 3.2.5.2), se corrieron en geles 18% poliacrilamida (SDS-PAGE) a 120 V de acuerdo a Laemmli (1970) y preparados como se indica en la Tabla 3.1. A excepción de que se llevó a cabo en condiciones no desnaturizantes (el *buffer* de carga no contenía β -mercaptoetanol y las muestras no fueron hervidas previo a la electroforesis). En este caso se usó Tris-tricina (Tris pH 8.9 0.2 M, Tris 0.1 M, tricina 0.1 M y 0.1% SDS pH 8.25) como *buffer* en lugar de Tris-glicina,

ya que el primero asegura una mejor resolución de péptidos y proteínas de bajo peso molecular, como lo son los inhibidores de tripsina.

Se probaron concentraciones entre 73.3 y 0.50 μg (en cada carril se cargaron 20 μL que incluyeron 5 μL de *buffer* de carga y agua cuando se requirió aforar). El resto de reactivos aquí utilizados, fueron adquiridos de Bio-Rad a excepción de la acrilamida (A3574 – Cas Number: 79-06-1, Sigma-Aldrich), el persulfato de amonio (A3678 – Cas Number: 7727-54-0, Sigma-Aldrich) y el TEMED (T9281 – Cas Number: 110-18-9, Sigma-Aldrich).

Tabla 3.1. Fórmula para preparación de geles de acrilamida al 18% SDS-PAGE con caseína copolimerizada.

% gel	18%	Concentrador
# de geles	1	1
Agua	114 μL	1.4 mL
Acrilamida 30% (29:1)	3.6 mL	330 μL
Tris pH 8.8 0 6.8	1.56 mL	250 μL
Caseína 10% (p/v)	600 μL	250 μL
SDS 10%	60 μL	20 μL
PSA 10%	60 μL	20 μL
TEMED	6 μL	5 μL

El protocolo de zimografía reversa que siguió la electroforesis se muestra en el diagrama de la Figura 3.9 y está basado en los métodos desarrollados por Hanspal *et al.* (1983) y Le & Katunuma (2004).

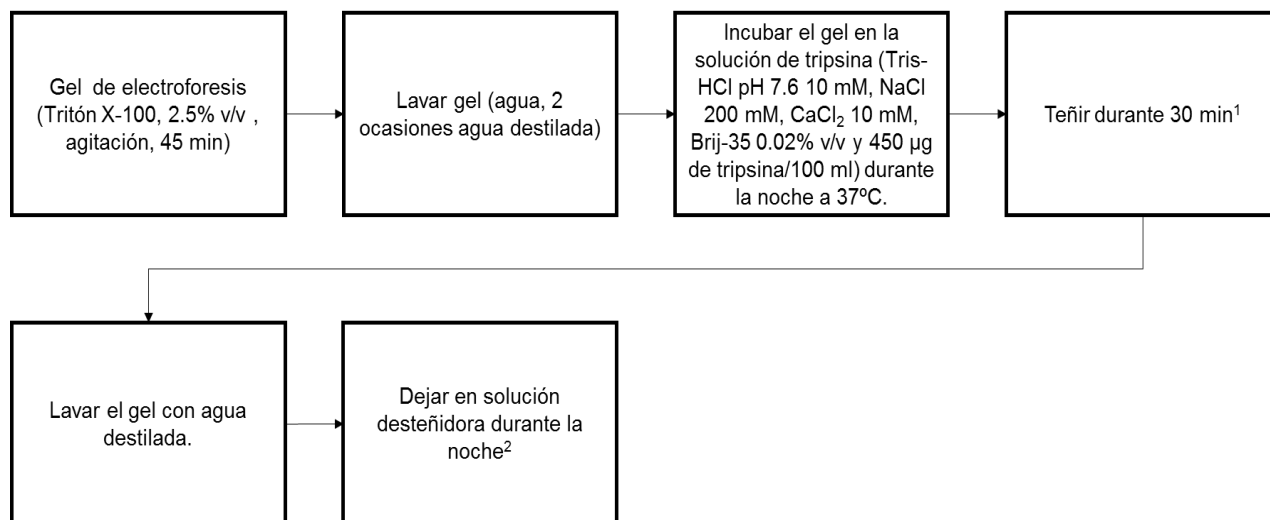


Figura 3.9. Protocolo de zimografía inversa que siguió a la electroforesis. Desarrollado por Hanspal *et al.* (1982) y Le & Katunuma (2003).

¹ a) Azul Brillante de Coomassie (metanol 40% v/v, ácido acético 7% v/v y Coomassie Brilliant Blue R-250 0.025% v/v); b) *Amido Black* (ácido acético 7.5% v/v, metanol 20% v/v y *Amido Black* 0.1% v/v). ² a) Azul Brillante de Coomassie (metanol 30% v/v y ácido acético 10% v/v); b) *Amido Black* (ácido acético 7% v/v).

3.3. Inactivación de inhibidores de tripsina de harina de soya o garbanzo con tratamiento térmico.

Las harinas de soya o garbanzo fueron dispersada en agua bidestilada a una concentración de 10% (p/v) y agitadas 10 min a temperatura ambiente. Estas dispersiones se sometieron a tratamientos térmicos de acuerdo a las siguientes condiciones:

- a) Soya: la dispersión se colocó en baño de agua (80°C, 2 h. Delta modelo H6, Iztacalco, CDMX, México). Las condiciones se eligieron de acuerdo a lo reportado por autores como: Collins & Beaty (1980); Barac & Stanojević (2005); Egounlety & Aworth (2003) y Machado *et al.* (2008).
- b) Garbanzo: la dispersión fue tratada a 121°C, 15 lb, 15 min (autoclave Yamato modelo SE 510, Tokio, Japón). El ciclo completo tuvo una duración de 2 h. Las condiciones se basaron, al igual que en el caso de soya, en referencias bibliográficas para reducir significativamente la AIT de esta leguminosa en particular, la cual requiere temperaturas superiores a los 95°C (Alajaji & El-Adawy, 2006).

3.4. Inactivación de inhibidores de tripsina de harina de soya o garbanzo con agentes reductores.

Las harinas de soya y garbanzo se trataron con dos agentes reductores: 1) metabisulfito de sodio (MBSS) (S1516 – CAS Number: 7681-57-5, Sigma-Aldrich) y 2) L-cisteína (hidrocloruro de L-cisteína monohidratado, 778451 – CAS Number: 7048-04-6, Sigma-Aldrich):

- a) Tratamiento con MBSS: las harinas fueron dispersadas al 10% p/v en una solución 1 mM de MBSS y se mantuvieron 2 h temperatura ambiente.
- b) Tratamiento con L-cisteína: las harinas fueron dispersadas al 10% p/v en una solución de L-cisteína 0.41 mM y se mantuvieron 2 h a temperatura ambiente.

3.5. Inactivación de inhibidores de tripsina de harina de soya o garbanzo con tratamiento térmico y agentes reductores

Se llevó a cabo un proceso idéntico al de la sección 3.3., excepto que en lugar de agua destilada se usó: a) solución de MBSS 1 mM o b) de cisteína (0.41 mM).

3.6. Obtención de concentrados proteicos de harina de soya o garbanzo tratada y sin tratar.

3.6.1. Extracción de aislados proteicos de soya o garbanzo por el método de punto isoeléctrico

Para la producción de concentrados proteicos a partir de harina de soya o de garbanzo, se usó el método de precipitación isoeléctrica reportado por Ochoa-Rivas (2017). Detalles de este proceso se muestran en la Figura 3.10.

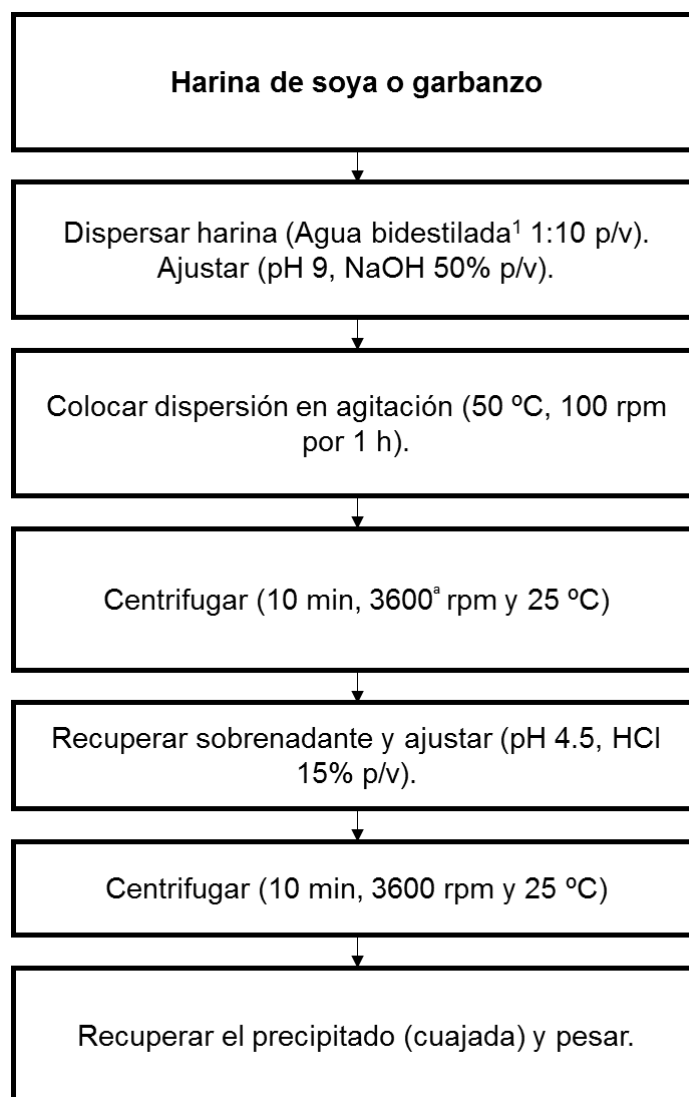


Figura 3.10. Proceso de producción de concentrados proteicos por precipitación isoeléctrica a partir de harina de soja o garbanzo.

¹ En el caso de los controles y el tratamiento térmico, la dispersión fue realizada en agua bidestilada y en los tratamientos con agentes reductores se hicieron en: a) MBSS 1 mM o b) L- cisteína 0.41 mM.

Una vez obtenida y pesada la cuajada, se determinó humedad y contenido de proteína por los métodos descritos en la sección 3.2.1. El rendimiento de extracción proteica y la pureza fueron calculados con las siguientes fórmulas:

$\% \text{ de extracción proteica} = \text{g de proteína en la cuajada} / \text{g de proteína en harina} * 100$

$\% \text{ de pureza} = \text{g de proteína en cuajada} / \text{g de cuajada} * 100$

3.6.2. Secado de concentrados proteicos de soya o garbanzo

Una vez obtenido el pellet proteico (sección 3.6.1.), estos fueron ajustados a pH 7.0 (NaOH 50% v/v) y homogenizados en agua bidestilada al 10% de sólidos (p/v) con ayuda de un mezclador de alta velocidad (Ultra Turrax T18 IKA, Staufen, Baden-Württemberg, Alemania). Las suspensiones fueron deshidratadas en un secador por aspersion (ADL311S, Yamato, Tokio, Japón, Figura 3.11) a una presión de 0.13 MPa, temperatura de 180°C y 60°C en el aire de entrada y salida respectivamente y flujo de alimentación de 6.84 mL/min.



Figura 3.11. Secador por aspersion ADL311S.

3.7. Caracterización de concentrados proteicos de soya (CPS) o garbanzo (CPG) tratados y sin tratar.

3.7.1. Actividad de inhibidor de tripsina de CPS y CPG.

La actividad de inhibidor de tripsina de los CPS y CPG fue determinada como se indicó en la sección 3.2.4.

3.7.2. Caracterización funcional y digestibilidad *in vitro* de CPS y CPG

3.7.2.1. ISA e IAA

El Índice de Solubilidad en Agua (ISA) y el Índice de Absorción en Agua (IAA) se determinaron de manera simultánea de acuerdo a la metodología propuesta por Cheftel *et al.* (1989) y detallada en el diagrama presentado en la Figura 3.12.

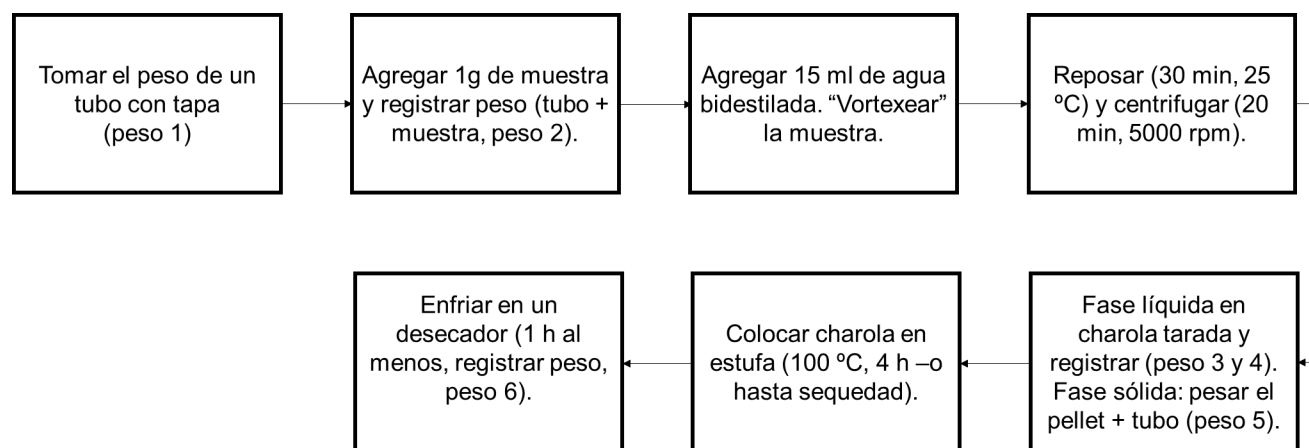


Figura 3.12. Protocolo de determinación de ISA e IAA.

Los resultados se obtuvieron con las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ ISA} = (\text{peso 6} - \text{peso 3}) / (\text{peso 2} - \text{peso 1}) * 100$$

$$\% \text{ IAA} = (\text{peso 5} - \text{peso 1}) / (\text{peso 2} - \text{peso 1})$$

3.7.2.2. ISN

El Índice de Solubilidad de Nitrógeno (ISN) se determinó de acuerdo al método oficial de la AOCS Ba 11-65 (2006) y detallado en el diagrama presentado en la Figura 3.13.

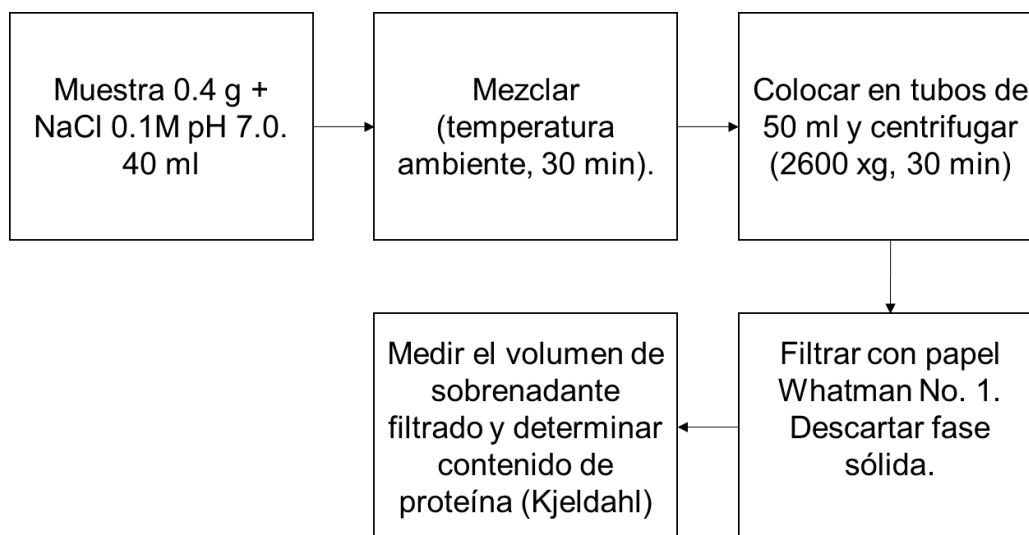


Figura 3.13. Protocolo de determinación de ISN.

Los resultados se obtuvieron por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ISN} = \text{proteína en sobrenadante} / \text{proteína total en la muestra} * 100$$

3.7.2.3. Digestibilidad *in vitro* de la proteína (IVPD)

La digestibilidad *in vitro* de la proteína (IVPD por sus siglas en inglés) fue determinada mediante la técnica multienzimática propuesta por Hsu *et al.* (1997). Las enzimas utilizadas fueron adquiridas de Sigma Aldrich: tripsina de páncreas porcino tipo IX-S, quimiotripsina tipo II de páncreas bovino y proteasa de *Streptomyces griseus* tipo XIV, esta última como sustituto a la peptidasa de mucosa intestinal porcina, dado que fue descontinuada por Sigma. Ha sido probado que la actividad biológica de estas dos enzimas es la misma y que el cambio de una por otra no genera una diferencia en los resultados (Hervera *et al.*, 2009). El proceso seguido para determinar este parámetro se detalla en el diagrama presentando en la Figura 3.14.

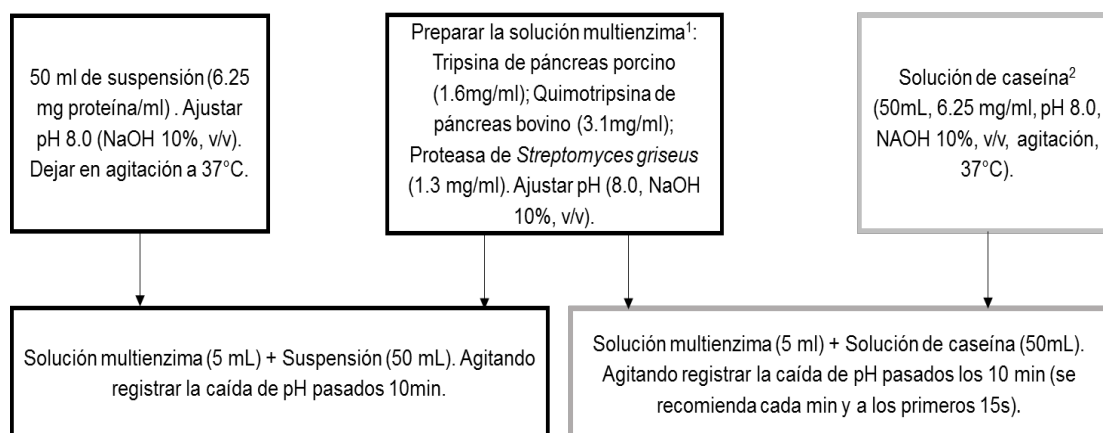


Figura 3.14. Protocolo para determinar IVPD.

¹ La solución multienzima se preparó cada vez que se ejecutó el protocolo.

² la solución de caseína es tomada como control y necesaria para el cálculo posterior.

Se calculó el porcentaje de digestibilidad mediante la siguiente fórmula (Sultana *et al.*, 2010):

$$\% \text{ IVPD} = \Delta \text{ pH de la muestra} / \Delta \text{ pH de la caseína} \times 100$$

Donde: Δ pH se refiere al pH registrado al inicio menos el pH registrado después de 10 min.

3.7.3 Perfil de aminoácidos de CPS y CPG

El análisis de composición de aminoácidos de los concentrados proteicos (controles y tratamientos), se realizó en un laboratorio externo (Experimental Station Chemical Laboratories, Universidad de Missouri) de acuerdo al método oficial de la AOAC (982.30, 1992).

3.7.4. Estudio de la estructura secundaria de CPS y CPG por

FTIR

Para el estudio de la estructura secundaria, se usó Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés). El equipo usado fue un ATR-FTIR Spectrum 1 de Perkin Elmer (Norwalk, Connecticut, EU). Se obtuvieron los datos del espectro en modo de absorbancia en la región 4000 a 650 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} . La región amida I (1690 a 1600 cm^{-1}) fue analizada mediante deconvolución ejecutada con el software Spectrum

1 (v. 5.3.0). Se obtuvieron los porcentajes para: lámina- β antiparalela y paralela, hélice 3_{10} , α -hélice, estructuras desordenadas y cadenas agregadas de acuerdo a Jackson & Mantsch (1995).

3.7.5. Perfil electroforético de CPS y CPG

El perfil electroforético de los concentrados proteicos (controles y tratamientos) se determinó de acuerdo al protocolo desarrollado por Laemmli (1970) y descrito en la sección 3.2.3 en condiciones no desnaturizantes (el *buffer* de carga no contenía β -mercaptoetanol y las muestras no fueron hervidas previo a la electroforesis). Se utilizaron 15 μg de proteína por carril.

3.7.6. Microscopía de Barrido Electrónico (SEM) para evaluación de microestructura de CPS y CPG

Para este análisis, se colocó una capa fina de los concentrados proteicos sobre una cinta de carbono adhesiva en ambos lados y montada previamente en un porta-muestras de aluminio (Figura 3.15a). Las partículas no adheridas a la cinta fueron removidas con aire comprimido antes de recubrir con una delgada capa (5 nm) de oro (Quorum modelo Q150R ES, Laughton, Lewes, Reino Unido) (Figura 3.15b). Los portamuestras se colocaron en un microscopio de barrido electrónico (ZEISS modelo EVO MA25, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemania) con detector de electrones secundarios y una resolución de x1000 o x1500 (Figura 3.15c).

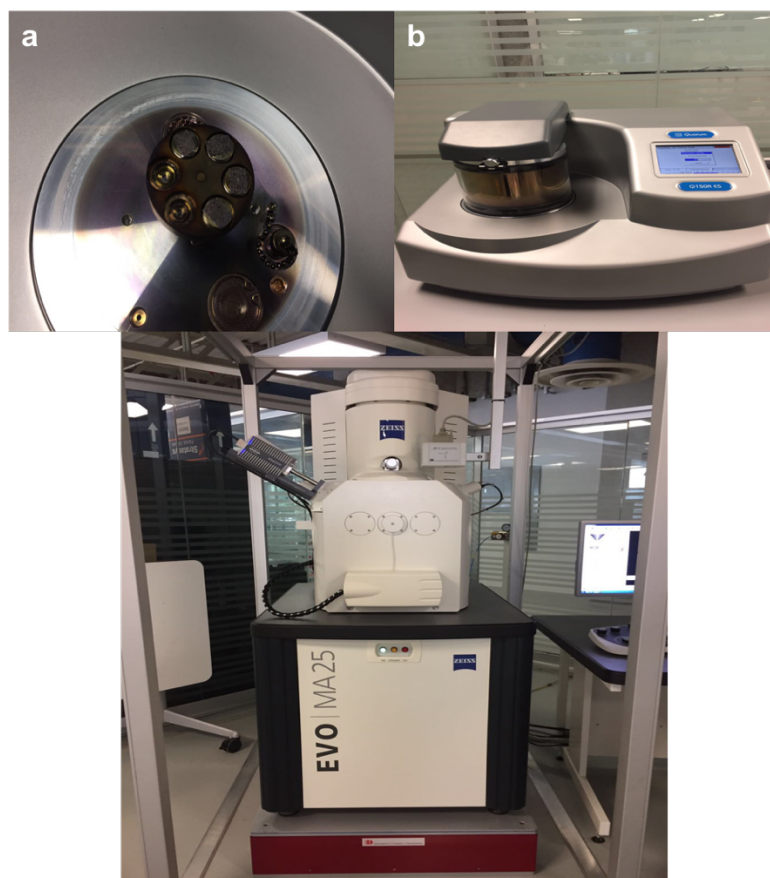


Figura 3.15. a) Muestras adheridas a cinta de carbono; b) Equipo para recubrir con oro las muestras analizadas por SEM; c) Microscopio de Barrido Electrónico (SEM).

3.7.7. Determinación actividad de agua (a_w) y propiedades de flujo de CPS y CPG.

3.7.7.1. Actividad de agua (a_w)

Se determinó la actividad de agua en las muestras de acuerdo a Savi *et al.* (2014). Se utilizó un equipo Aqua Lab modelo 4TE (Pullman, Washington, EU). Cada muestra se analizó por triplicado.

3.7.7.2. Densidad de bulto

La densidad de bulto (ρ_b) se determinó por triplicado de acuerdo a la metodología propuesta por Shah *et al.* (2008). Se vertieron 2 g de cada muestra en probetas de 10 mL. Se registró el volumen ocupado y se calculó el cociente de la masa/volumen ocupado (g/mL).

3.7.7.3. Densidad compactada

La densidad compactada (ρ_c) se determinó por triplicado de acuerdo a la metodología propuesta por Shah *et al.* (2008). Se obtuvo al verter 2 g de cada muestra en probetas de 10 mL. Se asentó cada probeta un promedio de 250 veces o hasta que el volumen de la muestra no mostrara ningún cambio. Se registró el volumen ocupado y se calculó el cociente de la masa/volumen ocupado (g/mL).

3.7.7.4. Índice de Hausner o de fluidez

El índice de Hausner (IH), determinado por triplicado de acuerdo a la metodología propuesta por Shah *et al.* (2008), se obtuvo sustituyendo los valores de densidad de bulto (ρ_b) y densidad compactada (ρ_c) en la siguiente fórmula reportada por Shah *et al.* (2008):

$$IH = \rho_c / \rho_b$$

3.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó con análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias de medias fueron determinadas utilizando el test de Tukey ($\alpha=0.05$, Minitab versión 17, LTD. Coventry, Reino Unido).

Capítulo 4. Resultados y Discusión

4.1. Características de materia prima

Dado que, la composición de la materia prima influye en los procesos de extracción y producción de concentrados proteicos, así como en la inactivación térmica y/o química de IT, se llevó a cabo la caracterización de harina de soya de garbanzo.

4.1.1. Análisis proximal

La composición fisicoquímica de la harina de soya utilizada como materia prima, se muestra en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Composición fisicoquímica de harina de soya usada como materia prima.¹

Componentes	Contenido, %
Humedad	8.05 ± 0.02
Proteína cruda (N x 6.25)	47.02 ± 0.47
Grasa Cruda	0.71 ± 0.05
Fibra cruda	4.03 ²
Extracto libre de nitrógeno	33.90 ± 0.51
Cenizas	6.29 ± 0.02

¹Base húmeda. Todos los resultados provienen del promedio de al menos tres réplicas ± desviación estándar. ²Dato tomado de la ficha técnica del fabricante, no se cuenta con desviación estándar.

La soya es una leguminosa que se caracteriza porque el mayor porcentaje de su peso es proteína, lo cual se confirmó con los resultados mostrados en la tabla anterior (47% del peso total de la muestra). La fracción más baja fue grasa cruda, la que a pesar de ser originalmente de alrededor de 19%, se vió reducida a 0.71% por el proceso de desgrasado previo a su comercialización. Los datos anteriores concuerdan con lo reportado por Mashayekh *et al.* (2008) para harina comercial de soya. Con relación a los carbohidratos, la soya contiene hasta un 35%, similar a lo mostrado en la tabla 4.1 al sumar fibra cruda y extracto libre de nitrógeno, fracción en la que destacan compuestos como sacarosa y estaquiosa (Grieshop *et al.*, 2003).

En cuanto al garbanzo, la caracterización fisicoquímica fue ejecutada en el grano entero pero también en la testa y los cotiledones por separado (Figura 4.1). Con esta caracterización se

buscaba descartar que con la remoción de la testa se perdiera un porcentaje importante de la fracción proteica (de la cual forman parte los ITs).

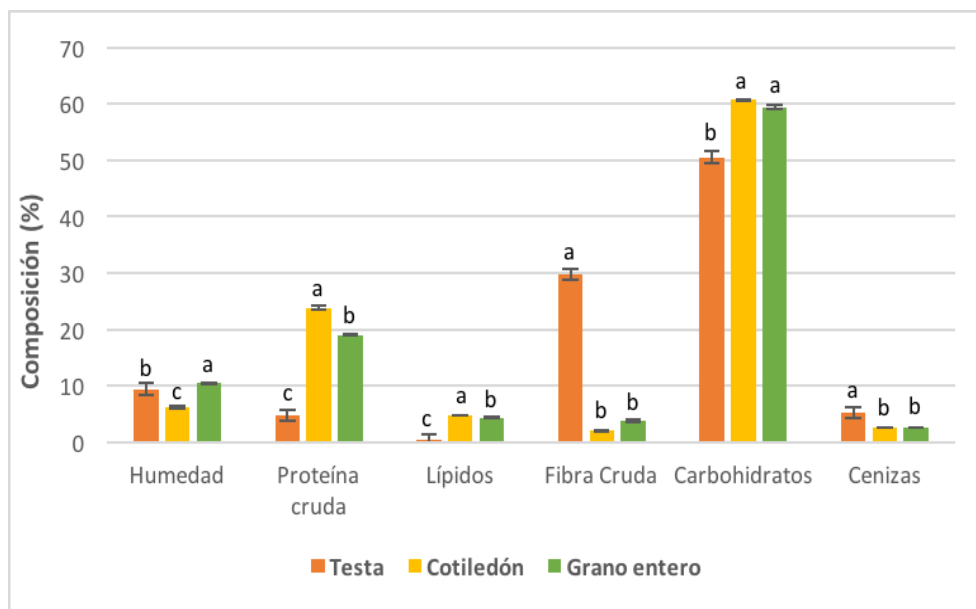


Figura 4.1. Composición fisicoquímica (%) de fracciones anatómicas de garbanzo Blanco Sinaloa, así como del grano entero.

Superíndices iguales entre columnas de un mismo parámetro indican semejanza estadística ($P > 0.05$).

En lo que respecta al garbanzo, la fracción más abundante correspondió a los carbohidratos. Para el grano entero se obtuvo un valor de 59.93%, donde hasta el 80% de esta fracción se ha reportado como almidón. En cuanto al contenido de proteína, lípidos, cenizas y fibra cruda (18.97, 4.26, 2.64 y 3.74% respectivamente) los resultados fueron semejantes a lo ya reportado para variedades de garbanzo mexicanas (Sotelo *et al.*, 1987; Kaur & Singh, 2005; De Almeida Costa *et al.*, 2006).

Al observar los resultados del cotiledón, tanto la fracción proteica como la lipídica aumentaron significativamente comparado con el grano entero (23.86 y 4.79% respectivamente). Por otro lado, la humedad se vio significativamente disminuida, lo que se puede asociar al proceso de decorticado, que como fue descrito en la sección 3.1, pasó por una etapa de secado.

El porcentaje de proteína en la testa fue muy bajo (4.69%), por lo que las pérdidas de inhibidores de tripsina correspondientes a esta fracción deben ser pequeñas. Este resultado coincide con lo reportado por Sreerama *et al.* (2010) quienes establecieron que, para otras variedades de garbanzo, el porcentaje de AIT de la testa corresponde únicamente alrededor del

10% del total. De igual manera, el contenido de fibra coincide con lo reportado por estos autores, quienes señalan que la testa es la fracción anatómica de garbanzo con mayor porcentaje de fibra cruda (hasta 28%).

4.1.2. Distribución del tamaño de partícula de harina de soya o garbanzo

La distribución del tamaño de partícula es un parámetro ampliamente utilizado para caracterizar sistemas dispersos, principalmente polvos. En la industria de alimentos este dato está directamente involucrado en operaciones unitarias como mezclado, aglomeración, deshidratación y filtración, así que su conocimiento favorece el desarrollo de condiciones óptimas de procesamiento. Además, el tamaño de partícula en harinas de cereales y leguminosas es un factor importante que puede influir en la funcionalidad de las mismas (Vishnoi & Mohapatra *et al.*, 2017). La distribución de partícula de las harinas de soya y garbanzo en solución se muestra en la Figura 4.2.

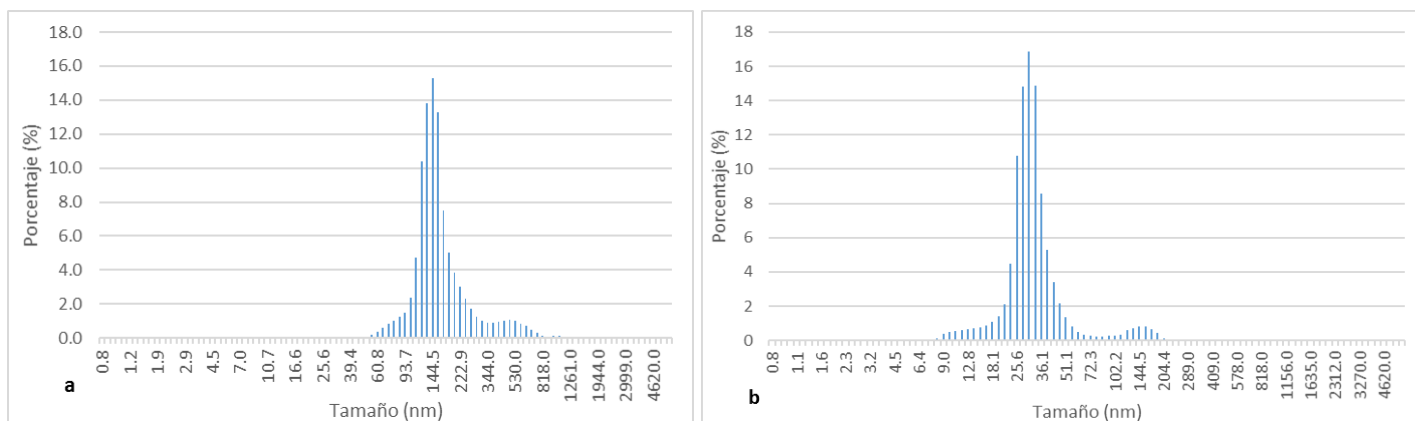


Figura 4.2. Distribución del tamaño de partículas de soluciones de: a) harina de soya y b) garbanzo.

La harina de soya presentó en promedio partículas de entre 51.1 a 365 nm, donde el 70% de estas se encontraron en un rango de 111 a 222 nm. Estos resultados son menores a los encontrados en la literatura donde se reportan valores que van desde los 30 000 hasta los 156 000 nm (Bhattacharya & Jena, 2007; Dhen *et al.*, 2016). Esta diferencia puede deberse a que la harina fue casi totalmente desgrasada durante su producción y se sabe que, a menor contenido de grasa, menor es el tamaño de las partículas formadas (Melo-Santa, 2012), además de que el

análisis se ejecutó en una solución acuosa, donde a mayor contenido de agua, el tamaño promedio de las partículas disminuye (Shen, 1993).

Para la harina de garbanzo, el tamaño de partícula obtenido fue menor que en soya y menor a lo reportado anteriormente para esta semilla (25 000 a 37 000 nm), presentándose partículas de 7.6 a 187.4 nm, donde el 58% se encontraron en un rango de 25 a 43 nm. Esto puede estar asociada a los métodos de obtención, ya que, en la harina de garbanzo, como descrito en la sección 3.1. se utilizó un molino UDY cyclone, para el cual se ha reportado que se obtienen partículas mucho más finas al comparar con otro tipo de molinos (Gaines *et al.*, 1987).

4.1.3. Perfil electroforético de soya y diferentes variedades de garbanzo

La electroforesis se llevó a cabo con la finalidad de identificar el patrón de proteínas característico de cada leguminosa. Estos perfiles se presentan en la Figura 4.3.

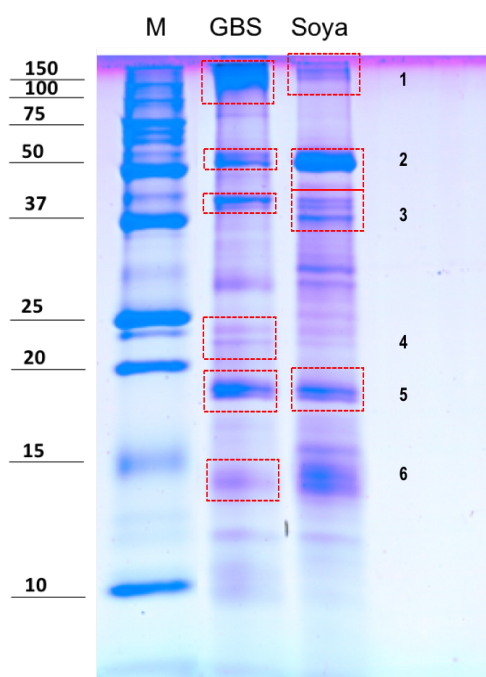


Figura 4.3. Perfil electroforético (SDS PAGE, acrilamida 15%, tinción coomassie) de garbanzo Blanco Sinaloa (GBS) y soya (purificados por diálisis).

En soya: ¹ agregados de subunidades α' y α de β -conglucina; ² subunidad β de β -conglucina; ³ subunidades ácidas de glicina; ⁵ subunidades básicas de glicina. En garbanzo: ¹ agregados de subunidades de legumina y vicilina; ² y ⁵ subunidades de vicilina; ³, ⁴ y ⁶ subunidades de legumina. El carril M corresponde al marcador de pesos moleculares.

En cuanto a soya, el perfil electroforético coincide con lo reportado para proteína obtenida por el método de punto isoeléctrico, donde se observaron bandas de aproximadamente 15, 18, 20, 28, 38, 50 y 150 kDa, correspondientes algunas a subunidades de β -conglucina 7S y glicina 11S, las proteínas de almacenamiento más abundantes de esta semilla (hasta el 70% de las proteínas totales). Las bandas poco menores a 20 kDa corresponden a subunidades básicas de glicina mientras que la de 38 kDa han sido asociadas a las unidades ácidas de esta misma proteína. Por otro lado, la banda de 50 kDa representa a la subunidad β de β -conglucina. Las bandas encontradas alrededor de los 15 y 28 kDa también han sido previamente reportadas, sin embargo, no se han asociado con alguna proteína o subunidad en particular. En cuanto a las subunidades α' y α de β -conglucina, de 75 y 80 kDa respectivamente, no son observadas de manera individual, esto puede deberse a que durante las condiciones desnaturizantes por el uso de mercaptoetanol, pudo dar lugar a formación de agregados entre estas subunidades (180 a 190 kDa) e incluso a agregados de las mismas con polipéptidos de glicina (115 a 120 kDa). Estas bandas pueden corresponder a las observadas en el gel alrededor de los 150 kDa (Sathe *et al.*, 1987; Petrucelli & Añón, 1995; Kapchie *et al.*, 2012; Chove *et al.*, 2001).

El perfil electroforético de garbanzo también coincide con lo encontrado en la literatura, donde se observan bandas de entre 11 y 150 kDa. En este caso se observaron en pesos aproximados de 150, entre 37 a 50, 20 a 25 y 15 a 11 kDa. Estas bandas corresponden a subunidades de las proteínas de almacenamiento del garbanzo, cuyo perfil suele componerse de globulinas (56%), glutelinas (18.1%), albúminas (12%) y prolaminas (2.8%). Las globulinas corresponden a legumina 11S (320-400 kDa) y a vicilina 7S (145-190 kDa). Por lo reportado en la literatura es posible identificar las bandas encontradas donde las de aproximadamente 50, 18 y 15 kDa corresponden a subunidades de vicilina, mientras que las de 40, 23 y 22 kDa corresponden a subunidades de legumina. En cuanto a las bandas que se encuentran en la parte superior correspondientes al carril de GBS (150 kDa), igual que para el caso de soya, son agregados formados por la interacción entre distintas subunidades de las proteínas antes mencionadas (Wang *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2016).

Con la finalidad de estandarizar las condiciones de electroforesis, se evaluó también el perfil proteico de variedades de garbanzo de origen indio y pertenecientes al tipo Desi. Los resultados se muestran en la Figura 4.4.

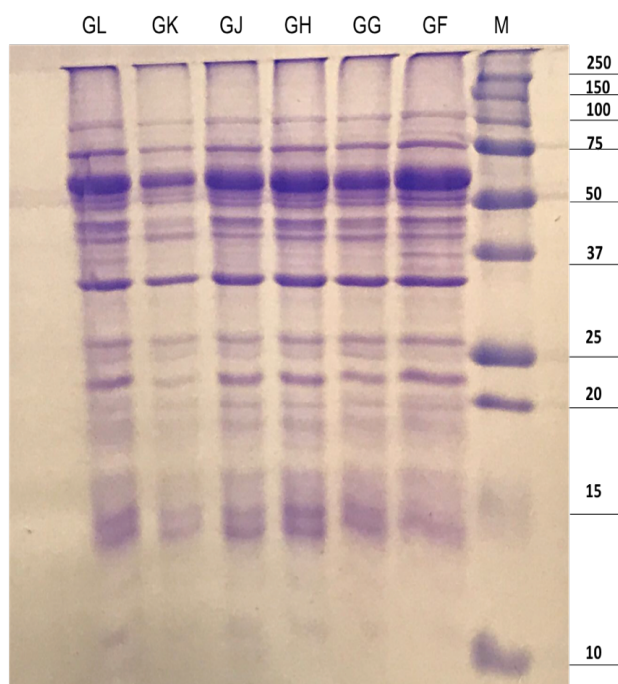


Figura 4.4. Perfil electroforético (SDS PAGE, acrilamida 15%, tinción coomassie) de diferentes variedades de garbanzo tipo Desi (L, K, J, H, G y F) (purificados por diálisis).

El carril M corresponde al marcador de pesos moleculares.

El patrón de bandeo encontrado en estas variedades fue en general muy parecido entre sí, presentando casi las mismas bandas y la misma intensidad de cada una de ellas. Comparando estas variedades con el perfil encontrado en GBS, todas presentan las bandas encontradas en este último, a excepción de la acumulación de agregados de subunidades alrededor de los 150 kDa los cuales aparentemente no fueron formados y posiblemente corrieron de manera individual a lo largo de este.

En cuanto a las bandas que aparecen en las variedades Desi y que no se encuentran en el perfil de GBS, estas corresponden a pesos aproximados de 100 y 75 kDa. La primera puede corresponder a la lipoxigenasa característica de esta semilla (92.8 kDa) y la segunda a subunidades de vicilina (Chang *et al.*, 2012).

Para todas estas variedades (Figura 4.4) y para GBS (Figura 4.3), las bandas alrededor de 11 kDa usualmente corresponden a inhibidores de tripsina. Estas diferencias menores entre el perfil proteico de GBS y los garbanzos indios, reportadas por Wang *et al.* (2010), están asociadas al tipo de garbanzo al que cada uno pertenece (Kabuli y Desi respectivamente).

4.1.4. Actividad de inhibidor de tripsina (AIT) de soya y diferentes variedades de garbanzo

Se determinó la AIT de las materias primas y adicionalmente se evaluó en las variedades de garbanzo indias con la intención de obtener más datos que permitieran comparar los resultados de AIT de garbanzo tipo Kabuli (GBS) (Figura 4.5).

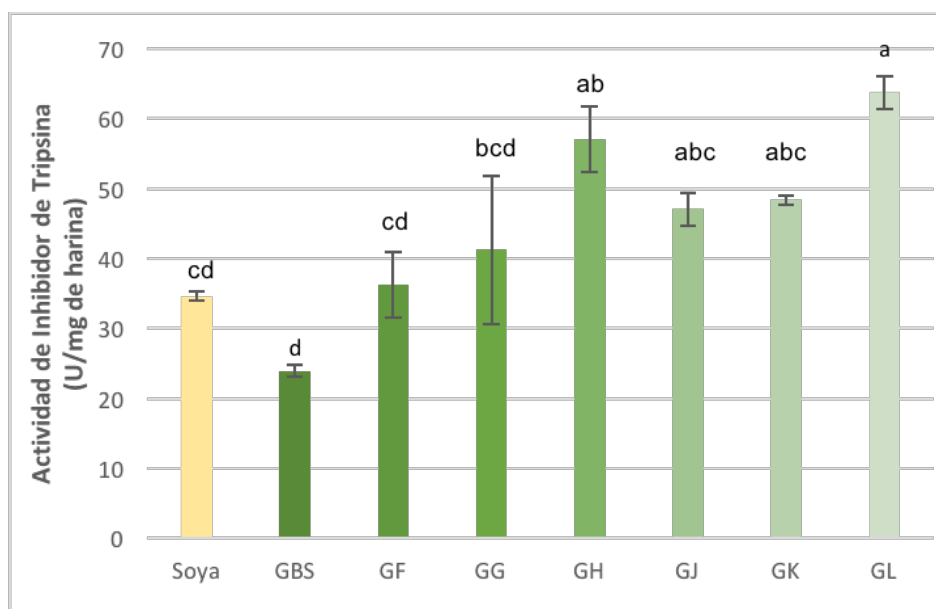


Figura 4.5. Actividad de inhibidor de tripsina (U/mg) de harina de soya, garbanzo Blanco Sinaloa (GBS) y otras variedades de garbanzo (F, G, H, J, K y L). Estas últimas, a diferencia de GBS fueron tipo Desi.

Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$).

La soya es una de las leguminosas con mayor actividad de inhibidores de proteasa, representando incluso del 2 al 6% de su proteína total. Para el caso de harina de soya, esta llega a tener una AIT que va desde 21.7 hasta 94.1 U/mg, de acuerdo a la variedad, lugar de cosecha, clima, las prácticas agrícolas y el procesamiento que se siguió para obtener la harina (Yalcin & Basman, 2015; Vagadia *et al.*, 2017). La harina de soya utilizada en este trabajo mostró una AIT de 34.64 U/mg (Figura 4.5).

Para garbanzo, se ha reportado que la AIT va desde 15 hasta 60.4 U/mg (Singh & Jambunathan, 1981; Guillamón *et al.*, 2008). En cuanto a las diferentes variedades de garbanzo, todas las de tipo Desi presentaron una mayor AIT que GBS, en especial la L (63.75 U/mg). Estas variaciones, pueden deberse a factores como el lugar de cosecha, clima e incluso el año de

cultivo, pero por supuesto principalmente al tipo de garbanzo. El garbanzo Kabuli contiene menos fibra, más almidón y grasa y mejor valor biológico que el tipo Desi, el cual está asociado a un contenido elevado de factores antinutrientales, incluyendo ITs (Bhagyawant & Srivastava, 2008; Wang *et al.*, 2010).

4.1.5 Peso molecular de ITs de soya o garbanzo

En diversos estudios se ha encontrado que el tamaño de los ITs, o al menos la migración que se observa en los geles de electroforesis, tanto de leguminosas como de otras matrices, está directamente relacionado con la estructura de los mismos, principalmente con el número de puentes disulfuro (Giri *et al.*, 2003). Con la intención de caracterizar las fracciones proteicas con actividad de inhibidor de tripsina en soya, pero sobre todo en garbanzo, se ejecutó una zimografía reversa.

4.1.5.1. Perfil electroforético de extractos selectivos de soya o garbanzo

La primera etapa de la zimografía involucra la elaboración de un gel espejo (Figura 4.6), en el cual se pueden observar las fracciones obtenidas de manera selectiva usando PVP en el medio.

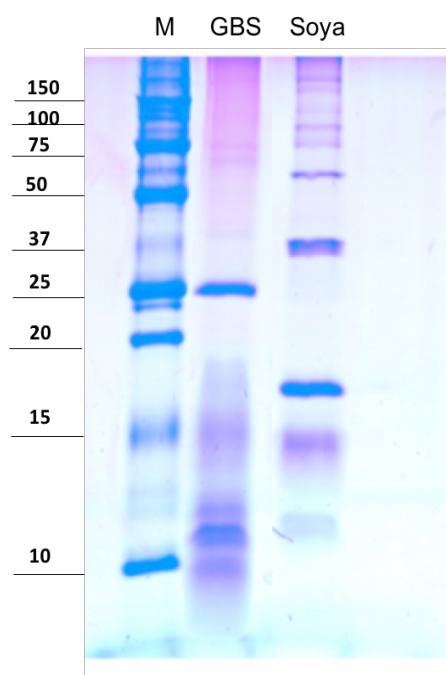


Figura 4.6. Perfil electroforético (SDS PAGE, acrilamida 15%, tinción coomassie) de extractos selectivos de inhibidores de garbanzo Blanco Sinaloa (GBS) y soya utilizando PVP 1% (purificados por ultrafiltración).

El carril M corresponde al marcador de pesos moleculares.

A pesar de que en GBS no hay estudios que determinen el tamaño de sus ITs, se sabe que en soya estos tienen pesos de aproximadamente 20 y 8 kDa cada uno (Kunitz y Bowman-Birk respectivamente). En el primer gel espejo obtenido (Figura 4.6) se usó una tinción con azul de coomassie y como se puede observar, no se obtuvieron bandas en los pesos moleculares esperados para IT en soya. Una de las razones pudo haber sido que la tinción con este colorante pasó por alto concentraciones pequeñas pero importantes de proteínas, así que se procedió con un segundo método para obtener el gel espejo (tinción de planta, Figura 4.7), técnica más sensible que la tinción con azul de Coomassie (Sasse & Gallagher, 2009).

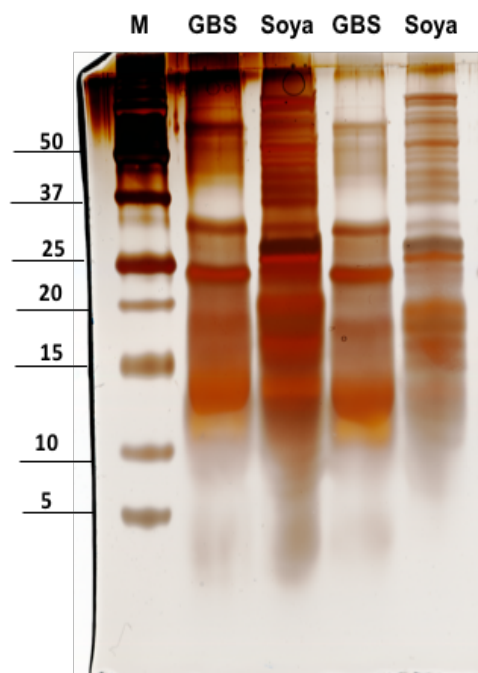


Figura 4.7. Perfil electroforético (SDS PAGE, Tricina 10%, tinción plata) de extractos selectivos de inhibidores de garbanzo Blanco Sinaloa (GBS) y soya utilizando PVP 1%, previamente purificados por ultrafiltración.

El carril M corresponde al marcador de pesos moleculares.

Los carriles 2 y 3 corresponden a concentraciones de 24.15 µg de proteína (garbanzo y soya respectivamente), mientras que los carriles 4 y 5 a concentraciones de 12 µg de proteína por línea (garbanzo y soya respectivamente). Para ambas semillas se observan nuevas bandas comparado con lo obtenido mediante el uso de azul de Coomassie (Figura 4.6). En soya (carril 5) fue posible observar bandas alrededor de los 20 kDa, dentro de las cuales posiblemente se encontraba el ITK, sin embargo, bandas alrededor de los 10 kDa para esta leguminosa solo se observan en el carril 3, dentro de las cuales se esperó que pudiera estar el ITBB. Se continuó entonces con la zimografía reversa para evaluar las fracciones del extracto proteico con actividad de inhibidor de tripsina.

4.1.5.2. Zimografía reversa en extractos de soya o garbanzo

La técnica de zimografía reversa presenta entre otras, las siguientes ventajas: 1) de simple y fácil visualización, 2) selectiva y 3) determinación simultánea de ITs de variados pesos moleculares (Le & Katunuma, 2004). Las Figuras 4.8 y 4.9 muestran los resultados obtenidos utilizando dos diferentes tipos de tinción: Azul de Coomassie y *Amido Black* respectivamente. Donde este último asegura una mejor visualización de las bandas correspondientes a ITs, dado el contraste generado respecto a la superficie.

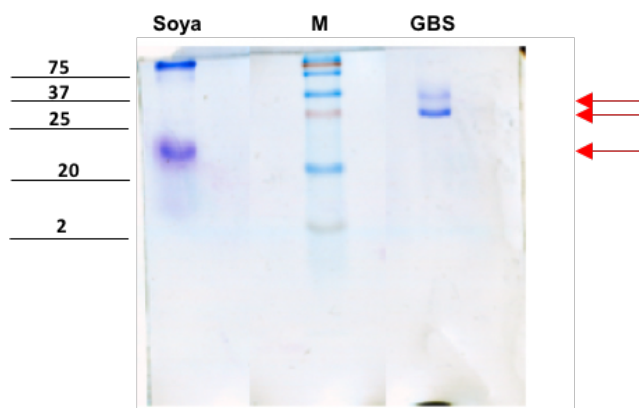


Figura 4.8. Zimograma reverso con tripsina en condiciones no desnaturizante (SDS PAGE, 18%, caseína, tinción coomassie).

Para determinar las bandas correspondientes a inhibidores de tripsina (ITs) de extractos de garbanzo Blanco Sinaloa (GBS) y soya utilizando PVP y purificados por ultrafiltración. M es el marcador de peso molecular.

Tanto en la Figura 4.8 como en la 4.9, fue posible observar bandas asociadas a actividad de IT y en efecto, el contraste dado por *Amido Black* fue mayor. Referente a los inhibidores de

tipo Kunitz, en soya fue posible identificarlo alrededor de los 20 kDa, mientras que para garbanzo se detectaron dos inhibidores de este tipo con pesos aproximados de 25 y 37 kDa cada uno.

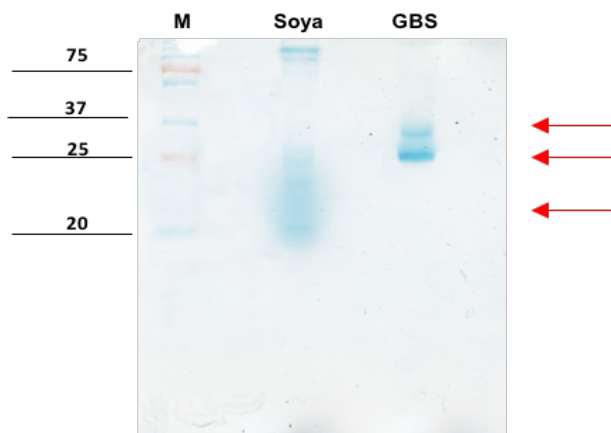


Figura 4.9. Zimograma reverso con tripsina en condiciones no desnaturizante (SDS PAGE, 18%, caseína, tinción *Amido Black*).

Para determinar las bandas correspondientes a inhibidores de tripsina (ITs) de extractos de garbanzo Blanco Sinaloa (GBS) y soya utilizando PVP purificados previamente por ultrafiltración. M es el marcador de peso molecular.

Dada la mancha formada alrededor del IT de soya, principalmente en el gel teñido con Amido Black (Figura 4.9), se estima que este es más activo comparado con las bandas con actividad de IT en la muestra de garbanzo, extracto en el cual las manchas fueron más definidas. Esta evidencia gráfica se corroboró con los resultados previamente mostrados en la Figura 4.5. En cuanto a los ITs de tipo Bowman-Birk, dado que no se detectó el de soya (8 kDa), no fue posible descartar que en GBS por no visualizarse no estén presentes. El hecho de que estos ITs no se observaran pudo estar asociado a diferentes factores:

- 1) Que realmente no hubieran sido obtenidos durante el proceso de extracción con PVP. Pichare & Kachole (1994) recomiendan 2 h de extracción, mientras que otros autores como Chougule *et al.* (2003) extendían este proceso hasta 12 h.
- 2) Que el proceso de incubación con tripsina de 9 a 10 h recomendado por Le & Katunuma (2003) haya sido excesivo. En periodos de incubación mayores a 8 h, las bandas correspondientes a los ITs de menor concentración en el extracto corren el riesgo de ir desapareciendo gradualmente. Esta segunda opción es más probable ya que, como se mencionó anteriormente y como es posible observar en la Figura 4.7

del gel espejo, ambas leguminosas presentan bandas menores a 10 kDa, aunque con tinción ligera.

4.2. Estudio del método para determinación de AIT

El método seleccionado para determinar la AIT usando BAEE como sustrato había sido ya reportado para soya, pero en el caso de garbanzo, poca información había al respecto. Durante la ejecución de las primeras pruebas con harina de garbanzo, se observaron deficiencias en el desempeño del método (Figura 4.10). La primera barra mostrada en la Figura 4.10 corresponde al promedio de los resultados usando como muestra harina de garbanzo entero. Como se puede observar los valores son negativos, lo cual indicaría la presencia de alguna molécula con actividad de tripsina, más que con actividad de inhibidor de tripsina. Además de los resultados negativos, la desviación fue tan elevada que sobrepasa incluso el 100% medido como coeficiente de variación. La presencia de actividad “semejante a la de tripsina” puede estar asociada, como lo reporta Kuaye (1994), a la interferencia de glóbulos de grasa en la muestra, que en rangos de 230 y 260 nm del espectro UV visible dispersan la radiación generando una sobre estimación de la concentración de los analitos. Con esta información en mente, se procedió a analizar IT de la harina desgrasada. Los resultados se muestran en la segunda columna de la Figura 4.10 y como puede observarse, los valores son ya positivos, sin embargo, aún presentaban una desviación estándar elevada con relación al promedio.

Se ha encontrado que las proantocianidinas, un tipo de compuestos fenólicos, presentes en concentraciones elevada en la testa de leguminosas como frijol y garbanzo (9.4-37.8 mg/g) (Aparicio-Fernandez *et al.*, 2005; Bajaj *et al.*, 2015), pueden interactuar con la tripsina de páncreas bovino interfiriendo con su actividad mediante una unión que a pesar de no generar cambios estructurales significativos, en ocasiones llega a promover la formación de agregados que impiden que esta enzima actúe con su sustrato (BAEE). Con base a esta información, se optó por decorticar las semillas de garbanzo, obteniéndose los resultados mostrados en la columna 3 de la figura 4.10, que mostraron tener el coeficiente de variación más bajo y un promedio similar, como se verá más adelante, con lo previamente reportado para AIT de garbanzo. Con estos ajustes al protocolo se hicieron los tratamientos térmicos y reductores tanto en garbanzo como en soya.

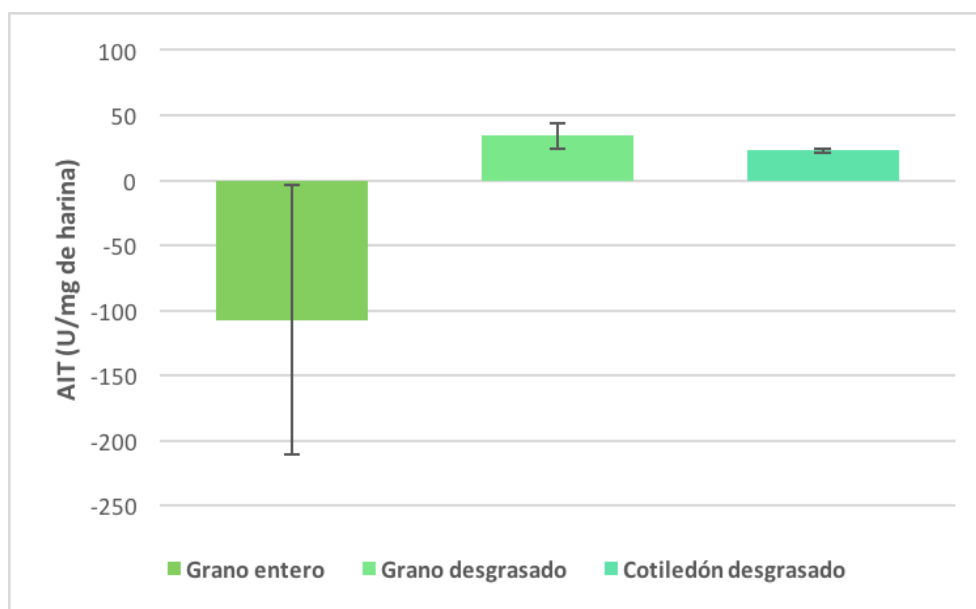


Figura 4.10. Actividad de inhibidor de tripsina (AIT) en fracciones anatómicas de garbanzo utilizando el protocolo desarrollado por Schwertz & Takenaka (1995) & Dabhade *et al.* (2016).

4.3. Efecto de agentes reductores (L-cisteína o metabisulfito de sodio) y/o procesamiento térmico sobre la AIT de harina de soya y garbanzo

4.3.1. Efecto de agentes reductores y/o procesamiento térmico sobre la AIT de harina de soya

Es importante mencionar que a nivel industrial los tratamientos de inactivación de factores antinutrientales en leguminosas se llevan a cabo en la materia prima y no en el producto terminado. Por lo anterior el efecto de los diferentes tratamientos propuestos en este trabajo fue realizado sobre la harina de estas leguminosas.

Se evaluó la AIT de harina de soya antes y después de los tratamientos de inactivación que incluyeron el uso de L-cisteína, metabisulfito de sodio, tratamiento térmico (80°C) y la combinación de los anteriores. Los resultados se muestran en la Figura 4.11. El tratamiento con L-cisteína por sí solo, no disminuyó la AIT de harina de soya, mientras que los que involucraron MBSS, 80°C y la combinación de ambos, resultaron con una elevada tasa de inactivación de IT (35.83, 65.83 y hasta 99.4% respectivamente).

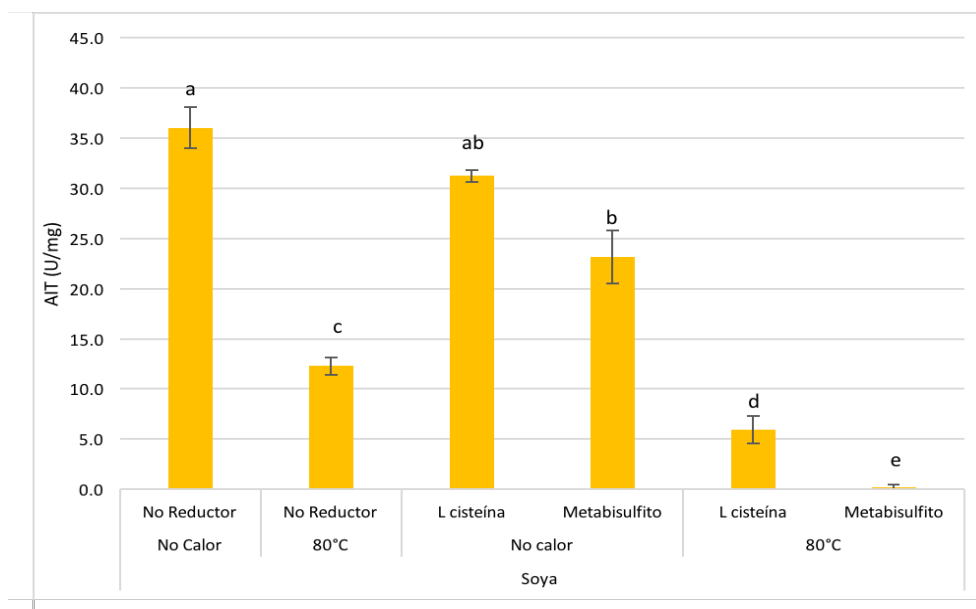


Figura 4.11. Actividad de Inhibidor de Tripsina (AIT, u/mg) de harina de soya sin tratar (control) y tratada: 1) 80°C, 2) L-cisteína, 3) metabisulfito de sodio, 4) L-cisteína + 80°C y 5) metabisulfito de sodio + 80°C.

Letras iguales sobre columnas indican tratamientos estadísticamente semejantes con $P \geq 0.05$.

En un inicio se pensó que el uso de agentes reductores, como L-cisteína, podían tener un efecto de inactivación en ITs de soya, el principal objetivo fue el inhibidor de tipo Kunitz (ITK), que es el más abundante en esta oleaginosa. A pesar de que se conocía que estos puentes disulfuro en el caso particular de la soya no se encuentran cerca del sitio activo, se sabía que el principal papel de estos es darle rigidez a la estructura al promover el entrecruzamiento de las regiones tipo bucle, por lo cual se creyó que la ruptura de estos puentes podría eventualmente resultar en el colapso del IT, algo que reforzado con la investigación bibliográfica previa y ya descrito en el marco teórico (uso de TCEP, Tetenbaum & Miller, 2001) (sección 2.7.3).

Si bien es cierto que ambos agentes reductores, tanto L-cisteína como metabisulfito, redujeron la AIT, el efecto más notable fue el uso de tratamiento térmico y puede estar asociado directamente al tipo de estructura del IT en soya, la cual pueda no basar su actividad en la estructura y rigidez otorgada por los enlaces disulfuro, por lo tanto, aún cuando L-cisteína y metabisulfito hayan reducido produciendo tioles como grupos funcionales, la estructura proteica no colapsó. Lo anterior concuerda con otros resultados encontrados en la literatura, donde en condiciones reductoras propiciadas por mercaptoetanol, el ITK de soya continúa activo,

sugiriendo que el rompimiento de los puentes disulfuro, por sí solo, no dañó la estructura de forma catastrófica (Giri *et al.*, 2003; Pallela *et al.*, 2006).

Otra consideración importante es puntualizar que los agentes reductores tienen diferente potencial reductor y mientras más negativo es este valor, más posibilidad de que la reducción de puentes disulfuro se lleve a cabo. El TCEP (usado por Tetenbaum & Miller, 2001) cuenta con un potencial de -0.29 mV mientras que la L-cisteína reporta solo -0.22 mV. La selección de agentes reductores en este tipo de tratamientos es entonces importante para así utilizar de forma específica los compuestos en tratamientos de inactivación.

A diferencia de la L-cisteína, el metabisulfito de sodio logró una inactivación de ITs, que aunque pequeña fue significativa. Este resultado puede estar asociado a la menor especificidad reportada del metabisulfito en comparación con la L-cisteína y el mercaptoetanol, ya que al interactuar con otros enlaces proteicos tiene más probabilidades de afectar la estructura terciaria de una molécula como los ITs (Schmid *et al.*, 2016; Hermanson, 2017; Thermo Fisher Scientific, 2017). Además, la concentración usada en términos molares de MBSS fue poco más de dos veces la de L-cisteína, lo cual pudo haber propiciado un mayor cambio estructural en las proteínas de soya. Autores como Abtahi & Aminlari (1997) estudiaron en soya el efecto del metabisulfito de sodio y cisteína. Ellos concluyeron que el primero, al cambiar en mayor medida las propiedades funcionales, debía tener un mayor efecto en la estructura proteica en comparación con la adición de L-cisteína.

En cuanto al tratamiento térmico, está bien documentado que a partir de 80°C y 30 min se disminuye de manera significativa el contenido de factores antinutrimientales en soya, en especial la AIT (Westfall & Hauge, 1948). Al ser moléculas proteicas, sufren cambios estructurales producto del uso de energía térmica, como pérdida de estructura secundaria y terciaria ocasionada por la interrupción de enlaces iónicos, hidrofílicos e hidrofóbicos.

Como ya se comentó, al adicionar agentes reductores al tratamiento térmico, los porcentajes de inactivación de ITs aumentaron (Figura 4.11). En el caso de la L-cisteína + 80°C, la AIT fue de solo 17.5% cuando se compara con el control y de alrededor del 50% cuando se compara con el tratamiento solo térmico, indicando que la mezcla de temperatura y agente reductor sí tuvo un efecto significativo en la reducción de AIT. Este resultado pudo estar asociado a la disrupción de puentes disulfuro por la L-cisteína y al posterior tratamiento térmico que generó las condiciones óptimas para desnaturalizar la estructura del inhibidor. El mismo fenómeno de reducción de AIT se observó cuando el metabisulfito se usó en conjunto con el tratamiento térmico (80°C, inactivación de hasta el 99.42%).

4.3.2. Efecto de agentes reductores y/o procesamiento térmico sobre la AIT de harina de garbanzo

La aplicación de tratamiento térmico ha sido previamente estudiada en garbanzo, y a diferencia de la soya, estos han resultado ser menos eficientes al requerir temperaturas mayores a 95°C y tiempos 80% más prolongados comparados con otras leguminosas (Habiba, 2002; Shi *et al.*, 2017). En autoclave se ha determinado que esta semilla requiere 20 min más de tratamiento que la soya y 81 min más cuando es cocinado a presión atmosférica. En microondas se requieren 11 min más que leguminosas como chícharos para lograr reducciones de AIT >80% (Alajaji & El-Adawy, 2006). Estas altas temperaturas y tiempos prolongados representan un gasto energético elevado, por lo cual el estudio de otras alternativas, como el uso de agentes reductores, representan una opción que podría ser más rentable.

Los resultados obtenidos con el uso de L-cisteína, metabisulfito de sodio y/o tratamiento térmico en harina de garbanzo se muestran en la Figura 4.12. La mayor reducción de AIT observada corresponde al uso de L-cisteína (-72.24%), mientras que los tratamientos que involucraron procesamiento térmico, apenas lograron una reducción de AIT de entre 26.71 y 35.65 %.

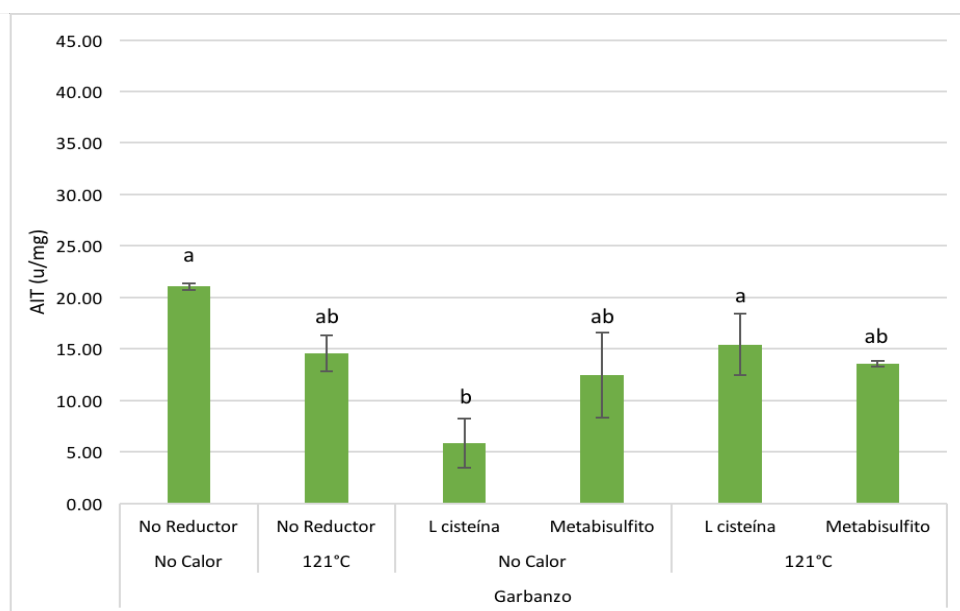


Figura 4.12. Actividad de Inhibidor de Tripsina (AIT, U/mg) de harina de garbanzo sin tratar (control) y tratada: 1) 121°C, 2) L-cisteína, 3) metabisulfito de sodio, 4) L-cisteína + 121°C y 5) metabisulfito de sodio + 121°C.

Letras iguales sobre columnas indican tratamientos estadísticamente semejantes con $P \geq 0.05$.

A diferencia de la soya, en el garbanzo los agentes reductores disminuyeron la AIT en mayor porcentaje que el tratamiento térmico, en especial la L-cisteína. Este resultado puede estar asociado a la diferencia de número y/o función de los puentes disulfuro de los ITKs de garbanzo, que a pesar que normalmente contienen dos de estos, se han encontrado excepciones tanto en el número como en la función de los mismos. Por ejemplo, el ITK de Guamá (*Inga laurina*), un árbol perteneciente a una sub-familia de las leguminosas, contiene únicamente un puente disulfuro mientras que el de la semilla de lichi (*Litchi chinensis*) no contiene ninguno. El ITK de trébol (*Medicago truncatula*), un modelo muy utilizado para estudiar leguminosas, contiene tres de estos puentes (Seemüller *et al.*, 1977; Macedo *et al.*, 2007; Rech *et al.*, 2013).

En cuanto a la variada función de estos, hay evidencia de leguminosas que al reducirse los puentes disulfuro de sus ITKs, estos pierden la funcionalidad. Por ejemplo, el de la leguminosa *Cajanus cajan* de 25 kDa que pierde la funcionalidad después de ser tratado con mercaptoetanol (Benjakul *et al.*, 2000), a diferencia de lo ocurrido en soya y reportado por Giri *et al.* (2003).

Con los resultados obtenidos en garbanzo, es evidente que la AIT, sobre todo la del tipo Kunitz (ITKs) está asociada a la estabilidad que brindan los puentes disulfuro, ya que al reducir estos se observa una pérdida significativa de actividad. Lo más probable es que el número de puentes disulfuro de estos ITKs sí sea mayor que en soya, ya que esto explicaría además la termoestabilidad cuando se comparan con otras leguminosas. Ya ha sido ampliamente reportado que a mayor número de puentes disulfuro las estructuras proteicas se vuelven más resistentes a altas temperaturas (Klomklao *et al.*, 2010; Chan *et al.*, 2013).

Otra posibilidad es que los IT en garbanzo, al ser de un peso molecular ligeramente mayor al de soya (sección 4.1.5.2) esto le brinde una mejor estabilidad térmica. Es también importante hacer notar que la estructura de IT de garbanzo no ha sido reportada, ni tampoco las familias a las que pertenece de acuerdo a su peso molecular. Esta información sería de gran valor para comprender cabalmente los mecanismos que pueden llevar a su inactivación.

En el caso de los tratamientos térmicos, aunque no presentan una diferencia significativa respecto al control en garbanzo, también lograron disminuir la AIT, mostrándose que temperaturas elevadas (121°C) también tienen un efecto, aunque pequeño, en la inactivación de ITs de garbanzo como previamente lo reportó Alajaji & El-Adawy (2006). Otro resultado interesante es que, a diferencia de la soya, aquí no se observó sinergia entre agentes reductores y tratamiento térmico. Una de las razones puede ser el efecto de las altas temperaturas en la

propia estabilidad de los agentes reductores. Por ejemplo, para la L-cisteína se ha reportado que a partir de los 120°C pierde actividad y que en tratamientos de esterilización se oxida a cistina, un dímero de dos cisteínas, lo cual hace que esta molécula pierda su función (Weder & Sohns, 1983; Ito *et al.*, 2009; Wu, 2013). El caso del metabisulfito de sodio es similar: se descompone al hervir (>100°C) a 1 atm formando productos tóxicos que incluyen óxidos y sulfuro (National Oceanic and Atmospheric Administration US, 1999), perdiendo lógicamente su funcionalidad.

4.3.3 Selección de los tratamientos de inactivación más efectivos en harina de soya o garbanzo

Una vez analizada la efectividad de los diferentes factores, se seleccionaron los que tuvieron el más alto porcentaje de inactivación tanto en soya como en garbanzo y con ellos se obtuvieron concentrados proteicos que fueron caracterizados física y funcionalmente.

Para soya se seleccionó la combinación de 80°C con MBSS y para garbanzo el tratamiento con L-cisteína, ya que fue el único que mostró un efecto de inactivación significativo con respecto al control. Es importante comentar que con la intención de entender mejor el efecto de la temperatura (121°C) en las propiedades funcionales y físicas del concentrado de proteína de garbanzo, se ejecutó también este tratamiento de forma paralela, por lo que en algunos casos se mostrarán resultados asociados al efecto en solitario de la temperatura en la funcionalidad de proteínas de garbanzo. La intención es mostrar ventajas y desventajas del tratamiento cisteína *versus* aplicación de altas temperaturas.

4.4. Rendimiento del proceso de extracción proteica a partir de harina de soya y garbanzo por precipitación isoeléctrica

Los resultados correspondientes al rendimiento de extracción por precipitación isoeléctrica se muestran en la Tabla 4.2. En cuanto al rendimiento de extracción, este hace referencia a la proteína total base seca (BS) obtenida en la cuajada respecto a la proteína total presente en la harina de cada leguminosa. Referente al rendimiento de secado, este se refiere a la proteína total BS presente en el concentrado proteico final (deshidratado) con respecto a la proteína total BS presente en la cuajada. Finalmente, el total corresponde a la proteína total BS presente en el concentrado proteico final en polvo, respecto a la contenida en la harina de soya o garbanzo. La intención de estos cálculos fue analizar de forma somera la conveniencia de estos

procesos en industria y generar un análisis sobre las mejoras que se puedan hacer en las condiciones del proceso, además de determinar si los tratamientos de inactivación tuvieron algún efecto en estos rendimientos. Los rendimientos de extracción de harina de soya y garbanzo han sido ampliamente reportados en nuestro grupo de investigación, pero no así los del proceso completo.

Tabla 4.2. Rendimiento de las diferentes etapas de producción de concentrados proteicos de soya y garbanzo (control y tratados, el primero con metabisulfito + 80°C y el segundo con L-cisteína).

% de rendimiento por etapa				
Muestra	Tratamiento	Extracción proteica	Secado	Total
Soya	Control	55.57	53.20	29.56
	Metabisulfito de sodio +80°C	44.46	44.34	19.71
Garbanzo	Control	56.70	16.98	9.63
	L-cisteína	55.55	18.67	10.37

Rendimientos de extracción proteica

En cuanto al rendimiento de extracción de soya (55.57%, Tabla 4.2) y su pureza (88.7% BS), los resultados fueron menores a lo previamente reportado para esta leguminosa: 65.0, 69.7 y hasta 73.6% de la proteína inicial y purezas por encima de 90% (Nelson & Glatz, 1985; Hofland *et al.*, 2000; Barbosa *et al.*, 2006). Comparado con lo reportado por estos últimos autores, las principales diferencias detectadas en el proceso son las referentes a las etapas de centrifugación, donde se pueden usar velocidades de 10,000 rpm hasta por 30 min (sin indicios de la configuración del equipo utilizado), mientras que en esta tesis, por restricciones de infraestructura se usó una menor velocidad rotacional (3,600 rpm, sección 3.6.1) en un rotor con canastillas. Las diferencias en tiempo, velocidad y/o configuración de rotor, afectan sin duda la eficiencia de separación del extracto proteico y del bagazo en la etapa 1, así como la sedimentación de proteína en la etapa 2. Ambos pasos cambian entonces la pureza del concentrado, así como la cantidad de cuajada que se obtendrá en el pellet final.

Al comparar el rendimiento de extracción de soya control con el obtenido de harina previamente tratada (80°C+ MBSS, Tabla 4.2), este se redujo en alrededor de un 20%. La pureza (dato no mostrado en la tabla) bajó a 82.4%. Esto se asocia a la alta temperatura que permite que las proteínas sufran cambios estructurales e interactúen con otros elementos de la matriz, produciendo agregados e insolubilizándose incluso en los medios de extracción promoviendo entonces su separación en la primera etapa de centrifugación (Ma *et al.*, 2011).

En cuanto al rendimiento de extracción de garbanzo control (56.70%), con una pureza de 77%, estos parámetros también fueron menores a lo encontrado en la literatura. En garbanzos tipo Kabuli, se han reportado rendimientos proteicos desde 69.1 hasta 84.8% (Boye *et al.*, 2010; Karaca *et al.*, 2011). Las diferencias encontradas pueden deberse nuevamente a las condiciones de centrifugación, donde estos autores utilizaban hasta 6,100 rpm por 20 min y a otras encontradas durante el proceso de extracción como el pH de extracción alcalina (9.5 en lugar de 9.0), la temperatura de extracción (35°C en vez de 50°C) y la relación sólido líquido (p/v) (1/15 en lugar de 1/10). Se sabe que cada leguminosa tiene condiciones óptimas de extracción en las cuales influye el pH, la temperatura y la fuerza iónica y es probable que las condiciones reportados por Boye *et al.* (2010) & Karaca *et al.* (2011), sean más adecuadas para el caso particular de garbanzo. Específicamente para esta leguminosa no existen reportes que estudien el efecto de estos factores en el rendimiento de extracción proteica, sin embargo, en leguminosas como guandú (*Cajanus cajan*) y caupí (*Vigna unguiculata*) se ha visto que los pHs óptimos de extracción alcalina son 9.5 y 10 respectivamente (Mwasaru *et al.*, 1999).

Comparando el rendimiento de garbanzo control con el tratamiento, la diferencia es muy baja disminuyendo solo un 2.03% en este último. La pureza (dato no mostrado en la tabla) no se vio afectada, sugiriendo que el uso de la L-cisteína no altera la estructura ni propiedades de la proteína de garbanzo ya que, de acuerdo a este rendimiento de extracción, ni la etapas de solubilización ni la de precipitación de la proteína se vieron afectadas durante la extracción isoelectrica. Lo anterior no puede ser comparado ya que no se ha reportado algo similar en la literatura para esta leguminosa.

Por otro lado, al aplicar el tratamiento térmico de inactivación (121°C) en garbanzo (resultado no mostrado en Tabla 4.2), el rendimiento de extracción proteica disminuyó en 84.45% (rendimiento neto de 8.82%), de igual manera la pureza se redujo en 22.50% comparado con el control (60% BS). Estas pronunciadas reducciones en la extractabilidad pudieron haber sido causadas tanto por la formación de cuerpos proteicos dadas las altas temperaturas, como por la gelatinización del almidón, proceso que en garbanzo se da a partir de los 63.5°C. Este último

fenómeno pudo ocasionar que material proteico quedara atrapado en la red que el almidón forma en presencia de agua y calor (Huang *et al.*, 2007) (Figura 4.13). Dados estos resultados, un proceso de producción de concentrados proteicos de garbanzo posterior a un proceso de inactivación térmico no sería eficiente ya que, a diferencia del tratamiento con L-cisteína, los rendimientos disminuyen de manera importante.



Figura 4.13. Almidón gelatinizado después del tratamiento térmico a 121°C aplicado en harina de garbanzo.

Rendimientos de secado por aspersion.

En esta etapa, todos los resultados obtenidos y mostrados en la Tabla 4.2 están en el rango de rendimiento reportado para el secador por aspersion (de 8 a 64%). Al comparar los rendimientos de los controles con tratamientos, en soya este disminuyó en 16.65% y en garbanzo aumentó en 10%. Estas variaciones pueden deberse a los diferentes parámetros que pueden influenciar el rendimiento de este proceso, todos relacionados evidentemente al secador, por ejemplo: 1) temperatura de entrada del aire y del producto a deshidratar, 2) temperatura de salida del aire, 3) concentración de sólidos en la solución a deshidratar y 4) concentración de proteína en la solución (Prinn *et al.*, 2002).

Cuando se comparan los rendimientos de secado de los concentrados de soya con los de garbanzo (Tabla 4.2), se pueden observar diferencias muy grandes (53.20% como máximo para soya *versus* 18.67% como máximo en garbanzo).

Una de las razones es que para las dos muestras de harina de garbanzo (control y tratada) se utilizó una boquilla de aspersion de mayor tamaño (2.7 mm de diámetro), lo que pudo

ocasionar que las partículas se quedaran adheridas a las paredes de la cámara de secado impidiendo su depósito en el ciclón y recolector, disminuyendo así el rendimiento final (Figura 4.14). Es necesario además comentar que el cambio de boquilla se realizó porque la viscosidad de la preparación de garbanzo no permitía su transporte por el orificio más pequeño del primer aspersor (1 mm de diámetro), tal como se había usado para soya. Esto hace recordar que al igual que en los tratamientos con agentes reductores y temperatura, los más eficientes dependerán de la naturaleza específica de IT. En el caso de los procesos industriales, planta piloto y laboratorio, el rendimiento y condiciones específicas de operación también estarán asociados al tipo de leguminosa que se vaya a tratar.

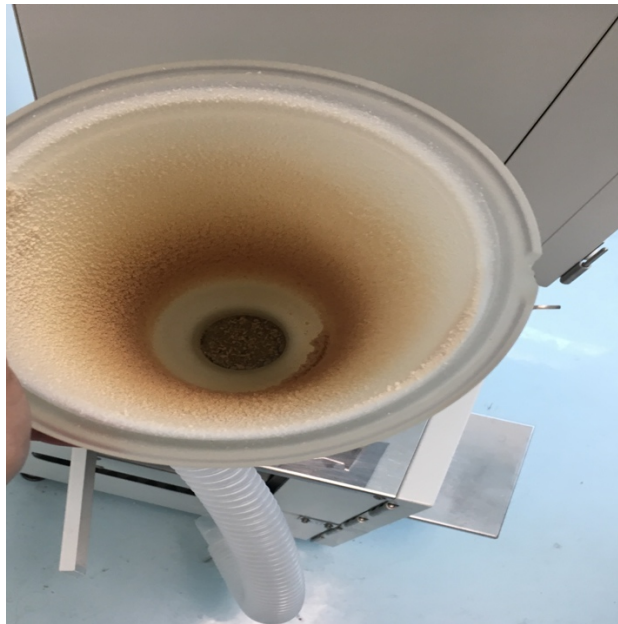


Figura 4.14. Partículas de concentrado proteico de garbanzo adheridas a la cámara del secador cuando el extracto proteico se asperjó con una boquilla de 2.7mm de diámetro.

4.5. Características de concentrados proteicos de soya y garbanzo tratados con agentes reductores (L-cisteína o metabisulfito de sodio) y/o procesamiento térmico

4.5.1. Actividad de inhibidor de tripsina de Concentrados de Soya y Garbanzo (CPS y CPG)

La actividad de inhibidor de tripsina de CPS y CPG antes y después del tratamiento más efectivo de inactivación para cada material (80°C + MBSS y L-cisteína respectivamente) se presentan en la Figura 4.15.

Es importante determinar la AIT de los concentrados como productos finales del proceso evaluado, porque a pesar que la efectividad de estos procesamientos fue probada en las harinas, era necesario corroborar que una vez concentrada la fracción proteica (a la cual corresponden los inhibidores de proteasa) el efecto de los tratamientos se mantuviera.

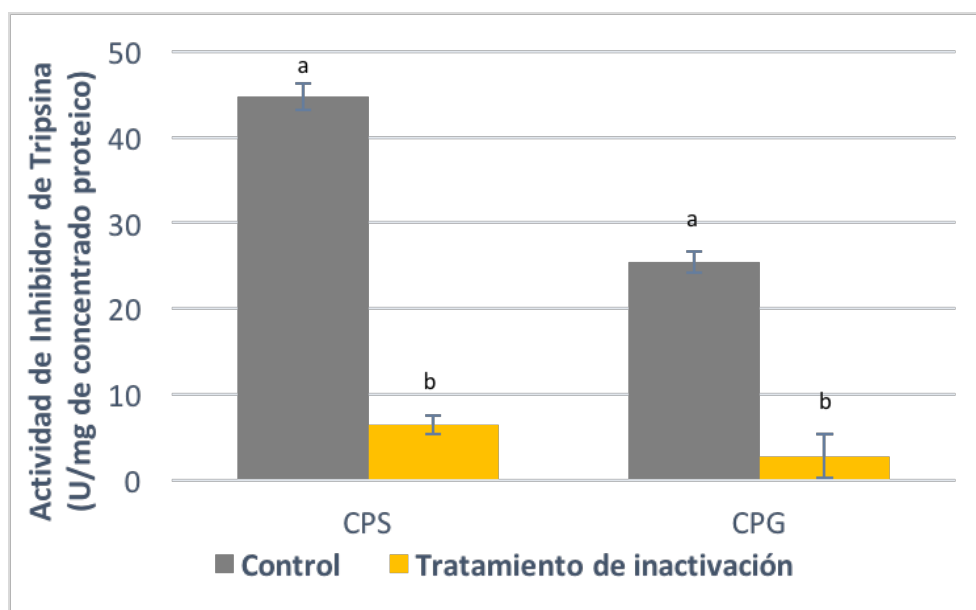


Figura 4.15. Actividad de inhibidor de tripsina de concentrado proteico de soya (CPS) y concentrado proteico de garbanzo (CPG) antes y después de su tratamiento de inactivación más efectivo (para CPS: meta-bisulfito de sodio + 80°C; para CPG: L-cisteína).

Letras diferentes entre columnas control y tratamiento para cada leguminosa indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

El concentrado proteico con mayor AIT fue el de soya, el cual presentó una actividad de 44.72 U/mg, 32.98% más que en la harina utilizada como materia prima. Lo anterior concuerda con lo reportado por Kakade *et al.* (1974) quienes determinaron que al comparar aislados o concentrados de soya con su harina, en los primeros la AIT puede incrementar entre un 23.77 y un 104.12%, dependiendo de la concentración final de proteína. Sobre el efecto del tratamiento de inactivación selectiva, como se puede observar en la figura 4.15, el uso de MBSS en conjunto con un tratamiento a 80°C logró una reducción de 85.71% en la AIT de soya, confirmando la producción de ingredientes proteicos con bajo nivel de actividad de inhibidor de tripsina, cuando se aplican los tratamientos en harinas previo al proceso de concentración.

Por otra parte, los resultados obtenidos de AIT en CPG fueron semejantes a los que se habían ya determinado en la harina de esta leguminosa (23.05 y 25.42 U/mg respectivamente). Estos resultados son parecidos a los reportados por Mondor *et al.* (2009) quienes señalan que mediante el proceso de precipitación isoelectrica la AIT no es incrementada ni en concentrados de garbanzo tipo Desi ni en tipo Kabuli comparado con su harina. Al igual que para soya, se corroboró la efectividad del tratamiento de inactivación específico (L-cisteína), ya que como se puede observar en la figura 4.15, la AIT se redujo en 89.06%.

Además de los resultados mostrados en la figura 4.15, también se determinó en CPG el efecto del tratamiento térmico (121°C), obteniéndose una reducción en AIT similar a la de cisteína (85.5%), con las desventajas ya mencionadas del bajo rendimiento en proceso.

4.5.2. Propiedades funcionales y digestibilidad *in vitro* de CPS y CPG

La solubilidad es la propiedad funcional más importante en aislados y concentrados proteicos de leguminosas, ya que además de influir en su futuro uso como parte de matrices alimenticias, está relacionada con otras propiedades como la capacidad de hacer emulsiones, geles o espumas (Sreerama *et al.*, 2012). Por otro lado, la digestibilidad *in vitro* (IVPD) es un parámetro que puede relacionarse con el contenido de factores antinutrimientales, así que es un buen indicador para evaluar la eficiencia de tratamientos como los propuestos en esta tesis.

Tabla 4.3. Índices de solubilidad de agua y nitrógeno (ISA, ISN), de absorción de agua (IAA) y digestibilidad *in vitro* de proteína (IVPD) de concentrados proteicos de soya (CPS) y garbanzo (CPG)¹

Muestra	Tratamiento	ISA (%)	IAA (g/g)	ISN (%)	IVPD (%)
Soya	Control	79.34 ± 2.51 ^a	1.05 ± 0.19 ^b	35.68 ± 2.62 ^a	60.30 ± 1.55 ^{ab}
	Metabisulfito de sodio +80°C	44.24 ± 2.65 ^b	4.69 ± 0.35 ^a	36.16 ± 0.96 ^a	64.91 ± 1.86 ^a
Garbanzo	Control	77.79 ± 1.86 ^a	1.06 ± 0.11 ^a	34.79 ± 0.55 ^a	59.43 ± 0.93 ^{ab}
	L-cisteína	77.03 ± 2.05 ^a	1.04 ± 0.18 ^a	31.45 ± 1.99 ^b	62.28 ± 0.62 ^a

¹Los valores con diferentes letras minúsculas en las columnas, indican diferencias significativas entre la misma semilla (P<0.05).

En la Tabla 4.3 se muestran los resultados de las pruebas funcionales ejecutadas en concentrados de soya y garbanzo tanto en controles como en los mejores tratamientos de inactivación de AIT. Para CPS control, el ISA (79.34%) y el IAA (1.05) obtenidos concuerdan con lo reportado en la literatura, donde el ISA de proteína de soya va desde 30 hasta 90%, siendo la mayor solubilidad la de los aislados proteicos y disminuyendo a medida que componentes no proteicos, como polisacáridos, se encuentren en la matriz alimenticia (Lee *et al.*, 2003). Por otro lado, el IAA de concentrados proteicos de soya, suelen tener valores de entre de 0.9 y 1.0. En cuanto al ISN, también corresponde con lo reportado, donde para concentrados proteicos de soya a pH 7 y a temperatura ambiente, este parámetro presenta valores de entre 30 y 40% (Hutton & Campbell, 1977).

El tratamiento de inactivación de IT cambió de forma significativa el ISA e IAA en soya (Tabla 4.3). El primero en 44.24%, mientras que el IAA aumentó de 1.05 hasta 4.69. Estos cambios se encuentran relacionados a la desnaturalización y formación de agregados proteicos, lo cual por una parte expone aminoácidos hidrofílicos en la superficie proteica, que pueden aumentar su adsorción de agua (Rivas *et al.* 2017), pero en el caso del primer fenómeno aumenta el peso molecular, haciendo que esta proteína se separe cuando es sometida a la centrifugación que se ejecuta como parte del protocolo de solubilidad en agua. Esta agregación y posterior separación se cuantificaría como una menor solubilidad en agua, tal como se indica en la tabla 4.3.

A pesar de las diferencias encontradas en ISA e IAA para soya, en el ISN los resultados tanto del tratamiento como del control fueron estadísticamente similares. Un resultado semejante

ya había sido observado por Kim *et al.* (1990) cuando estudiaron el efecto de calor en aislados proteicos de soya. Para discutir este resultado es importante definir al índice de solubilidad de nitrógeno (ISN) como la relación del nitrógeno afín a una solución salina, respecto al nitrógeno total inicial expresado como porcentaje. Esto sugiere que las proteínas cuya solubilidad fue afectada, no corresponde a la fracción afín a soluciones salinas, es decir a las globulinas. Si no que las afines a soluciones acuosas con pH neutro o alcalino como el tipo albúminas y prolaminas.

En cuanto al efecto que pudo tener el tratamiento de inactivación (80°C + MBSS) en el cambio de ISA e IAA, se ha encontrado diversa información en la literatura. Por un lado, Meng *et al.* (2002) reportaron que el uso del agente reductor DTT (ditiotreitrol) promovió la agregación de glicinina de soya, disminuyendo la solubilidad de la misma y, por otro lado, Zhang & Sun (2008) encontraron que esta glicinina no pierde su funcionalidad después de ser reducida con bisulfito de sodio. Con la finalidad de determinar el efecto aislado de metabisulfito de sodio y la aplicación de altas temperaturas en la solubilidad, sería recomendable analizarlos por separado.

En cuanto a garbanzo, al comparar CPG control con el tratado con L-cisteína, ni el ISA ni el IAA fueron afectados de manera significativa, mientras que en el material tratado a 121°C (resultados no mostrados en la tabla), ambos parámetros fueron afectados (ISA se redujo 74% e IAA aumentó casi 3 veces). Dado que estos parámetros están relacionados con la desnaturalización o cambios estructurales en la proteína, los resultados se explican analizando lo que se ha mencionado de manera constate en este trabajo, y es que este agente reductor solo afecta aquellas proteínas cuya estructura depende de los puentes disulfuro [aproximadamente el 5% de la estructura que se conocen en la actualidad (Tetenbaum & Miller, 2001)], mientras que el calor puede afectar de manera global a la estructura proteica.

Se sabe que para garbanzo las proteínas que se encuentran en mayor abundancia son las globulinas (vicilina y legumina) y a pesar de que no hay estudios que relacionen el uso de agentes reductores con proteínas de garbanzo, existen otras leguminosas cuyas proteínas mayoritarias son las mismas, por ejemplo, frijol rojo (*Phaseolus angularis*) y frijol común (*Phaseolus vulgaris*). En estas leguminosas, se ha observado que el uso de agentes reductores no promueve la agregación ni cambios estructurales de las globulinas (Meng *et al.*, 2002). Con la finalidad de saber por qué no se daban estos cambios, Tang (2008) estudió la estructura de estas proteínas, encontrado que sus puentes disulfuro se encuentran “enterrados” en su estructura, por lo cual los agentes reductores no logran afectarlas. Por lo anterior, es posible que lo mismo haya ocurrido en el caso del CPG tratado con L-cisteína y que por esta razón no se hayan observado cambios en cuanto a la solubilidad. Esto puede ser de alguna manera

confirmado con lo que posteriormente se describirá (sección 4.5.4) sobre la estructura secundaria sin cambios que en el garbanzo quedó registrada con el FTIR.

A pesar de que la estructura proteica no se modifica de manera extensiva con el uso de agentes reductores, se ha reportado que a temperaturas $>95^{\circ}\text{C}$ las globulinas muestran alto grado de agregación, explicándose así el efecto tratamiento térmico (121°C) en la solubilidad (ISA) y absorción (IAA) en proteína de garbanzo (Tang *et al.*, 2008).

En cuanto al ISN en CPG, el tratamiento con cisteína (Tabla 4.3) mostró una reducción de 3.3 puntos porcentuales con relación al control, lo que representa el 9.6%. Este resultado indica que la L-cisteína promovió un cambio en proteínas de tipo globulina, ya que el ISN fue la única funcionalidad de las aquí evaluadas que cambió, aunque en un porcentaje mínimo comparado con los cambios observados en soya tratadas con MBSS+ 80°C .

Es interesante hacer notar que cuando la harina de garbanzo fue tratada a 121°C , el ISN aumentó en 45% (datos no mostrados en la tabla 4.3.). De acuerdo a lo encontrado en la literatura, el ISN en proteína de leguminosas, regularmente se ve más bien disminuido tras el procesamiento térmico, esto como indicativo de desnaturalización proteica. Sin embargo, Gujska & Khalil (1990) reportaron que mientras que para leguminosas como frijol común (*Phaseolus vulgaris*) el ISN se veía reducido tras tratamientos a 132°C , en garbanzo este no disminuía, lo cual fue asociado a la presencia de otros ingredientes en la matriz. En este caso, el concentrado proteico obtenido de garbanzo tras procesamiento térmico contó con la pureza más baja (60%), como se mencionó en la sección 4.4, por lo que es probable que el aumento en ISN, haya sido ocasionado por el comportamiento de los otros ingredientes presentes en el concentrado.

Con estos resultados se puede observar que el uso de agentes reductores permite la inactivación selectiva del inhibidor de tripsina y que su efecto será diferente de acuerdo al tipo de leguminosa tratado. Esto hace intuir que la estructura de los inhibidores de tripsina es diferente en las distintas materias primas. El uso de tratamientos para inactivar inhibidor de tripsina en soya y garbanzo afectó las propiedades funcionales de los concentrados obtenidos con las harinas tratadas, sin embargo, el cambio más extensivo se observó con el uso de temperaturas elevadas (80°C en el caso de soya y 121°C en garbanzo). El uso de agentes reductores (L-cisteína) en el caso del garbanzo, solo afectó el ISN, pero no ISA ni IAA.

La última columna en la Tabla 4.3 incluye los resultados de Digestibilidad *in vitro* (IVPD) que en CPG control fue de 59.43%. Este resultado concuerda con lo ya reportado para esta leguminosa (52.4 a 69.0% en concentrados de garbanzo decorticado, -Singh & Jambunathan1981; Ghavidel & Prakash 2007). En el caso de CPS control se alcanzó una IVPD

de 60.3%, valor por debajo a lo reportado en la literatura (de hasta 80.23%). Estas diferencias pueden deberse al grado de pureza de las muestras, ya que en este caso se cuenta con concentrados y en estos existen componentes no-proteicos que podrían interferir con la hidrólisis ejecutada por las proteasas.

Al comparar tanto CPS como CPG controles con sus respectivos tratamientos, no se obtuvieron diferencias significativas de IVPD, pero sí una tendencia a aumentar con los tratamientos selectivos usados para inactivar IT. Clemente *et al.* (2000) y Osman (2007) han reportado que el decremento de AIT no está relacionado de manera necesaria a un incremento en la IVPD. Sin embargo, otros autores mencionan que tanto el uso de procesamiento térmico como el tratamiento con agentes reductores incrementa este parámetro (Friedman & Gumbmann, 1986; Rehman & Shah, 2005).

El protocolo de IVPD, aunque útil para hacer una evaluación de la disponibilidad de proteínas a ser hidrolizadas por enzimas digestivas, tiene limitaciones como su incapacidad para evaluar el efecto de todos los factores antinutrimientales y de igualar la actividad y secreción exacta de enzimas en el sistema digestivo. Por esta razón es recomendable llevar a cabo un análisis de digestibilidad *in vivo* para de este modo complementar la información obtenida con el protocolo *in vitro*.

Los cambios en las propiedades funcionales, principalmente los observados tras el procesamiento térmico, se asocian como ya se mencionó a desnaturalización proteica, fenómeno relacionado con modificaciones en estructura terciarias y secundarias de las proteínas. Con la intención de probar lo anterior, se ejecutó un análisis de la región amida I del espectro infrarrojo, la cual arroja información de la estructura secundaria, principalmente en cuanto al reordenamientos y desaparición de sus componentes (Perez-Gago & Krochta, 2001). Se hizo además un análisis de los cambios en el perfil electroforético, por si los cambios en funcionalidad podían asociarse a una diferencia en la tasa de migración proteica sobre un gel de acrilamida, lo cual haría intuir algunos cambios estructurales a nivel terciario. Los resultados se muestran en las siguientes dos subsecciones.

4.5.3. Estructura secundaria de concentrados proteicos de soya y garbanzo (CPS y CPG).

La espectrometría infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) fue utilizada para determinar si los tratamientos de inactivación tuvieron algún efecto en la estructura secundaria de las proteínas (Tabla 4.4). La absorción asociada a la región denominada “amida I”, ha

mostrado ser de utilidad para determinar la composición de la estructura secundaria de proteínas, la cual en ocasiones arroja información relevante acerca de las propiedades funcionales y químicas de las mismas (Jackson & Mantsch, 1995; Carbonaro *et al.* 2012).

Tabla 4.4. Porcentajes de estructuras secundarias presentes en los concentrados proteicos de garbanzo y soya (controles y tratamientos), obtenidos a partir de la región amida I.

% de estructuras secundarias							
Muestra	Tratamiento	β -plegada (antiparalela)	β - plegada	Bucles (hélice 3_{10})	α - hélice	No ordenadas	Cadenas agregadas
Soya	Control	36.4	18.2	9.1	18.2	9.1	9.1
	Metabisulfito de sodio +80°C	40.0	20.0	10.0	20.0	10.0	0.0
Garbanzo	Control	36.4	18.2	9.1	18.2	9.1	9.1
	L-cisteína	36.4	18.2	9.1	18.2	9.1	9.1

Las estructuras secundarias más frecuentes en todos los concentrados proteicos fueron β -plegada antiparalela (36.4 – 40.0%), β -plegada (18.2 – 20.0%) y α -hélice (18.2 – 20.0%), lo cual corresponden con lo ya reportado para proteína de soya y garbanzo (Withana-Gamage *et al.*, 2011). Al comparar CPS control y tratado (80°C + MBSS), para este último se observó un incremento en todas las estructuras secundarias, excepto en las cadenas agregadas, cuya proporción decrece a cero. Estos cambios están asociados al incremento de temperatura durante el tratamiento térmico, ya que el aumento de energía induce el desplegamiento proteico, implicando así una restructuración y por lo tanto un aumento o disminución de cada elemento de la estructura secundaria. Se ha observado que las estructuras proteicas “desordenadas” en sistemas con más de 13% de agua y temperaturas arriba de los 70°C tienden a aumentar y las cadenas agregadas decrecen sugiriendo disociación. De hecho, la reducción de cadenas agregadas ha sido correlacionado a una desnaturalización proteica y se ha documentado que bajo tratamiento

térmico se observa un reordenamiento que favorece el aumento de estructuras α -hélice (Murayama & Tomida, 2004; Georget & Belton, 2006; Caillard *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011).

Por otro lado, al comparar CPG control y tratado (L-cisteína), no se detectaron cambios en la proporción de los elementos de la estructura secundaria de la proteína. Como ya mencionado en secciones anteriores, la L-cisteína al ser un agente reductor, solo afecta aquellas proteínas cuya estructura dependa de los puentes disulfuro [aproximadamente el 5% de las estructuras que se conocen en la actualidad (Eggers & Valentine, 2001; Tetenbaum & Miller, 2001)]. Por lo que, en cuanto al resto de las proteínas presentes, a pesar que los puentes disulfuro estabilicen su estructura y la reducción de los mismos promueva conformaciones menos estables, este fenómeno no necesariamente causa cambios notables en en la configuración secundaria como lo hacen las temperaturas elevadas.

Con la información presentada en la Tabla 4.4 se puede observar entonces que los tratamientos en soya y garbanzo, efectivamente tuvieron un efecto diferente en la estructura secundaria de la proteína, como se especuló en la sección anterior (4.5.2) referente a las propiedades funcionales.

4.5.4. Perfil electroforético de CPS y CPG

Con la finalidad de seguir estudiando el efecto de estos tratamientos en los concentrados proteicos, se obtuvo el perfil electroforético de las proteínas de garbanzo y soya (controles y tratamientos) en condiciones no reductoras. Con esto se buscaba observar si tras los diferentes tratamientos de inactivación, se presentaba o no la formación de agregados proteicos, característica de procesamientos de alto impacto e indicativo adicional de modificaciones estructurales y disminución en la solubilidad de concentrados y aislados proteicos.

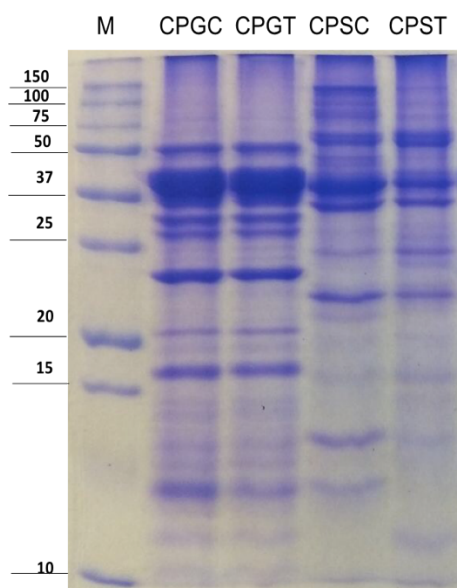


Figura 4.16. Perfil electroforético (SDS PAGE, acrilamida 15%, tinción coomassie) en condiciones no desnaturizantes de los concentrados proteicos de soja y garbanzo controles (CPSC y CPGC) y tratamientos (CPST y CPGT).

Carril M es el marcador de pesos moleculares.

En el caso del garbanzo, no se observaron diferencias en el patrón de bandeo o en la intensidad de las secciones al comparar el tratamiento de inactivación con el control, indicando que como se determinó en las secciones anteriores (4.5.1 y 4.5.2), la estructura proteica no sufrió cambios de manera general y que en efecto el uso de la L-cisteína resultó ser un tratamiento selectivo de inactivación de IT.

Por otro lado, al comparar soja control con el tratamiento de inactivación, si se observó un diferente patrón de bandeo, al igual que intensidades distintas entre algunas bandas en común. Por ejemplo, en soja control (carril 4), es posible observar bandas entre 150 y 75 kDa y entre 15 y 10 kDa cuya intensidad se ve disminuida en soja tratamiento (carril 5). En este último, más bien se ve una acumulación de proteína en la parte superior, que representa moléculas proteicas de mayor peso molecular.

Lo anterior indica que el procesamiento térmico llevado a cabo en soja, en efecto promovió la desnaturalización proteica, generando cambios irreversibles en la estructura terciaria y secundaria, lo que dio lugar a nuevas interacciones intermoleculares y por lo tanto a la formación de agregados proteicos (Davis & Williams, 1998). Es importante mencionar, que el término “cadenas agregadas” (cuyo % se vio reducido a 0 mediante el análisis con FTIR, sección 4.5.3) hace referencia a cadenas de aminoácidos extendidas y unidas mediante puentes de

hidrógeno (Jackson & Mantsch, 1995), mientras el término “agregados proteicos” hace referencia a cuerpos proteicos formados mediante interacciones hidrofóbicas entre proteínas desnaturalizadas (Fink, 1998).

4.5.5. Perfil de aminoácidos de concentrado de proteína de soya y garbanzo (CPS y CPG).

La composición de aminoácidos de aislados y concentrados proteicos juega un papel primordial, ya que, según la FAO (2013), es esta composición la que determina en gran medida su calidad, considerándose como una proteína completa a aquella que tiene todos los aminoácidos esenciales en cantidades que igualan o superan el requerimiento diario.

Con la intención de determinar si la composición de aminoácidos se vio afectada por los tratamientos de inactivación realizados, se determinó el perfil de los mismos en los concentrados controles y tratamientos (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Porcentaje de cumplimiento del requerimiento diario de la FAO (niños de 1-2 años) de concentrados proteicos de soya y garbanzo (controles y tratamientos).

		% de cumplimiento de requerimiento diario (mg/g proteína)							
Muestra	Tratamiento	Ile	Leu	Lys	SAA ¹	AAA ²	Thr	Trp	Val
Soya	Control	129	101	98	77	162	103	147	96
	Metabisulfito de sodio +80°C	118	90	90	74	139	98	128	86
Garbanzo	Control	122	99	96	70	154	86	96	91
	L-cisteína	121	97	94	72	162	87	97	90

¹ SAA, por sus siglas en inglés, (*sulfur-containing amino acids*) hace referencia al contenido de cisteína + metionina. ² AAA, por sus siglas en inglés, (*aromatic amino acids*) hace referencia al contenido de fenilalanina + tirosina.

Los perfiles de soya y garbanzo coinciden con lo reportado por Okezie & Bello (1988) y Singh *et al.* (1988). Destaca el contenido de de isoleucina y aromáticos y se encuentran deficiencias de lisina, pero sobre todo de aminoácidos azufrados (SAA). En el caso particular del garbanzo, también se encontró deficiencia de otros como treonina (2.33 g/100 g de proteína) y

triptófano (0.71 g/100 g de proteína). Todos los anteriores son aminoácidos comúnmente limitantes en las Fabáceas (WHO/FAO/UNU, 2011).

Al comparar soya control con el tratamiento, el % de cumplimiento del requerimiento diario de todos los aminoácidos esenciales, disminuyó, algo ya reportado por Taira (1973) y El-Adawy (2002) para soya y diferentes semillas de leguminosas sometidas a procesamiento térmico. Durante la aplicación de calor, los factores que promueven la destrucción de los aminoácidos son principalmente la temperatura, el tiempo de tratamiento y la presencia de agua, afectando en diferente medida a cada aminoácido. En el caso de la lisina, cisteína, triptófano y serina, requieren poco más de una hora, como fue en este caso, para que su contenido comience a verse reducido, además, mientras que la reducción de lisina se ve aún más potenciada por la presencia de agua, para otros aminoácidos como el triptófano, este factor no es decisivo (Taira, 1973).

A diferencia de la soya, tras el tratamiento aplicado en garbanzo, el % de cumplimiento del requerimiento diario de los aminoácidos esenciales, disminuyó solo en el caso de isoleucina, leucina, lisina y valina, además estas reducciones fueron mínimas (0.82, 2.02, 2.08 y 1.1% respectivamente). No existen reportes en la literatura que evalúen el efecto de agentes reductores en la composición del perfil de amino ácidos de leguminosas, sin embargo, es evidente que el efecto de los mismos es menor al generado por procesamiento térmico.

Ya analizado el efecto de los tratamientos en estructura secundaria, perfil electroforético y contenido de aminácidos, se hizo un análisis ahora a nivel de microestructura, rasgo asociado a los métodos de deshidratación, en este caso el secado por aspersion, así como en las propiedades de flujo, importantes en el procesamiento y almacenamiento en condiciones industriales.

4.5.6. Microestructura de Concentrados de Proteína de Soya y Garbanzo (CPS y CPG)

La morfología y tamaño de las partículas puede influir en la funcionalidad de concentrados o aislados proteicos (Sreerama *et al.*, 2009), así que con el objetivo de determinar la microestructura de los productos obtenidos a partir de soya y garbanzo con y sin tratamiento de inactivación de IT, se realizó microscopía electrónica de barrido (SEM) después del secado por aspersion (figuras 4.17 y 4.18).

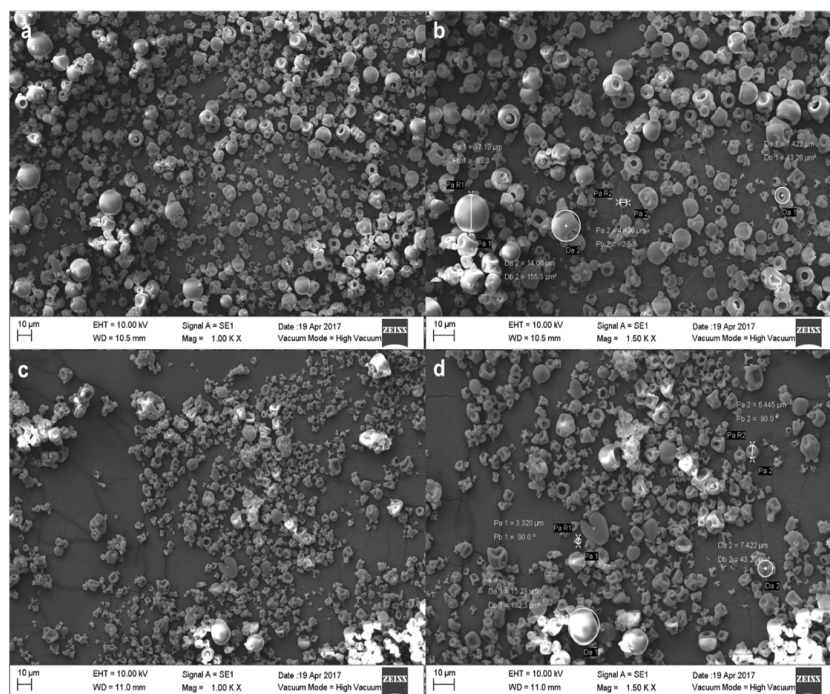


Figura 4.17. Micrografía de microscopía electrónica de barrido de los concentrados proteicos de soja: a.b. Control y c.d. tratados (Metabisulfito de sodio +80°C). Figuras del lado izquierdo x1000 y figuras del lado derecho x1500.

Para todos los concentrados proteicos, se observó que las partículas cuentan con una morfología de superficie doblada o hundida. Esto se debe a que durante el proceso de secado por aspersión las gotas de la solución proteica entran en contacto con aire caliente y seco lo que causa que la humedad abandone las partículas asperjadas en la cámara de deshidratación y estas se encojan (Gong *et al.*, 2016).

En general el tamaño de las partículas de ambas materias primas y tratamientos fue muy similar, en un rango de 3.23 a 33.39 μm . Estos resultados sugieren que el diferente tamaño de boquilla del aspersor utilizada para soja y garbanzo (1 mm y 2.7 mm respectivamente), no afectó esta característica, ni tampoco influyeron factores como la materia prima ni tratamiento de inactivación selectiva. Es interesante mencionar que este rango de tamaño está dentro de los 10 a 50 μm que Gharsallaoui *et al.* (2007) reportó para ingredientes alimenticios obtenidos mediante secado por aspersión. La variación en el tamaño de partícula está asociada a factores como concentración de sólidos y las condiciones de operación de los secadores. Se sabe que, a mayor concentración de sólidos de la solución de entrada, mayor será el tamaño de las partículas. En este caso el tamaño está en un rango medio del intervalo reportado, lo cual es propio de

soluciones con un contenido <20% de sólidos, como las utilizadas aquí (Elversson & Millqvist-Fureby, 2005). Por otro lado, parámetros como temperatura y flujo de alimentación al secador no solo afecta el tamaño de la partícula, sino también su morfología y contenido de humedad final. Las microestructuras hundidas o de “dona” (Figuras 4.17 y 4.18) son características de procesos de secado con temperaturas de salida mayores a 35°C (Maa *et al.*, 1997). En este trabajo la temperatura del aire de salida fue de 60°C.

El hecho de que el tamaño y forma de las partículas finales sean parecidos a pesar del origen de los concentrados y los tratamientos aplicados, confirma que estas características están dadas por el proceso de secado por aspersión.

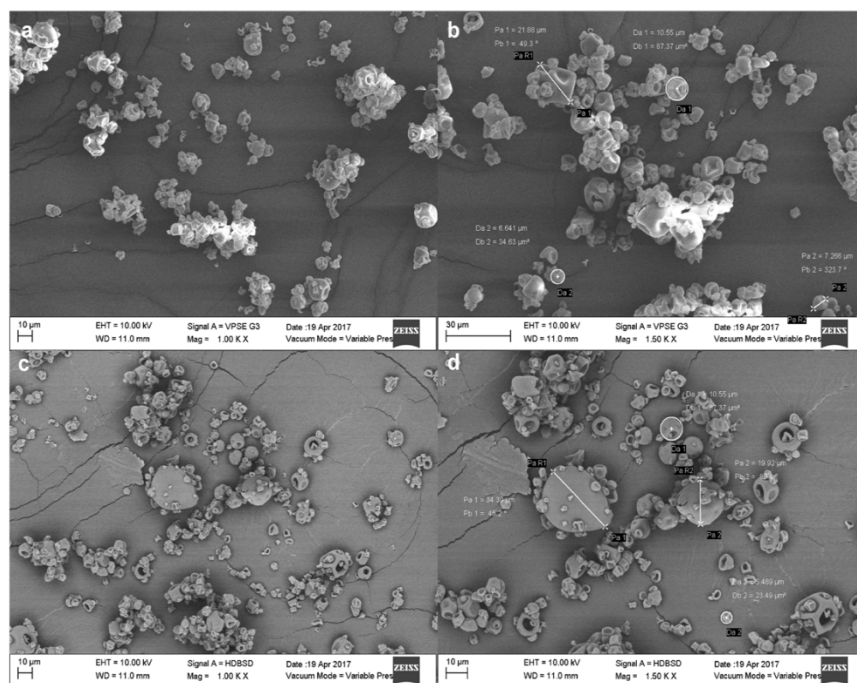


Figura 4.18. Micrografía de microscopía electrónica de barrido de los concentrados proteicos de garbanzo: a.b. Control y c.d. tratados (L-cisteína). Figuras del lado izquierdo x1000 y figuras del lado derecho x1500.

4.5.7. Propiedades de flujo y actividad de agua de Concentrados de Proteína de Soya y Garbanzo (CPS y CPG).

Estas características fueron determinadas con la finalidad de contar con una evaluación completa de los concentrados proteicos, y aunque por el momento no sean de mayor utilidad, podrían servir en futuros trabajos de investigación que incluyan el estudio del comportamiento de CPS y CPG en procesos industriales.

4.5.7.1. Actividad de agua

El agua es el principal ingrediente en muchos alimentos y su presencia tiene un efecto significativo en la estabilidad química y estructural de los mismos. La cantidad de agua libre en los alimentos es conocida como actividad de agua (a_w). Con este parámetro se puede conocer la posibilidad que tienen los microorganismos para crecer, resistir y sobrevivir. En este caso, la a_w se determinó para investigar si los tratamientos aplicados a harina de soya o garbanzo tuvieron un impacto en la calidad del producto final (concentrados proteicos, Figura 4.19.). Un incremento en este parámetro resultaría en desventajas como una menor vida de anaquel. Además, el valor de a_w permite saber si el producto final requerirá: 1) la adición de preservativos microbianos y 2) de qué características, ya que dependiendo de la a_w de un producto, es el tipo de microorganismo capaz de prosperar.

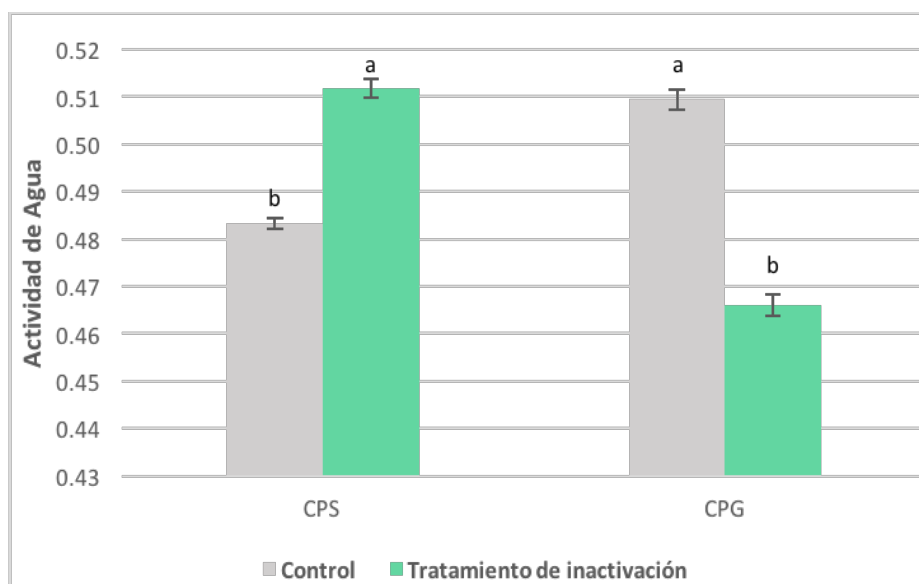


Figura 4.19. Actividad de agua de concentrado proteico de soya (CPS) y concentrado proteico de garbanzo (CPG) antes y después de su tratamiento de inactivación más efectivo (para CPS: meta-bisulfito de sodio + 80°C; para CPG: L-cisteína).

Letras diferentes entre columnas control y tratamiento para cada leguminosa indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

La a_w para CPS y CPG control (0.48 y 0.51 respectivamente) está dentro del rango considerado como seguro ya que en valores < 0.6 no ocurre crecimiento microbiano dado que los

microorganismos patógenos no toleran $a_w < 0.85$ (Troller, 2012). Estos resultados son consistentes también con lo previamente reportado para concentrados y aislados proteicos de diferentes leguminosas (Ayranci & Duman, 2005; Ulloa *et al.*, 2015). En cuanto al efecto que pudo tener el proceso de secado por aspersión en estos diferentes valores, se ha encontrado que mientras que la humedad está influenciada por la temperatura de salida de este proceso, donde a mayor temperatura menor humedad, el a_w no necesariamente ya que este dependerá de las interacciones que tengan las moléculas del ingrediente de la matriz con la humedad remanente (Susantikarn & Donlao, 2016).

Al comparar los concentrados proteicos control de estas leguminosas con sus tratamientos, se encontraron cambios significativos. Por ejemplo, en el caso de CPS tratado ($80^\circ\text{C} + \text{MBSS}$), este parámetro aumentó un 6%, lo que coincide con lo reportado por Syamaladevi *et al.* (2016) quienes encontraron que, tratando ingredientes como harina de maíz y crema de cacahuete más allá de los 80°C , la a_w incrementa hasta un 77%. Este suceso lo atribuyen a la ruptura de los enlaces de hidrógeno a estas temperaturas, lo que promueve la exposición de residuos hidrofóbicos, incrementándose así las moléculas libres de agua en el alimento. También podría estar asociado, tal como se revisó en la sección anterior de funcionalidades, con la formación de agregados y la mayor capacidad de las moléculas proteicas sometidas a tratamiento térmico de absorber agua y por lo tanto su menor susceptibilidad a deshidratarse en el secador por aspersión teniendo entonces más agua disponible en el polvo remanente.

Por otro lado, el CPG tratamiento (L-cisteína) muestra un decremento del 8.5% de a_w comparado con su control. Lo anterior pudo ser generado por la presencia de L-cisteína y residuos libres de cisteína de las proteínas que fueron reducidas (incluyendo inhibidores de tripsina). Estos residuos libres, es decir el grupo sulfhidrilo, tiene la capacidad tanto de donar enlaces de hidrógeno como de aceptarlos, reduciendo así el agua libre en los alimentos (Gregoret *et al.*, 1991).

A pesar del incremento o reducción de los tratamientos comparados con los controles, todos los valores de a_w determinados, como ya se mencionó, están por debajo del 0.6, asegurándose así la estabilidad de las cuatro muestras al almacenamiento a temperatura ambiente.

4.5.7.2. Densidad de bulto o cruda.

La densidad de bulto se define como la masa de las partículas del material dividido en el volumen total que estas ocupan. El volumen total incluye: el de la partícula, del vacío interpartícula y el del poro interno. Esta es una propiedad propia de polvos y sólidos divididos como es el caso de muchos ingredientes en la industria de alimentos. La densidad de bulto se determinó con la finalidad de hacer una caracterización de los concentrados proteicos obtenidos, siendo esta una característica importante a considerar para planear el espacio de almacén de productos no comprimidos (Qiu *et al.*, 2015). Los valores obtenidos se muestran en la Figura 4.20.

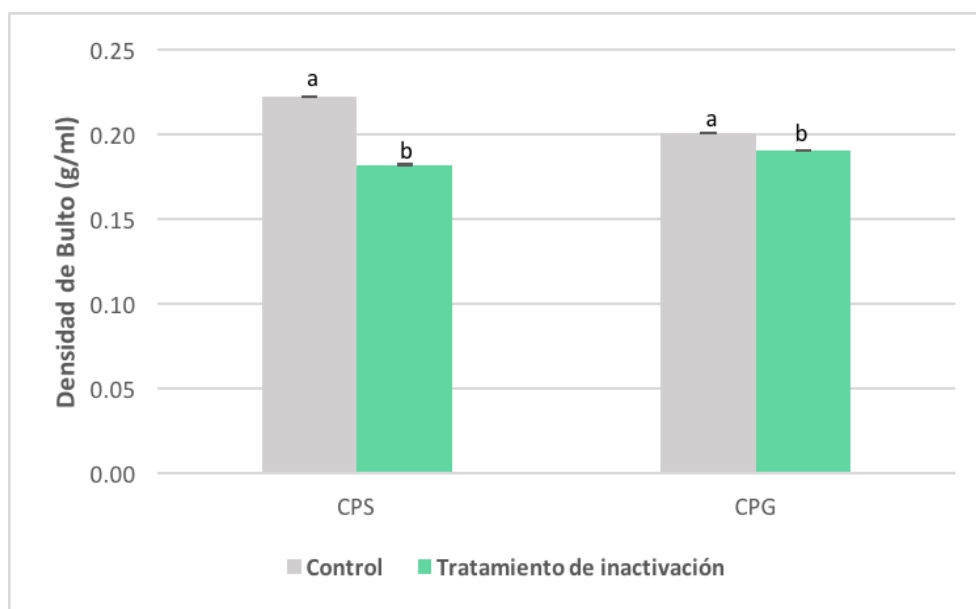


Figura 4.20. Densidad bulto de concentrado proteico de soya (CPS) y concentrado proteico de garbanzo (CPG) antes y después de su tratamiento de inactivación más efectivo (para CPS: meta-bisulfito de sodio + 80°C; para CPG: L-cisteína).

Letras diferentes entre columnas control y tratamiento para cada leguminosa indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

La densidad de bulto tanto para el concentrado proteico control de soya como para garbanzo (0.22 y 0.20 g/mL respectivamente), es similar a lo ya reportado en la literatura, donde para CPS se encuentran valores promedio de 0.22 g/mL y para CPG de 0.25 g/mL (Mohamed *et al.*, 2009; Ghribi *et al.*, 2015).

Comparando los controles con los tratamientos, en estos últimos tanto en soya como en garbanzo, la densidad de bulto disminuyó a 0.18 y 0.19 g/mL respectivamente. El rango del valor de densidad de bulto de todas las muestras en general, está influenciado por el método de secado y la temperatura empleada. Por otro lado, las pequeñas diferencias entre control y tratamiento son asociadas a la distribución de tamaño de partícula y la porosidad de las misma (Ghribi *et al*, 2015).

4.5.7.3. Densidad compactada

Otro parámetro para la caracterización de polvos, es la densidad compactada, obtenida después de golpear mecánicamente el recipiente de medición graduado utilizado para la prueba anterior (densidad de bulto). Este parámetro se define como la densidad de bulto seca o sin espacios y el valor obtenido será mayor al anterior, dada la reducción de volumen generada en el asentamiento (Håkansson & Lipiec, 2000). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.21.

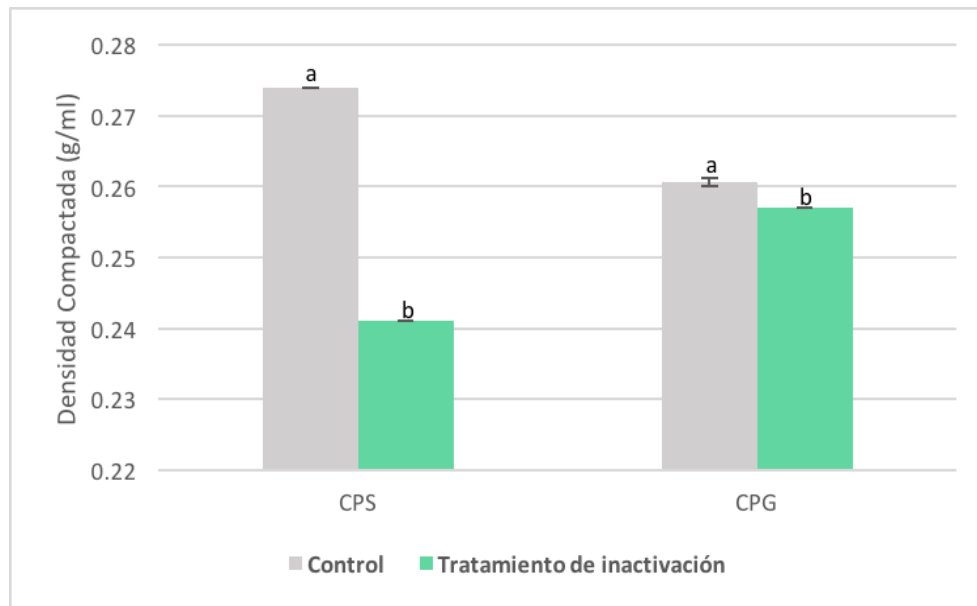


Figura 4.21. Densidad compactada de concentrado proteico de soya (CPS) y concentrado proteico de garbanzo (CPG) antes y después de su tratamiento de inactivación más efectivo (para CPS: metabisulfito de sodio + 80°C; para CPG: L-cisteína).

Letras diferentes entre columnas control y tratamiento para cada leguminosa indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

Como se mencionó, el valor de este parámetro va a depender en su totalidad del obtenido para densidad de bulto. Comparado con este último parámetro, la densidad de los concentrados proteicos tanto controles como tratamiento al compactarse aumentan entre 21 y 36% dependiendo del espacio interpartícula existente en cada una de las muestras.

La principal utilidad de estos datos, requeridos para cualquier polvo químico, farmacéutico, alimenticio y de la industria en general, es saber cómo el material se comportaría durante futuros procesos de transporte y el volumen real que ocuparía si este es compactado al empacarse (Håkansson & Lipiec, 2000).

4.5.7.4 Índice de Hausner o de fluidez

El índice de Hausner, ampliamente utilizado en la industria, es un número relacionado con la fluidez de un polvo o material granular. Los valores obtenidos para los concentrados proteicos se muestran en la Figura 4.22.

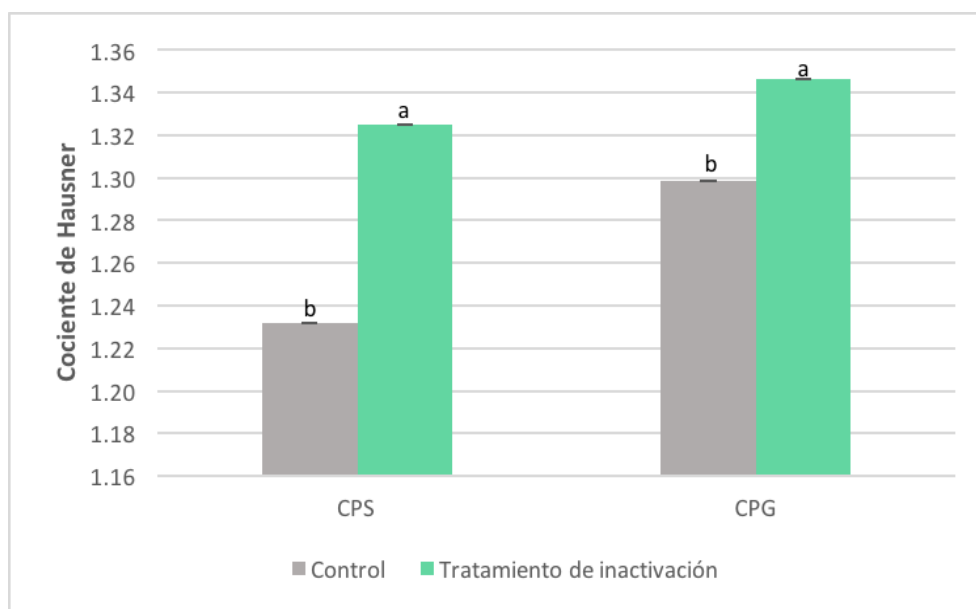


Figura 4.22. Cociente de Hausner de concentrado proteico de soya (CPS) y concentrado proteico de garbanzo (CPG) antes y después de su tratamiento de inactivación más efectivo (para CPS: meta-bisulfito de sodio + 80°C; para CPG: L-cisteína).

Letras diferentes entre columnas control y tratamiento para cada leguminosa indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

Los resultados para los concentrados proteicos tanto controles como tratamientos, indican valores entre 1.23 y 1.34, siendo estos últimos los más altos. Lo más importante a rescatar, es que valores entre 1.19 y mayores a 1.25 son de regulares a pobres. Este parámetro depende en gran medida del proceso de secado. Valores mayores a 0.84 son asociados a ingredientes generados mediante secado por aspersión que cuenten con un tamaño de partícula a partir de 15 μm , que como se vio en la sección 4.5.4, es el caso de todos los concentrados proteicos obtenidos en este trabajo.

Los tratamientos tanto en soya como en garbanzo presentaron un mayor índice de Hausner respecto a su control (entre 4 y 7.5% mayor). Al ser el índice de fluidez una relación entre los valores de densidad ($IH = \rho_c / \rho_b$), era de esperarse que al ser la densidad de bulto (ρ_b) menor con respecto a la densidad compactada (ρ_c) en los tratamientos selectivos de soya y garbanzo, el índice de Hausner fuera mayor. Este resultado implicaría una mayor porosidad de las partículas (Tontul *et al.*, 2016), sin embargo, en las micrografías previamente presentadas en este capítulo no se observaron diferencias en la superficie de las partículas, ni tampoco en tamaño ni volumen.

Capítulo 5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

Los ingredientes provenientes de leguminosas, como harinas, concentrados y aislados proteicos, representan una opción más económica y sustentable para cumplir la demanda requerida de macronutrientes al compararse con productos de origen animal. Estos ingredientes, pueden ser utilizados como parte de la formulación de diversos productos alimenticios, ya sea con el fin de mejorar sus propiedades nutrimentales o como elementos funcionales siempre y cuando sus factores antinutricionales asociados, sean reducidos al máximo.

Con este fin, en esta tesis se evaluó el efecto del procesamiento térmico y/o agentes reductores (L-cisteína o metabisulfito) sobre la actividad de inhibidor de tripsina de harina de soya o garbanzo Blanco Sinaloa. Al analizar la materia prima, se encontró que mientras en soya el macronutriente más abundante es la proteína cruda (47.02%), en garbanzo fueron los carbohidratos (59.33%). Respecto a su perfil proteico, fue posible identificar las subunidades de las proteínas más abundantes, β -conglucina y glicina en el caso de soya, y legumina y vicilina en el caso del garbanzo.

Para la determinación de la AIT de la materia prima, fue necesario modificar el protocolo de análisis en el caso del garbanzo con el fin de obtener resultados reproducibles, encontrándose así las mejores condiciones de estudio de ITs para esta leguminosa. Además, se comprobó que mientras que la soya cuenta con un único ITK con un peso alrededor de los 20 kDa, el garbanzo cuenta con dos inhibidores de este tipo, uno de aproximadamente 25 y otro de 37 kDa.

Tras ejecutar los tratamientos de inactivación de IT, se puede concluir que el procesamiento térmico (80°C) representa un método prometedor para la reducción de AIT en soya (hasta en 76.41%) y que al combinarlo con metabisulfito de sodio (MBSS) se presenta un efecto sinérgico, ya que la AIT se disminuyó en un 85.71%. El porcentaje de inactivación obtenido al combinar MBSS + 80°C resulta ser mayor que el presentado por otros tratamientos térmicos tradicionales. Por ejemplo, 5% mayor que la inactivación lograda por el método de tostado y 21% mayor que la inactivación por microondas (Avilés-Gaxiola *et al.*, 2017).

En el caso del garbanzo, el tratamiento a 80°C no redujo la AIT, así que las pruebas térmicas se hicieron a 121°C. Aún con este nivel de temperatura, los resultados no mostraron una reducción significativa de la actividad del inhibidor (15 U/mg de AIT *versus* 21 U/mg del control), resultado

muy diferente cuando se probó el efecto de agentes reductores, sobre todo de la L-cisteína (de 74.5% hasta 89.1% de reducción con respecto al control). El porcentaje de inactivación máximo alcanzado mediante el uso de L-cisteína, es mayor al logrado mediante otros tratamientos de inactivación. Por ejemplo, 6, 8, 72 y 89% mayor que mediante autoclave, hervido, germinación y ultrafiltración respectivamente (Avilés-Gaxiola *et al.*, 2017).

Al evaluar las propiedades funcionales de los concentrados de soya y garbanzo obtenidos con los mejores tratamientos de inactivación de inhibidor de tripsina, se observó que en la soya la solubilidad en agua bajó en más del 44%, mientras que la absorción aumentó de 1.0 a 4.6 veces su peso. En el caso del garbanzo ni la solubilidad ni absorción de agua cambiaron respecto al control. Las diferencias en la funcionalidad de los concentrados de soya se pueden atribuir a los cambios en estructura secundaria de sus proteínas, en cuyo análisis se observó un incremento en motivos generales, pero una reducción en las cadenas agregadas (de 9 a 0%). Estas diferencias también se pudieron observar en el perfil electroforético de los concentrados de soya que, a diferencia de los productos de garbanzo, cambiaron una vez ejecutado el tratamiento de inactivación de IT. En cuanto a la IVPD, a pesar que los tratamientos de inactivación en ambas leguminosas propiciaran una tendencia a aumentar este parámetro, este incremento no fue estadísticamente significativo.

Finalmente, al evaluar las características de los polvos obtenidos tanto en soya como en garbanzo, se encontró que los tratamientos de inactivación no afectaron ni la microestructura, ni el tamaño de las partículas obtenidas, características que fueron más bien dadas por el proceso de secado por aspersion. Por otro lado, aunque los tratamientos de inactivación afectaron de manera significativa características como actividad de agua (a_w) e índice de Hausner en los concentrados proteicos de ambas leguminosas, estos cambios no hacen la diferencia a nivel industrial, ya que tanto controles como tratamientos resultaron poseer una a_w considerada como segura y un índice de Hausner con el que se pueden catalogar como polvos con pobre fluidez.

Con estos resultados, se puede concluir que la estructura de los inhibidores de tripsina de soya y garbanzo es diferente, ya que su actividad fue afectada de forma diferenciada ante el uso de altas temperaturas y agentes reductores. Además, la aplicación de estos compuestos químicos de acuerdo a la naturaleza de los inhibidores de leguminosas, abre la posibilidad de crear ingredientes alimenticios con alto porcentaje proteico (concentrados y aislados) y AIT reducida, con la ventaja de mantener la funcionalidad de la proteína presente en las materias primas.

5.2. Recomendaciones

Con los resultados obtenidos en esta investigación, se puede recomendar lo siguiente:

- Caracterizar los ITs encontrados en garbanzo.
- Determinar tanto la concentración óptima de L-cisteína como el tiempo óptimo de tratamiento requeridos para lograr reducciones importantes en la AIT de garbanzo.
- Determinar tanto la concentración óptima de metabisulfito de sodio como el tiempo de procesamiento térmico óptimo requeridos para lograr reducciones importantes en la AIT de soya.
- Evaluar el uso de otras técnicas de inactivación de ITs en soya con la finalidad de superar los problemas asociados al uso de tratamiento térmico.
- Evaluar el efecto de una temperatura media de tratamiento en soya (alrededor de 50°C) en conjunto con agentes reductores como MBSS sobre la AIT y funcionalidad de proteínas.
- Determinar el efecto del uso de agentes reductores en la AIT de otras leguminosas.
- Optimizar las condiciones de extracción proteica, principalmente las de centrifugado, definiendo condiciones de velocidad, tiempo y temperatura que permitan el mayor rendimiento para cada leguminosa, tomando en cuenta parámetros como el referente al tamaño de partícula.
- Determinar la digestibilidad *in vivo* de concentrados de soya y garbanzo para superar las desventajas asociadas al método *in vitro*.

Bibliografía

AACC International (2000). Approved Methods of American Association of Cereal Chemists. Ed.10. AACC International, St. Paul, MN.

Abtahi, S., & Aminlari, M. (1997). Effect of sodium sulfite, sodium bisulfite, cysteine, and pH on protein solubility and sodium dodecyl sulfate– polyacrylamide gel electrophoresis of soybean milk base. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), 4768-4772.

Acosta, G.J.A., Gutiérrez, P.E., Velarde, F.S. (2014). Jumbo 2010 Nueva Variedad de Garbanzo Blanco de Exportación para el Estado de Sinaloa. SAGARPA-INIFAP- CIRNO- Campo Experimental Valle de Culiacán. Folleto Técnico No.60, pág. 3-30.

Adeyemo, S. M., & Onilude, A. A. (2013). Enzymatic reduction of anti-nutritional factors in fermenting soybeans by *Lactobacillus plantarum* isolates from fermenting cereals. *Nigerian Food Journal*, 31(2), 84-90.

Aguilar-Raymundo, V. G., & Vélez-Ruiz, J. F. (2013). Propiedades nutricionales y funcionales del garbanzo (*Cicer arietinum* L.). *Temas Selectos De Ingeniería De Alimentos*, 7(2), 25-34.

Akibode, S., & Maredia, M. K. (2012). Global and regional trends in production, trade and consumption of food legume crops. Department of Agricultural, Food, and Resource Economics, Michigan State University.

Alajaji, S. A., & El-Adawy, T. A. (2006). Nutritional composition of chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by microwave cooking and other traditional cooking methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(8), 806-812.

Alonso, R., Aguirre, A., & Marzo F. (2000). Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and *in vitro* digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chemistry*, 68(2), 159-165.

Alleoni, A. C. C. (2006). Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. *Scientia Agricola*, 63(3), 291-298.

Aminlari, M., Ferrier, L. K., & Nelson, A. I. (1977). Protein dispersibility of spray-dried whole soybean milk base: Effect of processing variables. *Journal of Food Science*, 42(4), 985-988.

AOAC. (1992). American Organization of Analytical Chemists International. Método oficial 962.09, 978.02, 925.10, 923.03, 982.30. Determinación de fibra cruda, nitrógeno total, humedad, cenizas, perfil de aminoácidos. Washington, DC.

AOCS. (2006). Official and Tentative Methods of the American Oil Chemist's Society. American Oil Chemist's Society (AOCS). Método Ba 11-65. Índice de solubilidad de nitrógeno. Urbana, IL, EU.

Bibliografía

Aparicio-Fernandez, X., Yousef, G. G., Loarca-Pina, G., de Mejia, E., & Lila, M. A. (2005). Characterization of polyphenolics in the seed coat of Black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 53(11), 4615-4622.

Avilés-Gaxiola, S., Chuck-Hernández, C., & Serna-Saldívar, S.O. (2017). Inactivation methods of trypsin inhibitor in legumes: a review. Manuscrito aceptado para publicación. *Journal of Food Science*

Ayranci, E., & Duman, O. (2005). Moisture sorption isotherms of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and its protein isolate at 10, 20 and 30 C. *Journal of Food Engineering*, 70(1), 83-91.

Badui-Dergal, S. (2006). Química de los alimentos. Pearson Educación, Naucalpan de Juárez, México. 736.

Bajaj, D., Das, S., Upadhyaya, H. D., Ranjan, R., Badoni, S., Kumar, V., Tripathi, S., Laxmipathi-Gowda, C.L., Sharma, S., Singh, S., Tyagi, A.K. & Parida, S.K. (2015). A genome-wide combinatorial strategy dissects complex genetic architecture of seed coat color in chickpea. *Frontiers in Plant Science*, 6.

Baker, E. C., & Mustakas, G. C. (1973). Heat inactivation of trypsin inhibitor, lipoxygenase and urease in soybeans: effect of acid and base additives. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 50(5), 137-141.

Barac, M., & Stanojević, S. (2005). The effect of microwave roasting on soybean protein composition and components with trypsin inhibitor activity. *Acta Alimentaria*, 34(1), 23-31.

Barbosa, A. C. L., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2006). Influence of temperature, pH and ionic strength on the production of isoflavone-rich soy protein isolates. *Food Chemistry*, 98(4), 757-766.

Bard, D. (2016). Global pulse convention market outlooks (part II): chickpeas and dry peas. International Food Trader. Consultado el 10 de Octubre de 2017, en : <https://www.goift.com/news/160630-pulses-feature-global-pulse-convention-market-outlooks-part-ii-chickpeas-and-dry-peas-bard/>

Basset, C., Boye, J., Tyler, R., Oomah, B.D. (2010). Molecular, functional and processing characteristics of whole pulses and pulse fractions and their emerging food and nutraceutical applications. *Special Issue Food Research International*, 43,397-659

Benjakul S., Visessanguan, W., & THUMMARATWASIK, P. (2000). Isolation and characterization of trypsin inhibitors from some Thai legume seeds. *Journal of Food Biochemistry*, 24(2), 107-127.

Bhagyawant, S. S., & Srivastava, N. (2008). Assessment of antinutritional factors and protein content in the seeds of chickpea cultivars and their divergence. *Journal of Cell and Tissue Research*, 8(1), 1333.

Bhattacharya, S., & Jena, R. (2007). Gelling behavior of defatted soybean flour dispersions due to microwave treatment: Textural, oscillatory, microstructural and sensory properties. *Journal of Food Engineering*, 78(4), 1305-1314.

Birk, Y. (1985). The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin-and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. *Chemical Biology and Drug Design*, 25(2), 113-131.

Bibliografía

- Boari, R., Chuard, N., Fernández, V., & Pouiller, P. (2014). Mercado de ganados y carnes. Proyecciones 2012 OCDE-FAO. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Consultado el 9 de octubre de 2017, de: <http://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/bovinos/mercados/archivos/000003=Mercado%20internacional%20de%20carnes/000001-Proyección%20OCDE%20FAO%20carnes%202014-2023.pdf>
- Boland, M. (2013). Global food supply: the world's need for protein. Riddet Institute, Otago, Nueva Zelanda. Consultado el 9 de octubre de 2017, de: <http://www.riddet.ac.nz/sites/default/files/content/2013%20Protein%20supply%20Mike%20Boland.pdf>
- Borchers, R., Ackerson, C.W., & Kimmelt, L. (1947) Trypsin inhibitor. IV. Occurrence in seeds of the Leguminosae and other seeds. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 13,291-293.
- Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43(2), 414-431.
- Butt, M. S., & Batool, R. (2010). Nutritional and functional properties of some promising legumes protein isolates. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(4), 373-379.
- Caballero de la Peña, K. (2015), Análisis del valor nutrimental de una bebida a base de pulpa de fruta suplementada con proteína vegetal *in vitro* y en un modelo murino, Tesis de Maestría en Biotecnología. Tecnológico de Monterrey.
- Caillard, R., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2009). Physicochemical properties and microstructure of soy protein hydrogels co-induced by Maillard type cross-linking and salts. *Food Research International*, 42(1), 98-106.
- Carbonaro, M., Maselli, P., & Nucara, A. (2012). Relationship between digestibility and secondary structure of raw and thermally treated legume proteins: a Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study. *Amino Acids*, 43(2), 911-921.
- CGIAR. (2010). Chickpea. Consultado el 10 de octubre de 2017, de: <http://www.cgiar.org/our-strategy/crop-factsheets/chickpea/>
- Chan, Y. S., Zhang, Y., & Ng, T. B. (2013). Brown kidney bean Bowman–Birk trypsin inhibitor is heat and pH stable and exhibits anti-proliferative activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169 (4), 1306-1314.
- Chang, Y. W., Alli, I., Molina, A. T., Konishi, Y., & Boye, J. I. (2012). Isolation and characterization of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed protein fractions. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 618-625.
- Cheftel, J.C., Cuq, J.L. & Lorient, D. (1989). Propiedades funcionales de las proteínas. (Capítulo 4). Proteínas alimentarias. Acribia: España, Pp 49-57.
- Chevallet, M., Luche, S., & Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, 1(4), 1852.

Chougule, N. P., Hivrale, V. K., Chhabda, P. J., Giri, A. P., & Kachole, M. S. (2003). Differential inhibition of *Helicoverpa armigera* gut proteinases by proteinase inhibitors of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and its wild relatives. *Phytochemistry*, 64(3), 681-687.

Chove, B. E., Grandison, A. S., & Lewis, M. J. (2001). Emulsifying properties of soy protein isolate fractions obtained by isoelectric precipitation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(8), 759-763.

Chrispeels, M. J., & Baumgartner, B. (1978). Trypsin inhibitor in mung bean cotyledons purification, characteristics, subcellular localization, and metabolism. *Plant Physiology*, 61(4), 617-623.

CIEP. (2013). Posición de las principales legumbres en México: 2000-2011. Consultado el 11 de octubre de 2017, de: <http://ciep.mx/posicion-de-las-principales-legumbres-en-mexico-2000-2011/>

Clemente, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., Bautista, J., & Millán, F. (2000). Factors affecting the in vitro protein digestibility of chickpea albumins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(1), 79-84.

Collins, J. L., & Beaty, B. F. (1980). Heat inactivation of trypsin inhibitor in fresh green soybeans and physiological responses of rats fed the beans. *Journal of Food Science*, 45(3), 542-546.

Dabhade, A. R., Mokashe, N. U., & Patil, U. K. (2016). Purification, characterization, and antimicrobial activity of nontoxic trypsin inhibitor from *Albizia amara* Boiv. *Process Biochemistry*, 51(5), 659-674.

Davis, P. J., & Williams, S. C. (1998). Protein modification by thermal processing. *Allergy*, 53(s46), 102-105.

De Almeida Costa, G. E., da Silva Queiroz-Monici, K., Reis, S. M. P. M., & de Oliveira, A. C. (2006). Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chemistry*, 94(3), 327-330.

De Mejía, E.G., Guzmán-Maldonado, S.H., Acosta-Gallegos, J.A., Reynoso-Camacho, R., Ramírez-Rodríguez, E., Pons-Hernández, J.L., González-Chavira, M.M., Castellanos, J.Z., & Kelly, J.D. (2003). Effect of cultivar and growing location on the trypsin inhibitors, tannins, and lectins of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in the semiarid highlands of Mexico. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(20), 5962-5966.

Dhen, N., Román, L., Rejeb, I. B., Martínez, M. M., Garogouri, M., & Gómez, M. (2016). Particle size distribution of soy flour affecting the quality of enriched gluten-free cakes. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 179-185.

Eggers, D. K., & Valentine, J. S. (2001). Molecular confinement influences protein structure and enhances thermal protein stability. *Protein Science*, 10(2), 250-261.

Egounlety, M., & Aworh, O. C. (2003). Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine*

Bibliografía

max Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms). *Journal of Food Engineering*, 56(2), 249-254.

El-Adawy, T.A.(2002). Nutritional composition and antinutritional factors of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) undergoing different cooking methods and germination. *Plant Foods for Human Nutrition*, 57(1),83-97

Elferink, M., & Schierhorn, F. (2016). Food is rising. Can we meet it?. Harvard University, Massachusetts, Estados Unidos de America. Consultado el 9 de octubre de 2017, de: <https://hbr.org/2016/04/global-demand-for-food-is-rising-can-we-meet-it>

Elversson, J., & Millqvist-Fureby, A. (2005). Particle size and density in spray drying—effects of carbohydrate properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(9), 2049-2060.

Embaby, H. E. S. (2010). Effect of heat treatments on certain antinutrients and *in vitro* protein digestibility of peanut and sesame seeds. *Food Science and Technology Research*, 17(1), 31-38.

FAO. (2011). Joint FAO/WHO food standards programme codex committee on nutrition and foods for special dietary uses. FAO/WHO, food standards programme. Germany

Friedman, M. (1999). Chemistry, biochemistry, nutrition, and microbiology of lysinoalanine, lanthionine, and histidinoalanine in food and other proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1295-1319.

FAO. (2013). Año internacional de la quinua 2013. Consultado el 17 de febrero de 2016, de: <http://www.fao.org/quinoa-2013/what-is-quinoa/nutritional-value/es/>

Fink, A. L. (1998). Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding and design*, 3(1), R9-R23.

Friedman, M., & Gumbmann, M. R. (1986). Nutritional improvement of soy flour through inactivation of trypsin inhibitors by sodium sulfite. *Journal of Food Science*, 51(5), 1239-1241.

Gaines, C. S., Miller, R. E., Donelson, J. R., & Bean, M. M. (1987). Optimizing grinder type and methods of expressing wheat meal particle size for wheat texture (hardness or softness) measurement and near-infrared reflectance spectroscopy. *Cereal Chemistry*, 64(1), 46-49.

Georget, D. M., & Belton, P. S. (2006). Effects of temperature and water content on the secondary structure of wheat gluten studied by FTIR spectroscopy. *Biomacromolecules*, 7(2), 469-475.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107-1121.

Ghavidel, R. A., & Prakash, J. (2007). The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, *in vitro* iron and calcium bioavailability and *in vitro* starch and protein digestibility of some legume seeds. *LWT-Food Science and Technology*, 40(7), 1292-1299.

Ghribi, A. M., Gafsi, I. M., Blecker, C., Danthine, S., Attia, H., & Besbes, S. (2015). Effect of drying methods on physico-chemical and functional properties of chickpea protein concentrates. *Journal of Food Engineering*, 165, 179-188.

Gilani, G. S., Cockell, K. A., & Sepehr, E. (2005). Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acid availability in foods. *Journal of AOAC International*, 88(3), 967-987.

Gilani, G. S., & Sepehr, E. (2003). Protein digestibility and quality in products containing antinutritional factors are adversely affected by old age in rats. *The Journal of Nutrition*, 133(1), 220-225.

Giri, A. P., Harsulkar, A. M., Ku, M. S., Gupta, V. S., Deshpande, V. V., Ranjekar, P. K., & Franceschi, V. R. (2003). Identification of potent inhibitors of *Helicoverpa armigera* gut proteinases from winged bean seeds. *Phytochemistry*, 63(5), 523-532.

Gong, K. J., Shi, A. M., Liu, H. Z., Liu, L., Hu, H., Adhikari, B., & Wang, Q. (2016). Emulsifying properties and structure changes of spray and freeze-dried peanut protein isolate. *Journal of Food Engineering*, 170, 33-40.

Graham, P. H., & Vance, C. P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131(3), 872-877.

Grieshop, C. M., Kadzere, C. T., Clapper, G. M., Flickinger, E. A., Bauer, L. L., Frazier, R. L., & Fahey, G. C. (2003). Chemical and nutritional characteristics of United States soybeans and soybean meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7684-7691.

Gregoret, L. M., Rader, S. D., Fletterick, R. J., & Cohen, F. E. (1991). Hydrogen bonds involving sulfur atoms in proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 9(2), 99-107.

Guerrero-Beltrán, J. A., Estrada-Girón, Y., Swanson, B. G., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2009). Pressure and temperature combination for inactivation of soymilk trypsin inhibitors. *Food Chemistry*, 116(3), 676-679.

Guillamon, E., Pedrosa, M. M., Burbano, C., Cuadrado, C., de Cortes Sánchez, M., & Muzquiz, M. (2008). The trypsin inhibitors present in seed of different grain legume species and cultivar. *Food Chemistry*, 107(1), 68-74.

Habiba, R. A. (2002). Changes in anti-nutrients, protein solubility, digestibility, and HCl-extractability of ash and phosphorus in vegetable peas as affected by cooking methods. *Food Chemistry*, 77(2), 187-192.

Håkansson, I., & Lipiec, J. (2000). A review of the usefulness of relative bulk density values in studies of soil structure and compaction. *Soil and Tillage Research*, 53(2), 71-85.

Hamerstrand, G. E., Black, L. T., & Glover, J. D. (1981). Trypsin inhibitors in soy products: modification of the standard analytical procedure. *Cereal Chemistry*, 58(1), 42-5.

Hanspal, J. S., Bushell, G. R., & Ghosh, P. (1983). Detection of protease inhibitors using substrate-containing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 132(2), 288-293.

Hartman, G. L., West, E. D., & Herman, T. K. (2011). Crops that feed the world 2. Soybean—worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. *Food Security*, 3(1), 5-17.

Herkelman, K. L., Cromwell, G. L., & Stahly, T. S. (1991). Effects of heating time and sodium metabisulfite on the nutritional value of full-fat soybeans for chicks. *Journal of Animal Science*, 69(11), 4477-4486.

Hermanson, G.T. (2017). The reactions of bioconjugation. In G.T. Hermanson (Eds.), *Bioconjugate Techniques* (pp. 229-258). San Diego, Ca: Academic Press.

Hernández-Nistal, J., Martín, I., Jiménez, T., Dopico, B., & Labrador, E. (2009). Two cell wall Kunitz trypsin inhibitors in chickpea during seed germination and seedling growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(3), 181-187.

Hervera, M., Baucells, M.D., González, G., Pérez, E., & Castrillo, C. (2009). Prediction of digestible protein content of dry extruded dog foods: comparison of methods. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 93, 366-372.

Hoffman, J.R. & Falvo, M.J. (2004). Protein-Which is best?. *Journal of Sports Science and Medicine*, 3(3), 118-130

Hofland, G. W., de Rijke, A., Thiering, R., van der Wielen, L. A., & Witkamp, G. J. (2000). Isoelectric precipitation of soybean protein using carbon dioxide as a volatile acid. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 743(1), 357-368.

Horisberger, M., & Tacchini-Vonlanthen, M. (1983). Ultrastructural localization of Kunitz inhibitor on thin sections of *Glycine max* (soybean) cv. Maple Arrow by the gold method. *Histochemical and Cell Biology*, 77(1), 37-50.

Hsu, H.W., Vavak, D.L., Satterlee, L.D., & Miller, G.A. (1977). A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Science*, 42(5), 1269-1273.

Huang, J., Schols, H. A., van Soest, J. J., Jin, Z., Sulmann, E., & Voragen, A. G. (2007). Physicochemical properties and amylopectin chain profiles of cowpea, chickpea and yellow pea starches. *Food Chemistry*, 101(4), 1338-1345.

Hutton, C. W., & Campbell, A. M. (1977). Functional properties of a soy concentrate and a soy isolate in simple systems. *Journal of Food Science*, 42(2), 454-456.

Ito, M., Yamaoka, K., Masuda, H., Kawahata, H., & Gupta, L. P. (2009). Thermal stability of amino acids in biogenic sediments and aqueous solutions at seafloor hydrothermal temperatures. *Geochemical Journal*, 43(5), 331-341

Jackson, M., & Mantsch, H. H. (1995). The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(2), 95-120.

Jasti, L. S., Lavanya, K., & Fadnavis, N. W. (2015). Adsorption induced denaturation: application to denaturation of soybean trypsin inhibitor (SBTI) and lipoxigenase (LOX) in soymilk. *Biotechnology Letters*, 37(1), 147-151.

Bibliografía

Ju, Z. Y., Hettiarachchy, N. S., & Rath, N. (2001). Extraction, denaturation and hydrophobic properties of rice flour proteins. *Journal of food science*, 66(2), 229-232.

Jukanti, A. K., Gaur, P. M., Gowda, C. L. L., & Chibbar, R. N. (2012). Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. *British Journal of Nutrition*, 108(S1), S11-S26

Kakade, M.L., Rackis, J.J., McGhee, J.E., & Puski, G. (1974). Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry* 51(3),376-382.

Kakade, M.L., Simons, N., & Liener IE. (1969). Evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. *Cereal chemistry*, 65(5), 518-526.

Kansal, R., Kumar, M., Kuhar, K., Gupta, R. N., Subrahmanyam, B., Koundal, K. R., & Gupta, V. K. (2008). Purification and characterization of trypsin inhibitor from *Cicer arietinum* L. and its efficacy against *Helicoverpa armigera*. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 20(4), 313-322.

Kapchie, V. N., Towa, L. T., Hauck, C. C., & Murphy, P. A. (2012). Recovery and functional properties of soy storage proteins from lab-and pilot-plant scale oleosome production. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(5), 947-956.

Karaca, A. C., Low, N., & Nickerson, M. (2011). Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International*, 44(9), 2742-2750.

Kaur, M., & Singh, N. (2005). Studies on functional, thermal and pasting properties of flours from different chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 91(3), 403-411.

Kim, S. Y., Park, P. S., & Rhee, K. C. (1990). Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 651-656.

Klomkiao, S., Benjakul, S., Kishimura, H., Osako, K., & Tanaka, M. (2010). A heat-stable trypsin inhibitor in adzuki bean (*Vigna angularis*): effect of extraction media, purification and biochemical characteristics. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(1), 163-169.

Kuaye, A. Y. (1994). An ultraviolet spectrophotometric method to determine milk protein content in alkaline medium. *Food Chemistry*, 49(2), 207-211.

Kumar, V., & Gowda, L. R. (2013). The contribution of two disulfide bonds in the trypsin-binding domain of horsegram (*Dolichos biflorus*) Bowman-Birk inhibitor to thermal stability and functionality. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 537(1), 49-61.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.

Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2002). Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6592-6598.

Le, Q. T., & Katunuma, N. (2004). Detection of protease inhibitors by a reverse zymography method, performed in a tris (hydroxymethyl) aminomethane–Tricine buffer system. *Analytical Biochemistry*, 324(2), 237-240.

Lee, K. H., Ryu, H. S., & Rhee, K. C. (2003). Protein solubility characteristics of commercial soy protein products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(1), 85-90.

Lehmann, K., Schweimer, K., Reese, G., Randow, S., Suhr, M., Becker, W. M. & Rösch, P. (2006). Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions. *Biochemical Journal*, 395(3), 463-472.

Liener, I.E., & Thompson, R.M. (1980). In vitro and in vivo studies on the digestibility of the major storage protein of the navy bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Foods for Human Nutrition* 30(1),13-25.

Liu, Y. Y., Zeng, X. A., Deng, Z., Yu, S. J., & Yamasaki, S. (2011). Effect of pulsed electric field on the secondary structure and thermal properties of soy protein isolate. *European Food Research and Technology*, 233(5), 841.

Lubran, M. M. (1978). The measurement of total serum proteins by the Biuret method. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 8(2), 106-110.

Ma, Z., Boye, J. I., Simpson, B. K., Prasher, S. O., Monpetit, D., & Malcolmson, L. (2011). Thermal processing effects on the functional properties and microstructure of lentil, chickpea, and pea flours. *Food Research International*, 44(8), 2534-2544.

Maa, Y. F., Costantino, H. R., Nguyen, P. A., & Hsu, C. C. (1997). The effect of operating and formulation variables on the morphology of spray-dried protein particles. *Pharmaceutical Development and Technology*, 2(3), 213-223.

Macedo, M. L. R., Garcia, V. A., Maria das Graças, M. F., & Richardson, M. (2007). Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. *Phytochemistry*, 68(8), 1104-1111.

Machado, F.P.P., Queiróz, J.H., Oliveira, M.G.A., Piovesan, N.D., Peluzio, M.C.G., Costa, N.M.B., & Moreira, M.A. (2008). Effects of heating on protein quality of soybean flour devoid of Kunitz inhibitor and lectin. *Food Chemistry*, 107(2), 649-655.

Mashayekh, M., Mahmoodi, M. R., & Entezari, M. H. (2008). Effect of fortification of defatted soy flour on sensory and rheological properties of wheat bread. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(9), 1693-1698.

Mata-Martínez, E. (2013). Dicroísmo circular. Consultado el 4 de septiembre de 2017, de UNAM Sitio web: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/dicroismocircular2013.pdf>

Meena, R.S., Yadav, R.S., Meena, H., Kumar, S., Meena, Y.K. & Pradesh, U. Towards the current need to enhance legume productivity and soil sustainability worldwide: a book review. *Journal of Cleaner Production*, (104), 513-515

Bibliografía

Melo-Santa, G. (2012). Drying of Soy Proteins: Optimize solubility by control of the drying conditions and the use of additives. Tesis de Maestría en Ingeniería Biológica. Universidad Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal. Disponible en:

<https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/downloadFile/395144244074/Master%20thesis%20-%20Gon>

Meng, G. T., Ching, K. M., & Ma, C. Y. (2002). Thermal aggregation of globulin from an indigenous Chinese legume, *Phaseolus angularis* (red bean). *Food Chemistry*, 79(1), 93-103.

Militello, V., Vetri, V., & Leone, M. (2003). Conformational changes involved in thermal aggregation processes of bovine serum albumin. *Biophysical Chemistry*, 105(1), 133-141.

Miller, M.T. (2014). Visualization and Enhancement: Biological Evidence. In M.T. Miller (Eds.), *Crime Scene Investigation Laboratory Manual* (pp.103-115). San Diego, Ca: Academic Press

Mohamed, T. K., Zhu, K., Issoufou, A., Fatmata, T., & Zhou, H. (2009). Functionality, *in vitro* digestibility and physicochemical properties of two varieties of defatted foxtail millet protein concentrates. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(12), 5224-5238.

Mordor Intelligence (2017). Global plant protein market- by product type, application and geography- market shares forecast and trends (2018-2023). Consultado el 10 de octubre de 2017, en: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/plant-protein-market>

Mondor, M., Aksay, S., Drolet, H., Roufik, S., Farnworth, E., & Boye, J. I. (2009). Influence of processing on composition and antinutritional factors of chickpea protein concentrates produced by isoelectric precipitation and ultrafiltration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(3), 342-347.

Mubarak, A. E. (2005). Nutritional composition and antinutritional factors of mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes. *Food Chemistry*, 89(4), 489-495.

Mumba, P. P., Chilera, F., & Alinafe, G. (2004). The effect of the length of soaking time on trypsin inhibitor, crude protein and phosphorus contents of soybeans (*Glycine max*). *International Journal of Consumer Studies*, 28(1), 49-54.

Murayama, K., & Tomida, M. (2004). Heat-induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 43(36), 11526-11532.

Mwasaru, M. A., Muhammad, K., Bakar, J., & Man, Y. B. C. (1999). Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. I. Physicochemical properties. *Food Chemistry*, 67(4), 435-443.

National Oceanic and Atmospheric Administration US. (1999). Sodium bisulfite. Consultado el 4 de septiembre de 2017, de National Oceanic and Atmospheric Administration US Sitio web: <https://cameochemicals.noaa.gov/chris/SBS.pdf>

Nelson, C. D., & Glatz, C. E. (1985). Primary particle formation in protein precipitation. *Biotechnology and Bioengineering*, 27(10), 1434-1444.

Neuhoff, V., Stamm, R., & Eibl, H. (1985). Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. *Electrophoresis*, 6(9), 427-448.

Nishino, N., Uchida, S., & Ohshima, M. (1995). Formation of lysinoalanine following alkaline processing of soya bean meal in relation to the degradability of protein in the rumen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 68(1), 59-64.

O'Brien, E. P., Brooks, B. R., & Thirumalai, D. (2011). Effects of pH on proteins: predictions for ensemble and single-molecule pulling experiments. *Journal of the American Chemical Society*, 134(2), 979-987.

Ochoa-Rivas, A., Nava-Valdez, Y., Serna-Saldívar, S. O., & Chuck-Hernández, C. (2017). Microwave and ultrasound to enhance protein extraction from peanut flour under alkaline conditions: Effects in yield and functional properties of protein isolates. *Food and Bioprocess Technology*, 10(3), 543-555.

Okezie, B. O., & Bello, A. B. (1988). Physicochemical and functional properties of winged bean flour and isolate compared with soy isolate. *Journal of Food Science*, 53(2), 450-454.

Osborne, T.B. (1907). The proteins of the wheat kernel. Publication of the Carnegie Institution, Washington, Washington, D.C.

Osman, M. A. (2007). Effect of different processing methods, on nutrient composition, antinutritional factors, and in vitro protein digestibility of *Dolichos lablab* bean [*Lablab purpureus* (L) Sweet]. *Pakistan Journal of Nutrition*, 6(4), 299-303.

Parris, N., Anema, S. G., Singh, H., & Creamer, L. K. (1993). Aggregation of whey proteins in heated sweet whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(3), 460-464.

Patras, A., Oomah, B.D., & Gallagher E. (2011). By-product utilization. In: Tiwari, BK, Gowen A, McKeena B, editors. Pulse foods. First ed. United Kingdom: Elsevier. P 325-362.

Perez-gago, M. B., & Krochta, J. M. (2001). Denaturation time and temperature effects on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films. *Journal of Food Science*, 66(5), 705-710.

Petrucelli, S., & Anon, M. C. (1995). Soy protein isolate components and their interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(7), 1762-1767.

Pichare, M. M., & Kachole, M. S. (1994). Detection of electrophoretically separated protease inhibitors using X-ray film. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 28(3), 215-224.

Prinn, K. B., Costantino, H. R., & Tracy, M. (2002). Statistical modeling of protein spray drying at the lab scale. *Aaps Pharmscitech*, 3(1), 32-39.

Pullela, P. K., Chiku, T., Carvan, M. J., & Sem, D. S. (2006). Fluorescence-based detection of thiols *in vitro* and *in vivo* using dithiol probes. *Analytical Biochemistry*, 352(2), 265-273.

Qiu, J., Khalloufi, S., Martynenko, A., Van Dalen, G., Schutyser, M., & Almeida-Rivera, C. (2015). Porosity, bulk density, and volume reduction during drying: review of measurement methods and coefficient determinations. *Drying Technology*, 33(14), 1681-1699.

Rao, K.N., & Suresh, C.G. 2007. Bowman–Birk protease inhibitor from the seeds of *Vigna unguiculata* forms a highly stable dimeric structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1774(10):1264-1273.

Rech, S. S., Heidt, S., & Requena, N. (2013). A tandem Kunitz protease inhibitor (KPI106)–serine carboxypeptidase (SCP1) controls mycorrhiza establishment and arbuscule development in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, 75(5), 711-725.

Rehman, Z. U., & Shah, W. H. (2005). Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. *Food Chemistry*, 91(2), 327-331.

SAGARPA. (2016). 4^{to} informe de labores. Consultado el 10 de octubre de 2017, de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/254118/CuartoInformeDeLabores_SAGARPA.pdf

Sasse, J., & Gallagher, S. R. (2009). Staining proteins in gels. *Current Protocols in Molecular Biology*, 10-6.

Sathe, S. K., Lilley, G. G., Mason, A. C., & Weaver, C. M. (1987). High-resolution sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of soybean (*Glycine max* L.) seed proteins. *Cereal Chemistry*, 64(6), 380-384.

Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols*, 1(1), 16.

Schmid, M., Prinz, T. K., Stäbler, A., & Sänglerlaub, S. (2016). Effect of sodium sulfite, sodium dodecyl sulfate, and urea on the molecular interactions and properties of whey protein isolate-based films. *Frontiers in Chemistry*, 4, 49.

Schwert, G. W., & Takenaka, Y. (1955). A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 16, 570-575.

Seemüller, U., Meier, M., Ohlsson, K., Müller, H.P. & Fritz, H. (1977) Isolation and characterization of a low molecular weight inhibitor (of chymotrypsin and human granulocytic elastase and cathepsin G) from leeches, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358, 1105-1117.

Sekhon, H., & Singh, G. (2007). Irrigation Management in Chickpea. In: S, Yadav, R. Redden, W. Chen & B. Sharma, ed., 1st ed. United Kingdom, pp 246-268.

Sessa, D. J., Baker, E. C., & Friedrich, J. P. (1988). Inactivation of trypsin inhibitors in whole and cracked soybeans with sodium metabisulfite. *Lebensm.-Wiss. Technol*, 21, 163-168.

Shah R.B., Tawakkul, M.A., Khan, M.A. (2008). Comparative evaluation of flow for pharmaceutical powders and granules. *AAPS PharmSciTech*, 9(1), 250-258.

Shen, S., Sudol, E. D., & El-Aasser, M. S. (1993). Control of particle size in dispersion polymerization of methyl methacrylate. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 31(6), 1393-1402.

Bibliografía

Shi, L., Mu, K., Arntfield, S. D., & Nickerson, M. T. (2017). Changes in levels of enzyme inhibitors during soaking and cooking for pulses available in Canada. *Journal of Food Science and Technology*, 54(4), 1014-1022.

Shimelis, E. A., & Rakshit, S. K. (2007). Effect of processing on antinutrients and in vitro protein digestibility of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in East Africa. *Food Chemistry*, 103(1), 161-172.

Sigma-Aldrich. (2017). Sodium metabisulfite. Consultado 4 de septiembre de 2017, de SIGMA-ALDRICH Sitio web: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigald/31448?lang=es&ion=MX>

Singh, D. K., Rao, A. S., Singh, R., & Jambunathan, R. (1988). Amino acid composition of storage proteins of a promising chickpea (*Cicer arietinum* L) cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 43(4), 373-379.

Singh, P., Kumar, R., Sabapathy, S. N., & Bawa, A. S. (2008). Functional and edible uses of soy protein products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(1), 14-28.

Singh, P. K., Shrivastava, N., Chaturvedi, K., Sharma, B., & Bhagyawant, S. S. (2016). Characterization of seed storage proteins from chickpea using 2D electrophoresis coupled with mass spectrometry. *Biochemistry Research International*, 2016, 1-6.

Singh, R. R., & Rao, A. A. (2002). Reductive unfolding and oxidative refolding of a Bowman-Birk inhibitor from horsegram seeds (*Dolichos biflorus*): evidence for 'hyperreactive' disulfide bonds and rate-limiting nature of disulfide isomerization in folding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1597(2), 280-291.

Singh, U., & Jambunathan, R. (1981). Studies on desi and kabull chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars: levels of protease inhibitors, levels of polyphenolic compounds and in vitro protein digestibility. *Journal of Food Science*, 46(5), 1364-1367.

SNIMM. (2017). Precios del día de hoy. bovino. Consultado el 1 de octubre de 2017, de: SNIMM. (2017). Precios del día de hoy. bovino. Consultado el 1 de octubre de 2017, de: <http://www.economia-sniim.gob.mx/2010prueba/PecCor.asp>

SNIIM. (2017). Precios del día de hoy. Garbanzo. Consultado el 1 de octubre de 2017, de: <http://www.economia-sniim.gob.mx/2010prueba/PreciosHoy.asp?prodC=19600>

SNIIM. (2017). Precios del día de hoy. Pavo. Consultado el 1 de octubre de 2017, de: <http://www.secofi-sniim.gob.mx/2010prueba/ExtPavo.asp?prod=T&dest=100&ori=T&dqdia=2&dqmes=1&dqanio=2013>

SNIMM. (2017). Precios del día de hoy. Pollo. Consultado el 1 de octubre de 2017, de: <http://www.economia-sniim.gob.mx/2010prueba/PolloEnt.asp>

SNIMM. (2017). Precios del día de hoy. Porcinos. Consultado el 1 de octubre de 2017, de: <http://www.economia-sniim.gob.mx/2010prueba/PecPie.asp?var=Por>

SNIMM. (2017). Precios del día de hoy. Soya. Consultado el 1 de octubre de 2017, de: <http://www.economiasniim.gob.mx/2010prueba/IngredientesMes.asp?Cons=D&prod=811&ori=T&dqMesMes=9&dqAnioMes=2017&Formato=Nor&submit=Ver+Consulta>

Soetan, K. O., & Oyewole, O. E. (2009). The need for adequate processing to reduce the anti-nutritional factors in plants used as human foods and animal feeds: A review. *African Journal of Food Science*, 3(9), 223-232.

Song, H. K., & Suh, S. W. (1998). Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator. *Journal of Molecular Biology*, 275(2), 347-363.

Sorgentini, D. A., Wagner, J. R., & Anón, M. C. (1995). Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function relationship of soluble and insoluble fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(9), 2471-2479.

Sotelo, A., Flores, F., & Hernández, M. (1987). Chemical composition and nutritional value of Mexican varieties of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 37(4), 299-306.

Sreerama, Y. N., Neelam, D. A., Sashikala, V. B., & Pratape, V. M. (2010). Distribution of nutrients and antinutrients in milled fractions of chickpea and horse gram: seed coat phenolics and their distinct modes of enzyme inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4322-4330.

Sreerama, Y. N., Sashikala, V. B., & Pratape, V. M. (2009). Expansion properties and ultrastructure of legumes: Effect of chemical and enzyme pre-treatments. *LWT-Food Science and Technology*, 42(1), 44-49.

Sreerama, Y. N., Sashikala, V. B., Pratape, V. M., & Singh, V. (2012). Nutrients and antinutrients in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their flour functionality. *Food Chemistry*, 131(2), 462-468.

Sultana, Z., Ahmed, S., Iqbal, S., & Chisty, A. H. (2010). Determination of *in vitro* protein digestability of different feed ingredients for Nilotica (*Oreochromis nilotica*). *Bangladesh Research Publications Journal*, 87-94.

Susantikarn, P., & Donlao, N. (2016). Optimization of green tea extracts spray drying as affected by temperature and maltodextrin content. *International Food Research Journal*, 23, 1327-1331.

Syamaladevi, R. M., Tadapaneni, R. K., Xu, J., Villa-Rojas, R., Tang, J., Carter, B., ... & Marks, B. (2016). Water activity change at elevated temperatures and thermal resistance of Salmonella in all purpose wheat flour and peanut butter. *Food Research International*, 81, 163-170.

Taira, Harue. (1973). Heat destruction of amino acids in soybean products. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 7(4), 267-273.

Tang, C. H. (2008). Thermal denaturation and gelation of vicilin-rich protein isolates from three Phaseolus legumes: A comparative study. *LWT-Food Science and Technology*, 41(8), 1380-1388.

Tetenbaum, J., & Miller, L. M. (2001). A new spectroscopic approach to examining the role of disulfide bonds in the structure and unfolding of soybean trypsin inhibitor. *Biochemistry*, 40(40), 12215-12219.

Thermo Fisher Scientific. (2017). Reducing Agents for Protein Disulfides. Consultado: 4 de septiembre de 2017, de Thermo Fisher SCIENTIFIC Sitio web: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-labeling-crosslinking/protein-modification/reducing-agents-protein-disulfides.html>

Tidke, S.A., Ramakrishna, D., Kiran, S., Kosturkova, G., & Ravishankar, G.A. (2015). Nutraceutical potential of soybean: review. *Asian Journal of Clinical Nutrition*, 7, 22-32

Tontul, I., Topuz, A., Ozkan, C., & Karacan, M. (2016). Effect of vegetable proteins on physical characteristics of spray-dried tomato powders. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 22(6), 516-524.

Troller, J., & Christian, J.H.B. (1978). Water activity-basic concepts. In J.A. Troller & J.H.B Christian (Eds.), *Water activity and food* (pp 1-11). Primera edición. New York, NY, USA: Academic press.

Ulloa, J. A., Ibarra-Zavala, S. J., Ramírez-Salas, S. P., Rosas-Ulloa, P., Ramírez-Ramírez, J. C., & Ulloa-Rangel, B. E. (2015). Chemical, physicochemical, nutritional, microbiological, sensory and rehydration characteristics of instant whole beans (*Phaseolus vulgaris*). *Food Technology and Biotechnology*, 53(1), 48.

Vagadia, B. H., Vanga, S. K., & Raghavan, V. (2017). Inactivation methods of soybean trypsin inhibitor—A review. *Trends in Food Science & Technology*.

Valdebouze, P., Bergeron, E., Gaborit, T., & Delort-Laval, J. (1980). Content and distribution of trypsin inhibitors and hemagglutinins in some legume seeds. *Canadian Journal of Plant Science*, 60(2), 695-701.

Valdez-Anguiano, D.M., Herrera-Cabrera, E., Dávila-Ortiz, G., Oomah, B.D., Cardador-Martínez, A., & Jiménez-Marínez, C. (2015). Content and distribution of nutritional and non-nutritional compounds during germination of three Mexican faba bean (*Vicia faba*) varieties. *International Journal Research in Agricultural and Food Science*, 2(9), 1-14.

Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J., & Millán, F. (1999). Purification and partial characterization of chickpea 2S albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1405-1409.

Vishnoi, N., & Mohapatra, S. K. (2017). Study of Particle Size Distribution of Pulverized Coals in Utility Boilers. *Particulate Science and Technology*, (just-accepted).

Voss, R., Ermler, U., Essen, L.O., Wenzl, G., Kim, Y.M., & Flecker, P. (1996). Crystal structure of the bifunctional soybean Bowman-Birk inhibitor at 0.28-nm resolution. *European Journal of Biochemistry*, 242(1), 122-131.

Wang, X., Gao, W., Zhang, J., Zhang, H., Li, J., He, X., & Ma, H. (2010). Subunit, amino acid composition and in vitro digestibility of protein isolates from Chinese kabuli and desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food research international*, 43(2), 567-572.

Wang, Y. I., Schulze, J., Raymond, N., Tomita, T., Tam, K., Simon, S. I., & Passerini, A. G. (2011). Endothelial inflammation correlates with subject triglycerides and waist size after a high-fat meal. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 300(3), H784-H791.

Weder, J. K., & Sohns, S. (1983). Model studies on the heating of food proteins. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 176(6), 421-425.

Werner, M.H., & Wemmer, D.E. (1992). Three-dimensional structure of soybean trypsin/chymotrypsin Bowman-Birk inhibitor in solution. *Biochemistry*, 31(4), 999-1010.

Westfall, R. J., & Hauge, S. M. (1948). The nutritive quality and the trypsin inhibitor content of soybean flour heated at various temperatures. *Journal of Nutrition*, 36, 379-389.

WHO/FAO/UNU. (2011). Protein and amino acid requirements in human nutrition. Geneva, Switzerland: WHO press.

Wilcox, J.R. (2004). World distribution and trade of soybean. In H.R. Boerma & J.E. Specht (Eds), *Soybeans: improvement, production and uses* (pp 1-13). Wisconsin, USA: American Society of Agronomy, INC.

Withana-Gamage, T. S., Wanasundara, J. P., Pietrasik, Z., & Shand, P. J. (2011). Physicochemical, thermal and functional characterisation of protein isolates from Kabuli and Desi chickpea (*Cicer arietinum* L.): a comparative study with soy (*Glycine max*) and pea (*Pisum sativum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(6), 1022-1031.

Wolf, W. J. (1970). Soybean proteins. Their functional, chemical, and physical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18(6), 969-976.

Wu, G. (2013). Discovery and chemistry of amino acids. In G. Wu (Eds.), *Amino acids: biochemistry and nutrition* (pp. 1-32) Boca Ratón, FL: CRC Press

Yalcin, S., & Basman, A. (2015). Effects of infrared treatment on urease, trypsin inhibitor and lipoxygenase activities of soybean samples. *Food chemistry*, 169, 203-210.

Zarkadas, C. G., Gagnon, C., Gleddie, S., Khanizadeh, S., Cober, E. R., & Guillemette, R. J. (2007). Assessment of the protein quality of fourteen soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars using amino acid analysis and two-dimensional electrophoresis. *Food Research International*, 40(1), 129-146.

Zayas, J.F. (1997). Solubility of proteins. En J.F. Zayas (Ed.), *Functionality of proteins in food*, pp 6-75. New York, US: Springer Publishing.

Zhang, L., & Sun, X. S. (2008). Effect of sodium bisulfite on properties of soybean glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23), 11192-11197.

Apéndice A

Tabla 0.1. Abreviatura de unidades.

Unidad	Descripción
%	Porcentaje
°C	Grado centígrado
µg	Microgramo
mg	Miligramo
g	Gramo
kg	Kilogramo
µL	Microlitro
mL	Mililitro
L	Litro
MPa	Megapascal
pH	Potencial de hidrógeno
Ton	Tonelada
mV	Milivolts
M	Molar
mM	Milimolar
Rpm	Revoluciones por minuto
Nm	nanómetros

Artículos y ponencias

Artículo de divulgación publicado en Énfasis Alimentación



El pan es considerado como un alimento básico en muchas poblaciones del mundo, principalmente en los continentes de Europa y América. Debido al alto consumo per cápita de este producto, la oportunidad de aumentar el volumen de ventas en esta área de la industria de alimentos es bastante pequeña, ya que es considerado un mercado saturado. Por ello, surge la necesidad de utilizar ingredientes innovadores.

Por: Sara Avilés Gaxiola, Ingeniera en Biotecnología por el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (Téc Monterrey), México

Se vuelve necesario el uso de ingredientes nuevos y diferentes a los más populares (harina de trigo, centeno, cebada y maíz) para la elaboración del pan. Los objetivos principales de estas nuevas formulaciones son ofrecerle al consumidor un producto con un mayor valor nutricional, libre de gluten, así como con diferentes sabores y texturas (Nachay, 2014). El gluten es un conjunto proteico presente en la mayoría de los cereales, al cual aproximadamente del 1 al 2% de la población global es intolerante. Este padecimiento es conocido como celiaquía. Con la introducción de nuevos ingredientes, será posible que el volumen de venta en la industria panificadora aumente en los próximos años debido a que la demanda del mercado mundial por productos que ofrecen beneficios adicionales a la salud va en aumento, tendencia observada desde hace dos décadas y que se prevé al alza.

SORGO: CEREAL DE POCO USO

Entre los ingredientes considerados como novedosos destaca el sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), originario de África y domesticado hace aproximadamente 5000 años. Ahora es el quinto cereal con mayor producción en el mundo, siendo México el tercer mayor productor con más de 7 millones de toneladas anuales.

A pesar de que el sorgo posee un menor contenido proteico (11%) que el de cereales como el trigo (14%) y no cuenta con un perfil nutricional excepcional, se considera la mejor alternativa al uso de cereales como trigo y maíz para la producción de pan libre de gluten (dado el parecido entre éste y los granos tradicionalmente utilizados en panificación). Para la producción de formulaciones que contengan harina de sorgo, es necesario la adición de ingredientes alternos con el fin de no sacrificar la

textura (generalmente gomas). Existen pocas marcas que usan este cereal ya posicionadas en el mercado, por lo que su aplicación representa una amplia oportunidad para marcas sólidas y para aquellas que recién inician.

PSEUDOCEREALES

Son plantas de hoja ancha que no pertenecen a la familia de los cereales, pero que reciben este nombre por sus usos y propiedades similares a las de éstos. Estos granos poseen ventajas como mayor contenido y mejor calidad proteica comparado con cereales, siendo incluso considerados "súper alimentos" (Álvarez-Jubete et al., 2010). Los pseudocereales que en los últimos años han comenzado a tener mayor uso en panificación son: el amaranto (*Amaranthus spp*), la quinoa (*Chenopodium quinoa*) y el alforfón (*Fagopyrum esculentum*), conocido popularmente



Nuestros ingredientes establecen el punto de referencia para la excelencia

¿Cuál es su primera opción cuando busca ingredientes inigualables y de calidad para su panadería y pastelería? Corbion.

Nuestros emulsionantes proveen la consistencia esencial para los sistemas de panadería y pastelería automatizados de alta velocidad. Nuestras enzimas prolongan la vida útil de sus productos durante todo el proceso de distribución, y nuestros concentrados y bases ofrecen mayor funcionalidad y conveniencia porque reducen la necesidad de comprar y almacenar otros productos.

Para obtener calidad y consistencia, desde la producción hasta la compra, y más allá, confíe en los expertos de Corbion.

Para mayores informaciones viste: www.corbion.com

✉ Corbion Mexico
jose.morales@corbion.com

✉ Corbion Argentina
laura.artusi@corbion.com

Corbion
Keep creating

Informe Especial

como trigo sarraceno. La mayor área de oportunidad al utilizar pseudocereales en pan es aplicarlos como grano entero en las formulaciones para, de esta manera, aportar al producto final aproximadamente la misma composición de nutrimentos que se encuentran en la semilla del grano original y, al igual que con el sorgo, se busca desarrollar pan libre de gluten con un perfil nutricional balanceado. Con el fin de no sacrificar las propiedades sensoriales del producto final, se mezcla la harina de pseudocereales con harina de los cereales más populares en diferentes proporciones.

● QUÍNOA

Está ganando popularidad a nivel mundial pudiéndose encontrar este producto en supermercados y tiendas naturistas. Este pseudocereal contiene alrededor del 12.7% de proteína rica en aminoácidos esenciales y un alto contenido de fibra dietética comparado con la mayoría de los cereales. Además, posee micronutrientes como calcio y ácido fólico. Por lo anterior, se considera que la com-

posición de la quinoa la coloca como ingrediente potencial en panificación para productos dirigidos a ancianos y niños. Las marcas actuales ofrecen productos diversos donde se usa el grano entero de quinoa con harina de trigo para mejorar la calidad nutricional del pan tradicional. También existen comercialmente mezclas de harina de arroz con harina de quinoa para la producción de pan libre de gluten, determinándose que 10% de la harina de quinoa mejora la calidad nutricional del pan sin comprometer el sabor (Rodríguez-Sandoval et al., 2012). La harina de quinoa ha encontrado diversos usos en general: masa para panqueques, corteza de pizza, galletas, bollos, entre otros.

● AMARANTO

Es originario de Centro y Sudamérica. Es considerado una buena fuente de proteína (hasta un 18.4%). Los productos a base de amaranto son excelente fuente de energía para atletas, debido a que contienen altas cantidades del aminoácido

esencial lisina, sin embargo no se recomienda para diabéticos, ya que posee un alto índice glicémico. El amaranto es utilizado entero o como harina principalmente para la producción de galletas, donde se ha determinado que el contenido óptimo de esta harina debe ser de un máximo de 25%, lo anterior con el fin de mantener el color, sabor y apariencia del producto final (Sindhuja et al., 2005).

● ALFORFÓN

A pesar de ser una buena fuente de proteína (aproximadamente 13%), vitaminas y minerales, el alforfón es considerado como un cultivo menor en el mundo. La proteína del alforfón tiene relativamente baja digestibilidad, sin embargo se ha encontrado que el consumo de este pseudocereal trae beneficios a la salud como reducción de colesterol, obesidad y cálculos biliares, y dado su alto contenido fenólico se propone como un alimento funcional. Es también considerado como prebiótico, pues promueve el crecimiento de bacterias prebióticas en el intestino. Diversas panaderías ar-

tesanales alrededor del mundo utilizan harina de alforfón para la producción de pan libre de gluten por los beneficios anteriormente mencionados. Este pseudocereal, a diferencia de los ya expuestos, se puede utilizar sin necesidad de combinarlo con la harina de otros cereales, esto sin sacrificar textura ni sabor, únicamente color (Dixon et al., 2012). Los consumidores describen como almendrado el sabor de los diferentes productos a base de este pseudocereal, principalmente pan de barra y galletas.

OTROS

Además de cereales de poco uso y pseudocereales, existen otros ingredientes de poco y reciente uso en panificación, por ejemplo la semilla de chía (*Salvia hispánica* L.). Esta semilla (originaria del centro y sur de México, Guatemala y Nicaragua), es considerada una oleaginosa debido a su alto contenido de materia grasa y a pesar de caer en el olvido durante siglos, ha hecho su debut

en esta área de la industria, ya que es la fuente vegetal con mayor contenido del ácido graso esencial omega-3, al cual se le ha atribuido la capacidad de reducir notablemente la incidencia de enfermedades cardiovasculares y sobrepeso.

Las legumbres, en general, son también ingredientes interesantes para aplicarse en panificación. La principal ventaja de éstas sobre los granos ya mencionados, es que contienen en promedio el doble de proteína. La legumbre más utilizada alrededor del mundo es la soya (*Glycine max*), la cual contiene un 36% de proteína y ha sido utilizada para la producción de pan, llegando a sustituir en hasta 6.3% la harina de trigo en distintas formulaciones, mejorando la calidad nutricional del producto final (Lazo-Vélez et al., 2015). ●

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Álvarez-Jubete, L., Arendt, E.K. & Gallagher, E. (2010). Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Food Science & Technology*, 21,106-113
2. Dixon, C., Ballard, K. & Rawley, C. (2012). The effect of buckwheat flour on the taste and texture of pumpkin bread. Manuscrito no publicado, Universidad de Purdue, West Lafayette, Estados Unidos de América.
3. Föste, M., Nordlohne, S.D., Elgeti, D., Linden, M., Heinz, V., Jekle, M. & Becker, T. Impact of quinoa bran on gluten-free dough and bread characteristics. *European Food Research and Technology*, 239(5),767-775
4. Lazo-Vélez, M.A., Chuck-Hernandez, C. & Serna-Saldivar, S.O. (2015). Evaluation of the functionality of five different soybean proteins in yeast-leavened pan breads. *Journal of Cereal Science*, 64,63-60
5. Nachay, k. (2014). Bakery Bonanza. *Food Technology*, 10,(14),47-62
6. Sindhuja, A., Sudha, M.L. & Rahim, A. (2005). Effect of incorporation of amaranth flour on the quality of cookies. *European Food Research and Technology*, 221,597-601
7. Rodríguez-Sandoval, E., Sandoval, G. & Cortes-Rodríguez, M. (2012). Effect of quinoa and potato flours on the thermomechanical and breadmaking properties of wheat flour. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 29(3), 503-510

Artículo de revisión aceptado para publicación en Journal of Food Science

Journal of Food Science

Inactivation methods of trypsin inhibitor in legumes: a review.Sara Avilés-Gaxiola¹; Cristina Chuck-Hernández^{1*}; Sergio O. Serna Saldívar¹¹ Center of Biotechnology FEMSA, School of Engineering and Sciences, Tecnológico de Monterrey, Campus Monterrey. Av. Eugenio Garza Sada 2501, 64849 Monterrey, N.L, Mexico.*Corresponding author (e-mail: crisrina.chuck@itesm.mx)**Word count:** 9966**Running head:** Inactivation of trypsin inhibitor**ABSTRACT**

Seed legumes have played a major role as a crop worldwide, being cultivated on about 12-15% of Earth's arable land; nevertheless, their use is limited by, among other things, the presence of several anti-nutritional factors (ANFs - naturally occurring metabolites that the plant produces to protect itself from pest attacks.) Trypsin inhibitors (TIs) are one of the most relevant ANFs because they reduce digestion and absorption of dietary proteins. Several methods have been developed in order to inactivate TIs, and of these, thermal treatments are the most commonly used. They cause loss of nutrients, affect functional properties, and require high amounts of energy. Given the above, new processes have emerged to improve the nutritional quality of legumes while trying to solve the problems caused by the use of thermal treatments. This review examines and discusses the methods developed by researchers to inactivate TI present in legumes and their effects over nutritional and functional properties.

Keywords: Trypsin inhibitor; physical processes; chemical processes; biological treatments; physicochemical properties.

Introduction

Legumes belong to the family of Leguminosae or Fabaceae and are considered after cereals the most important crops worldwide. They are grown on about 180 million hectares, equivalent to 12-15% of Earth's arable land (Meena and others 2015) and have been part of the basic human diet since 7000 B.C., mainly in developing countries. The most consumed legumes are common beans (*Phaseolus vulgaris*), chickpeas (*Cicer arietinum*), lentils (*Lens culinaris*, *L. esculenta*), peas (*Pisum sativum*), broad beans (*Vicia faba*), peanuts (*Arachys hypogea*), and soybeans (*Glycine max*), the latter being the most produced worldwide and industrialized (Sánchez-Chino and others 2015). The importance of legume seeds, also called pulses, lies in their nutritional value, providing significant amounts of carbohydrates (30 to 40%), dietary fiber (from 8 to 27.5%), fat (from < 5 to 47%), and proteins (from 17 to 40%) with adequate amounts of essential amino acids such as lysine, leucine, and arginine (Iqbal and others 2006; Rebello and others 2014). Given their nutritional qualities, legume seeds have served as raw materials for the production and enrichment of some foods like breads and other bakery items, corn and wheat flour tortillas, snacks, yogurt, and others.

In spite of the aforementioned, the use of grain legumes as food sources is limited by the presence of several antinutritional factors (ANFs) which have proven deleterious effects on human health (Soetan and Oyewole 2009). ANFs are naturally occurring secondary metabolites that protect the plant against some biological stresses such as pest attacks. These metabolites include tannins, phytic acid, flatulence-causing oligosaccharides, and trypsin inhibitors (TIs), the latter being the ones causing the greatest concern (Khattab and Arntfield 2009).

TIs strongly inhibit the activity of key pancreatic enzymes trypsin and chymotrypsin thereby reducing digestion and absorption of dietary proteins by the formation of complexes that are indigestible even in the presence of high amounts of digestive enzymes (Gemede and Ratta 2014). In order to improve the nutritional quality of legumes, different food processes have been developed to inactivate or to diminish TIs below threshold limits. The thermal treatments have become the most used since they are capable of gradually diminishing trypsin inhibitor levels in a time-temperature dependent mode (Khattab and Arntfield 2009). However, because of their high cost and negative impact on both the environment and on the full protein functionality, alternative options have been developed. The present review compiles updated information about how processes applied to legume seeds affect the inactivation of TIs and functional and nutritional properties of foods.

Legumes trypsin inhibitors

Legumes TIs are classified in 2 families according to their molecular size: Kunitz (KTIs), with molecular weights around 20 kDa and Bowman-Birk (BBTIs) of approximately 8 kDa. There are legumes containing both, for example soybean, and there are others that only have one of them, for example common bean and lentil, where their TIs are part of the Bowman-Birk family. Table 1 comprises trypsin inhibitor activity (TIA) (U/mg) of different legumes seeds. Regarding to the structure of these protease inhibitors, KTIs, mostly studied for soybean, are constituted by 3 repeating subdomains, each one conformed by 4 consecutive β -strands interconnected by loops. Two disulfide bonds are found in KTI and although none of them is located at the active site, it is known that both play relevant tasks in the stabilization of the overall structure. On the other hand, BBTI arrangement has been determined for other legumes beside soybean such as cowpea, pea, lentil, lima bean, and mung bean. BBTIs are conformed by two different domains, one for trypsin and another one for chymotrypsin. Both domains are build up from two symmetry-related β -hairpin motif, each one with antiparallel β -strands and the overall structure contains 7 disulfide bonds. The location of these bridges varies according of the legume, for example in soybean, the active site contains one of them, but not in other cases like in cowpeas. All BBTIs disulfide bonds are known to be fundamental in maintaining the structure stability (Voss and others 1996; Rao and Suresh 2007). TIs are specific for legumes seeds and no activity has been detected in leaves, roots, stems or empty pods. The localization within the seed varies according to the legume type, for example, while for soy and faba beans TIA is concentrated mostly in the cotyledon (> 90%), for other legumes such as chickpea they are distributed in the three characteristic anatomical parts, cotyledon (77.2 to 75.8%), embryonic axis (11.9 to 15.5%), and seed coat (10.9 to 8.7%) (Sreerama and others 2010; Patras and others 2011; Valdez-Anguiano and others 2015). Regarding to cellular localization, proteinase inhibitors are found within protein bodies, cell walls, intercellular spaces and cytosol. Differences have also been found according to legume type: for mung bean its TIs are only localized in cytoplasm and not within protein bodies, while for soybean inhibitors (SBTI and KTI), besides the locations already mentioned, they are as well found in the nucleus (Chrispeels and Baumgartner 1978; Hernández-Nistal 2009).

Trypsin inhibitors analysis

Different methods to determine TIA before and after inactivation treatments have been developed being the most used the one devised by Kakade and others (1974). This method encompasses the process of TIs extraction as well as the subsequent analysis, and is preferred since it overcomes the underestimation of TIs generated by inactivation treatments, especially the ones

that involve protein denaturation. Regarding to the extraction process, they recommend to use 0.01 NaOH at pH from 8.4 to 10.0. For legume untreated and treated samples the extraction should last 1 and 3 h respectively, the above aiming to expose the amino acids residues of the still active trypsin inhibitors reactive sites, since they become inaccessible for the development of trypsin-trypsin inhibitor complex needed in the subsequent assay. The principle of this TIA assay is the use of N_α -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (BAPA), a chromogenic substrate that when in contact with active trypsin absorb at 410 nm. Other methods similar the one proposed by Kakade and others (1974) have been developed. For example, for some legumes like faba beans, Valdebouze and others (1980) proposed the addition of 1% polyvinylpyrrolidone during extraction to reduce possible interferences caused by tannins. All the methods report total activity of TIs and made no difference between KTIs or BBTIs.

Inactivation methods for trypsin inhibitor in legumes

Figure 1 graphically summarizes the classification of physical, chemical, and biological processes commonly applied to legume seeds.

Physical processes

Thermal treatments (including traditional methods)

Heat processing is widely accepted as the most effective way of improving the overall nutritional value of legume seeds because it improves protein digestibility mainly through the inactivation of thermo-labile ANFs, especially TIs. Thermal treatment promotes the breakage of intermolecular bonds responsible of holding the tertiary structure of TIs, which consequently causes changes over the active site conformation. Thermal treatments have also been used as the most popular methods for processing grain legumes in both traditional household and industry levels because improves palatability. Some of the methods included in thermal treatments are cooking, boiling, autoclaving, microwaving and roasting. Studies about the action of thermal treatments on TIs have been carried out since the early 20th century, when *in vitro* protein digestibility was shown to be lower in raw legume seeds compared with cooked counterparts. At that time, researchers found that this could be related to the presence of various factors found in raw legumes (Borchers and Ackerson 1947). One of the oldest studies regarding the use of heat over TIs of legumes dates back to 1948 (Westfall and Hauge), where it was reported that soybean TIs were thermosensitive, being totally inactivated at temperatures around 108 °C for time intervals that went from 15 to 30 min. From then onwards, there have been numerous publications regarding the use of heat in various types of legumes, and they have been very useful for determining the effectiveness of heat application over the activity of TIs.

In the case of soybeans all thermal treatments (boiling at 100 °C for about 9 min, roasting for 2 min, cooking for 7 to 30 min, microwaving for 3 min, and autoclaving at 121 °C for 15 min) inactivate most of the TIA. Even, these relatively short times can be significantly reduced when combining with other techniques, for example, it has been detected that the addition of 3 mM NaCl during boiling reduces 66% the time needed to decrease 74% of soymilk TIA. However, despite the effectiveness and speed of these processes, it has been observed that temperatures above 80 °C can damage some important nutrients, such as lysine, sulfur amino acids, and heat-labile vitamins (Egounlety and Aworth 2003; Barać and Stanojević 2005; Machado and others 2008; Chen and others 2014; Yang and others 2014). Baking is less effective than other thermal treatments, given that after 10, 15, or 20 min in an oven set at 100, 150, or 200 °C, the maximum inactivation of TIs in soybean flour was achieved at 200 °C for 20 min. This thermal treatment reduced 67.33% the amount of TIs. Besides, compared with the methods mentioned above, high temperatures are required for baking compared with other heat treatments. On the other hand, in the case of isoflavones, one of the most valued phytochemicals in soybean, heat treatments alter their content and profile. At such high temperatures (for example, 200 °C) there is a high conversion of malonylglycosides to acetylglycosides, β -glycosides and aglycones, the latter increasing 3.5-fold (Andrade and others 2016). The above may be of interest to the industry and medicine fields, since isoflavones absorption only occurs in aglycone forms (Yatsu and others 2016). Different thermal treatments have also been tested for TIs in other pulses such as peas and chickpeas, although results sometimes differ from one author to another. For example, it was reported that for pea seeds, microwaving (2450 MHz for 4 min), boiling (100 °C for 20 min), and pressure cooking (120 °C for 10 min) resulted in a total inactivation of TIs. As expected, these thermal treatments improved *in vitro* protein digestibility by 6.53, 6.28, and 2.72% respectively. Furthermore, a reduction of 25.7% in total tannin concentration was achieved by microwaving, which in turn improved the nutritional characteristics of peas, since tannins are also considered antinutritional factors. These ANFs are classified in two main groups: hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) and proanthocyanidins (condensed tannins), being the latter the most common type associated to legumes. While the first ones are mostly related to toxicity in ruminants, condensed ones are known to diminish protein digestibility by binding dietary proteins and the active sites of human digestive enzymes (Borse and others 2016). Also, it was found that heat processes reduced the solubility of the protein isolated from the treated seeds by 50% (ordinary and pressure cooking), while microwaving only reduced it by 25% (Habiba 2002). The above observations differ from those reported for yellow peas by Ma and others (2011) where a

reduction of only 37.8% of total TIA was observed when boiling at 90 °C during 20 min. The differences between the two 2 studies were: 1) the pea varieties and 2) the higher temperature (10 °C more) applied by Habiba (2002). This suggests that, either the effect of heat treatments can vary from one variety to another of the same legume seed, or that the temperature difference enhanced the full TIs inactivation. It is thus recommended to evaluate the various time-temperature conditions in different varieties of this legume and, if possible, to further determine TI structural or molecular variations. Also, based on the information mentioned above, microwaving represents a rapid and adequate heat treatment option for fully deactivating TIs especially when solubility is crucial (for example, a pea protein isolate intended for beverages). On the other hand, interesting information has been reported regarding the time needed to significantly inactivate TIs associated to chickpeas. This particular seed is one of the oldest and most widely consumed pulses worldwide, mostly in tropical and subtropical regions. It has been established that to achieve inactivation of TIs higher than 80%, longer times are needed compared to other legumes already mentioned. Chickpeas needed 81 more min of boiling (90 min in total) and 20 more min of autoclaving (35 min in total) than soybeans, and also 11 more min of microwaving compared with peas (15 min in total) (Alajaji and El-Adawy 2006). The higher energy expenditure would represent an important cost, so it would be convenient to use methods that do not involve heating in the particular case of chickpeas. Based on that report, it is inferred that the TIs of this legume seed are more heat-resistant, and that the excessive nutrient loss reported (up to 95.67% of vitamins like riboflavin, niacin, thiamin, and pyridoxine) is due to the prolonged time of heat application. Furthermore, it is also reported that ANFs such as hemagglutinin, tannins, phytic acid, and flatulence-causing oligosaccharides are considerably reduced by long processing times (Singh 1988).

The procedures mentioned above have also been evaluated in mung beans, a legume seed widely consumed in Egypt, since there is concern regarding significant losses of soluble solids, vitamins, and minerals during home cooking. Microwaving at 2450 MHz, boiling for 90 min or autoclaving for 35 min reduced all the trypsin inhibitor activity; however, these methods enhanced losses of sulfur-containing amino acids and other essential amino acids such as lysine and tryptophan (Mubarak 2005). Nevertheless, although the TI was isolated and characterized as an 11 to 12 kDa protein in 1978 (Chrispeels and Baumgartner), only one report tested the effects of thermal treatments so no comparison could be made. According to the information published for mung beans, autoclaving or pressure-cooking represents the best option for home cooking, since this method preserves the highest amount of minerals in the seed. Other advantages of

autoclaving are: the total reduction or inactivation of hemagglutinins and the significant reduction of total tannins and phytic acid (62.1 and 26% respectively). Although the TI in this bean appears to be heat sensitive, a heat-stable BBTI of 14 kDa was recently identified for adzuki beans (*Vigna angularis*), also known as red mung bean, and also for horse gram (*Dolichos biflorus*). TIs of these cultivars remain active even when being exposed to 90 °C for 60 min. For the case of adzuki beans, the TI was inactivated by using β -mercaptoethanol prior to electrophoresis (Klomklao and others 2010; Kumar and Gowda 2013) so it would be of interest to study the application of higher temperatures during different times to determine the conditions at which these molecules remain active. This strategy would require the use of large amounts of energy so for the case of heat stable TIs, other treatments should be developed. For example, chemical approaches via the use of food grade reducing agents since these compounds seem to be effective for the inactivation of TI's of adzuki beans. Among the reducing agents most used as food additives are L-cysteine hydrochloride, L-ascorbic acid, and sodium sulfites. However, the use of these compounds for this particular purpose is limited to what is mentioned later in this review, so their study becomes of great importance for future research.

In addition to boiling and pressure-cooking, another reported thermal process is roasting. Roasting is mainly applied to process most peanut products, such as shelled peanuts, Japanese style peanuts, and peanut butter. This treatment has been applied as roasting-salting and oil-salting and proven to be highly effective, since roasting at 180 °C for 20 min achieves a TI inactivation of 90 and 88%, respectively. Lower roasting temperatures have also been tested, but have been proven less effective. For example, roasting at 140 °C inactivates only 73% of the TI's, suggesting that roasting times should be prolonged. Lentils, on the other hand, require only 1 min roasting at 80 °C to reduce up to 95.6% its TIs activity. Regarding other ANFs, all roasting treatments significantly reduce total tannins and phytic acid (Embaby 2010a; Ma and other 2011). Thus, roasting proved to be an effective treatment for TI inactivation of peanuts and lentils. Oil roasting can be effectively used for the manufacture of peanut butter, without the need for further thermal treatments aimed towards the inactivation of TIs. It is important to mention that both nutritional and functional properties are modified by these thermal treatments. For example, while roasting does not affect the flour microstructure, other methods such as boiling and dry heating, increases the water-holding capacity and a significant reduction in solubility. On the other hand, it is known that these treatments decrease the fat binding capacity in legume flours, promoting the formulation of legume products with less fat contents (Ma and others 2011).

A Canadian study reported a change in levels of enzyme inhibitors after 4 h soaking pretreatment followed by cooking at 95 °C for 1 h. The legumes included were different varieties of peas, lentils, chickpeas, faba beans, and common beans. The sequential application of soaking and cooking achieved the maximum reduction of TI activities. The TI's of pea, lentil, faba bean, chickpea, and common bean reduced 81.25, 100, 100, 88.37, and 93.7 %, respectively. These results are consistent with what already reported for lentil, where soaking of 12 h followed by blanching at 70 °C for 9 min and cooking at 116 °C for 42 min (a common canning process) eliminated TIA. The soaking process itself improved TI inactivation compared with only cooking likely due to the leaching of TIs into the steep water and also it improved the decrease of other antinutritional factors, such as lectin. Nevertheless, soaking also promoted loss of minerals in about 25% (Pedrosa and others 2015; Shi and others 2017).

Given the results, it is implied that the effectiveness of the different processes depends partly on the legume type and the structure of TIs that differ even between varieties. According to the information analyzed herein, any thermal treatment provides a quick way to inactivate TIs in legumes like soybean, peanut, lentil, and mung bean, with the added advantage that all of these treatments are fully standardized and can be carried out both industrially and at home. However, the greatest disadvantage is the negative effect that they have over some functional properties, mainly solubility. In addition, if the temperature and time profile is not optimized, the treatments can destroy important components of the legume matrix like heat labile vitamins and amino acids.

Extrusion

Extrusion cooking is a continuous thermal/mechanical and short-time process in which food materials, usually starchy grains, meals, and flours are fed into a barrel containing a rotating single or twin screw(s) and forced to pass through a die plate that shapes extrudates into given configurations. The barrel is usually heated in order to gelatinize starches and enhance protein denaturation, where reactions such as hydrolysis of peptide bonds at aspartic acid residues and interchange or destruction of disulfide bonds are involved. The screw configuration which imparts mechanical shear and die plate along with the temperatures applied in the different barrel sections affect the internal pressure and the degree of cooking. One of the main advantages of this process is that the short residence time maintains the nutritional value of extrudates. The use of this technology has been applied to the legume industry for different purposes. Extrusion has been evaluated as a means to add "hard-to-cook" pulses into other food products, mainly snacks (Smith and Hardacre 2011). Since extrusion is a method that uses temperature and high shear forces, it

has the capacity of physically deform proteins. Therefore it should have a denaturation effect on molecules such as TIs by changing their secondary and tertiary structures. Some of the legumes where extrusion has been tested are common beans, soybeans, field peas, chickpeas, lentil, and faba beans. Several conditions have been studied: different screw speeds and number (single and twin), temperatures, die longitude, and with or without a pretreatment. Field pea, chickpea, and faba bean flour have been extruded after being preheated and conditioned, obtaining TIs reductions of up to 53.7, 91.8, and 58.9%, respectively. For this case, the preconditioner, outlet and dryer temperature during the process have played important roles, since they have varied from 70.5 to 100 °C, 108 to 116 °C, and 89 to 147 °C respectively. An important insight obtained by this study was that high temperatures were needed only for the preconditioner treatment of chickpeas, while for faba beans the process needed the highest level of temperature (Adamidou and others 2011). These results suggest that TIs are more heat-labile in the case of chickpeas. As these results differ from others previously mentioned in this review, it would be important to perform investigations aimed towards heat effects over chickpea TIs. Regarding soybeans and lentil, extrusion at high temperature appears to be enough to inactivate TIs, since dry extrusion temperatures of 150 °C inactivated up to 95 and more than 93 % of the TI's respectively (Žilić and others 2012; Rathod and Annapure 2016). Given these results, extrusion is a viable alternative for soybean products, like snacks, without the need to implement a previous inactivation step. An additional advantage of using this method for legume processing is the improvement of the nutritional value by reducing phytates, tannins, and improving up to 2 fold *in vitro* protein digestibility. In the case of soybeans, it also inactivates lipoxygenase, an enzyme that catalyzes deoxygenation of some polyunsaturated fatty acids. The oxidized fatty acids are known to promote inflammation and hypersensitivity reactions and generate undesirable off-odors associated with flavor reversion (Adamidou and others 2011; Žilić and others 2012). Functional properties of legumes have also been studied in parallel with TIs inactivation during extrusion. For common bean flours, a single extruder operating at a screw speed of 150 rpm, a compression ratio of 3:1, 150 °C, and 5 mm round die orifices reduced TIs in 70.7%. In terms of functional properties, water solubility, and absorption indexes improved by 17.8 and 43.6% respectively; however, the emulsifying activity was reduced by around 19.6% (Batista and others 2010). Since this process has both positive and negative effects on functional properties, its suitability will depend on the intended use of the extrudates. For example, this process would be appropriate for legumes intended for food products where solubility is crucial, like bread and bean protein-

based beverages, but it would not be recommended for products where emulsifying capacity is relevant (for example, margarines, mayonnaise, sausages, dressings and creamy sauces).

Ultrafiltration

Another process aimed at improving the nutritional qualities of legume products is ultrafiltration. Unlike the methods mentioned before, ultrafiltration does not inactivate TIs, rather it is able to remove and separate TIs into different fractions of interest. The main advantages of UF are mild operating conditions and high selectivity to remove relatively small molecules.

For this particular issue, UF has only been tested over Kabuli and Desi chickpea protein concentrates obtained from full-fat and defatted flours (Mondor and others 2009). In this work, a 50 kDa hollow fiber membrane was used expecting that compounds like mineral, carbohydrates, ash, phenolic compounds and TIs permeated through the membrane. Most of the legume proteins and fat were expected to stay as retentate but although total phenolic compounds, carbohydrates, and ash were reduced up to 16.48, 95.2, and 77.8% respectively, TIs content was not affected in most samples (a marginal reduction of 9.47% was achieved). Thus, it is recommended to modify the molecular weight cut-off of the UF membrane to allow the permeation of the 8 to 20 kDa TIs. It would also be convenient to characterize TIs from the desired legume variety in order to know their exact molecular size and thus determine if they are found individually or if they are part of protein bodies. Moreover, it would also be useful to determine the protein profile of the particular legume with the purpose of knowing to what extent the UF process affects the protein concentrate yield. Finally, an additional recommendation would be to maintain legume proteins in their native forms, to avoid their elution as monomers in the filtration membranes.

UF has been successfully utilized for the recovery of native forms of proteins with potential in preventive medicine. For instance, soybean BBTI with known carcinogenic suppressor effects and prevent regular cell conversion into malignant cells have been successfully recovered using this technology (Koepke and others 2000).

Ultrasound

Ultrasound (US) is other relevant technique because is effective in the inactivation of different enzymes via the phenomena of cavitation phenomenon, which promotes protein structural changes through a temperature increase generated by the rapid formation and subsequent collapsing of gas bubbles. In the case of TIs inactivation, its use has been more as a synergistic tool or to enhance the effectiveness of other treatments. In fact, there are not many reports about the effectiveness of US in TI inactivation. One of the most relevant is the evaluation of US waves of 30 kHz applied for 20 min over TI isolated from soybeans. With this treatment,

the authors achieved a decrease of 55% in KTI which was attributed to the disruption of disulfide bonds (Huang and others 2008). This assessment, however, was made exclusively on the soybean KTI, without the rest of the components, thus reducing useful information about the performance of the treatment on industrial setups. The authors speculate that the nutrient quality of products would be kept, since unlike thermal treatment, US will only affect proteins activities and functional properties by breaking disulfide bonds without affecting the integrity of individual amino acids like cysteine, arginine and lysine. Other studies demonstrated that legumes' functional properties affected by this technique, for example, the size of pea and soybean protein isolates were reduced after applying an intensity of 20 to 34 kHz for only 2 min. This structural change improves solubility, trait that also was enhanced on materials treated at intensities ranging from 20 to 40 kHz for 15 min (Jambrak and others 2009; O'Sullivan and others 2016). It would be of interest to study the effects of US in other legumes' functional properties such as foaming, emulsifying, and fat binding capacities.

High hydrostatic pressure

High hydrostatic pressure (HHP) is a non-thermal emerging technology mainly used for food preservation. HHP provides the opportunity for developing new legume based products with high nutritional value and extended shelf-life. The effect of this technology over the ANFs of legumes started to be evaluated over compounds like flatus oligosaccharides (Porzucek and others 2002) and later on as a non-thermal process to denature proteins including TIs. HHP disturbs the balance of intramolecular and solvent protein interactions, specially hydrophobic and electrostatic with little effect on covalent bonds (Estrada-Girón and others 2005).

Reported studies of HHP over TIs in legumes are limited to soybean, split peas, and white beans. In all these cases its effect has been reported in combination with other experimental factors, such as temperature. For example, HHP has been evaluated with soybean milk using various combinations of HHP and temperature, for example, 250/50, 550 / 19, 550/65, and 550/80 MPa / °C (Guerrero-Beltrán and others 2009). The effect of adding 0.5% of sodium bicarbonate to the soybeans prior to producing the milk achieved a maximum inactivation of 76% when applying 550 MPa during 15 min at 65 °C (Guerrero-Beltrán and others 2009). These authors concluded that the HHP-temperature combination might reduce by 45 min the time required to inactivate TIs compared to 60 min using traditional thermal treatments. In addition, the temperature was reduced by 28 °C (compared with 93 °C used in traditional heat treatment). Thus, HHP is a viable option for saving time and energy. These findings are consistent with those reported by Peñas and others (2011) who treated germinated soybean sprouts at 300 MPa and 40 °C for 15 min.

The modification of the TI was reconfirmed by the observed reduction in the electrophoretic band of 20 kDa associated with TI which implies a significant modification of its chemical structure.

Besides TI inactivation, a further important benefit of this technology is that, when combined with a mild thermal treatment, the extraction of isoflavones improves up to 40.28% (Jung and others 2008). The isoflavones, also known as phytoestrogens, are of interest for the manufacture of functional foods and nutraceuticals because they prevent cancer, oxidative stress, osteoporosis, and are commonly used to naturally treat the post-menopausal symptoms.

Lastly, combinations of HPP (100 or 600 MPa), thermal treatment (20 or 60 °C), and variable time (30 or 60 min) have been tested in split peas and white beans. For each legume, the results and optimal processing conditions are variable or in some cases, contradictory. The maximum TI inactivation was 100%, corresponding to split pea when treated at 600 MPa and 60 °C, regardless of the time. On the other hand, the TIs of white beans were 84% inactivated when treated at the same pressure and thermal conditions, but with 60 min processing time. Protein digestibility was improved by 4.3 and 8.7% in split peas and white beans, respectively (Linsberger-Martin and others 2013).

The above emphasizes the dissimilarities among TIs from different legumes, suggesting that those present in split peas are more susceptible to molecular changes compared to counterparts associated to white beans. This agrees with previous reports for some types of beans, in which TIs resulted to be thermostable (Linsberger-Martin and others 2013). Despite the above, the inactivation levels for all the legumes were high, which makes HHP a suitable process for reducing TIs especially when combined with other technologies.

Instant controlled pressure drop

Instant controlled pressure drop (DIC) is a relatively new technology that combines steam pressure (up to 8 bar) with heat (up to 170 °C) for a maximum time of 3 min. It has been proposed as an alternative to thermal treatments to eliminate or inactivate by denaturation ANFs in legumes.

Lupine alkaloids and phytates are among the ANFs targeted by this technology. Regarding TIs inactivation, there are only 2 studies published (Haddad and Allaf 2007; Pedrosa and others 2012). By applying 7 bar for 1, 3, or 6 min over conditioned soybean seeds, TIA was reduced up to 95.4, 98.6, and 98.3% respectively. The inactivation rates were very similar when applying 6 bar of pressure for 1 min, where TIs were inactivated by up to 99.7%. Also, when testing processing times of 3 or 1 min at 3 or 6 bar, different optimal conditions were found for lentil, chickpea, and roasted peanut where TI values were reduced up to 95.9% (3 bar for 3 min), 98.29% (6 bar for 1 min), and 77.3% (6 bar for 3 min), respectively. The application of DIC

resulted in a seed with a porous texture. The seed porosity increased the availability of soluble sugars and reduced other antinutritional factors such as phytic acid and lectin (Haddad and Allaf 2007; Pedrosa and others 2012). A recommendation for future work is to test DIC on non-roasted peanuts, since the initial TIs activity for roasted peanuts was already low given the thermal treatment. It can be concluded that DIC reduced lentil, chickpea, and soybean TIs enough to meet the TIA safety limits. The main advantages of DIC are the relatively short processing time and quick TI inactivation. This technology is therefore an excellent alternative for its implementation at industrial level.

Radiation

Infrared

Infrared (IR) has had a great interest in the food industry because unlike traditional heat processing, it is efficient and energy saving due mainly to its fast heating response. TIs inactivation principle is the same as the thermal treatments described above, being heat the responsible for protein denaturation, but the main difference between them is that IR transfers thermal energy by electromagnetic waves. IR has already been tested in legumes with the aim of reducing their moisture, diminish cooking times and enhance softer texture in finished products (Bellido and others 2006). Soybean is, however, the only legume where IR has been tested with the aim of reducing TI. The application of different power levels (814, 1003, 1208, or 1342 W) inactivated up to 95% the TIs (15 min exposure at 1342 W) of soybeans previously soaked in water for 45 min. Besides TI, soybean lipoxygenase, an enzyme that catalyzes the oxidation of soybean lipids, was completely inactivated by IR exposure (Baker and Mustakas 1973; Yalcin and Basman 2015). These investigations demonstrated that IR can reduce the time needed for inactivation of TI compared with traditional thermal treatments saving energy. Since commercial IR industrial equipment are available, IR could replace thermal processes currently used for soybean processing.

Although IR is a speedy treatment, it is nonetheless a heating treatment, so it still reduces the solubility of processed legume products or fractions (mainly protein fraction); therefore, the appropriateness of its application, needs to be further evaluated depending on the intended use of the legume products.

Gamma

Gamma irradiation is a FDA approved technique mainly used for preserving foods. Moreover, it improves the nutritional quality of legumes by enhancing the content of isoflavones, phenols, and anthocyanins, thus increasing their antioxidant properties (Dixit and others 2011).

In terms of TIs inactivation, gamma irradiation causes disruption, degradation, and aggregation of proteins in solutions due to oxygen radicals generated by radiolysis of water. Additionally it promotes changes in the secondary and tertiary structures of enzymes (Gaber 2005). Its effect over ANFs in legumes has been assessed for different soybean varieties. The usage of doses of 5 kGy irradiated to green, black, and yellow coated soybeans reduced TI by 63.19, 50.92, and 54.92% respectively, while at doses of 8 kGy the TIs in common soybeans reduced only 38.65%. This variability is attributed to chemical and structural differences among TIs that are known to differ among varieties. On the other hand, the phenolics of soybean significantly increased by the application of these treatments whereas the vitamin C content reduced around 38% (De Toledo and others 2007; Dixit and others 2011). In all cases, there was a high remnant of active TI, so it is recommended to combine Gamma irradiation with other technologies.

Soaking

Soaking is the simplest and economic processing method for inactivation of TIs. It provides legume seeds hydration and promotes the removal of a wide range of water soluble compounds, including anti nutritional factors, in the discarded soaking solution. The effectiveness of soaking is influenced by temperature, pH, and soaking duration (El-Adawy and others 2000). Distilled or tap water at room temperature has been used for the removal of TIs. With few exceptions, the longer the seed remains in the soaking solution, the more TI leaches into the steep water. For example, soaking soybeans for 96 h removes 35% of their TIs, while the same process increases by 22.3% TIs of bitter lupine. This result may be due to the low molecular weight in the TIs of bitter lupine, promoting a higher concentration in the soaked seeds. A disadvantage of soaking is that, for a process that takes 96 h, water-soluble proteins may go within the discarded water, reducing thus the protein content by up to 26.3%. Another interesting result is that soaking soybeans during 120 h does not improve the amount of TIs removed compared with 96 h (Mumba and others 2004; Embaby 2010b), therefore, it is recommended to carry out this comparative analysis to other legumes of interest in order to keep the length of soaking as short as possible.

Soaking times were also tested for Canadian and Egyptian cowpea kidney beans and pea, and no differences in inactivation of TIs at 18 *versus* 22 h were found (Khattab and Arntfield 2009). TIs reduction rates were small, making soaking a low-performance and time consuming treatment.

Chemical processes

Chemical treatments are based on the use of substances that have the capacity of altering molecular structures through chemical interactions. In the particular case of TIs, the main target is to disrupt disulfide bonds that give structure and stability to the TI tertiary structure. Some work

has also been carried out using acids and bases together with physical treatments. The major disadvantage of these processes is that they may result in final products with chemical residues (Soetan and Oyewole 2009).

Acids and Bases

The use of sodium hydroxide, ammonium hydroxide, and sodium bicarbonate during thermal treatment of soybeans has been proposed as assistance for TI inactivation since extremely high or low pHs promote loss of enzyme activity due to unfavorable electrostatic interactions between amino acid residues which cause conformational changes in the active site. When soybeans are cooked in the presence of 1% NaOH or NH₄OH, the temperature needed to deactivate TI is reduced from 100 to 90.5 °C and to 73.9 °C respectively. Sodium bicarbonate has also been used in combination with cooking procedures, but it has been the least efficient.

Sodium bicarbonate was applied in the soaking grain stage of the soymilk manufacture process, with a synergistic effect with HHP at 50 °C (92% of TI reduction) (Baker and Mustakas 1973; Guerrero-Beltran and others 2009). In the case of acids, it is important to bear in mind that they have a delaying TI inactivation effect. The main possible reason is that proteins are not available for heat inactivation under acidic conditions. It is also important to point out that the use of alkalis during food processing causes side reactions that influence nutrition of treated proteins. For example: 1) the formation of new amino acids such as lysinoalanine which has been reported to cause kidney damage in rats and also 2) the racemization of amino acids which is related to decreased protein digestibility and toxic compounds formation (Friedman 1999; Gilani and Sepehr 2003). The formation of these compounds in soybean is dependent on factors such as alkali concentration, exposure time and type of protein (Nishino and Ohshima 1995). Apart from the foregoing, the use of alkalis undoubtedly affects the functional properties of proteins but to date there are not scientific reports about this phenomenon.

Reducing agents

Reducing agents are known to inactivate trypsin inhibitors via the disruption of disulfide bonds. The number and location of these bonds within the structure differs according to the legume type. Figures 2 and 3 shows the structure of the most studied soybean trypsin inhibitors classified as KTI (Song and Suh 1998) and BBTI (Voss and others 1996), respectively.

The clear objective of these additives is to break TI disulfide bonds, however, there are only few investigations reporting this strategy and almost all employ sodium metabisulfite (Na₂S₂O₅) with soybeans. Sessa and others (1988) evaluated the effect of a 0.1 M Na₂S₂O₅ in aqueous solution (2 h treatment at 65 °C) and concluded that the trypsin inhibitor was inactivated

by more than 94% and the deactivation was associated with the modification of the tertiary structure.

Besides metabisulfite, tris (2-carboxiethyl)-phosphine (TCEP) has also been tested in soybean. Although disulfide bonds were disrupted to achieve total TI inhibition after 5 min of treatment, TCEP is a carcinogen, so its use for food applications is restricted. An important aspect to take into consideration is that, for any product intended for human or animal consumption, additives need to be approved by regulatory agencies so the processed food or feed does not exceed the maximum allowed amounts, otherwise a purification step would be necessary to get rid of the chemical additive.

Functionalized copolymer

An isolated study using a functionalized polymer to improve soybean milk nutritional value was reported. This method uses a copolymer to bind and denature unwanted components such as TIs and lipoxygenase (LOX) by a combination of ionic and hydrophobic interactions. The copolymer tested (Allyl glycidyl ether-ethylene glycol dimethacrylate) was functionalized with amines (dibenzyl amino) achieving a binding of TIs and LOX of 25-30 mg/g after only 1 h of being in contact with soybean milk. Ninety percent of the bound enzymes were denatured but total inactivation was not reported. Although it seems as a promising technique, another tests need to be further investigated especially in terms of toxicity and over other soybean compounds (Jasti and others 2015).

Biotechnological processes

Germination

Germination is a natural catabolic process of all superior plants by which the seed comes out of its latency, using the reserved substances in the cotyledon for embryo development and growth (Sangronis and Machado 2007). Germination has been effectively used by humankind as a treatment to reduce anti nutritional compounds as TI, under the principle that during this stage, proteases break down cellular proteins and enzymes to get free amino acids for its subsequently use for seedling autotrophic growth.

Contradictory results have been reported depending on the type of legume and especially depending on the germination conditions and sprouting time. Black gram (*Vigna mungo*), chickpea, and black or white beans as well as pigeon beans (*Cajanus cajan*) have been germinated from 2 to 5 d with a significant reduction of TI by 88.2, 34.0, 25.0, 52.5, and 19.2% respectively (Chitra and Sadasivan 1986; El-Adawy 2002; Sangronis and Machado 2007). Three day germinated black gram showed a sharp increase in TI activity (> 3 times) compared with

sprouts germinated for 2 d. In the case of chickpea, the use of thermal treatments (83% reduction of TIs activity) was more efficient compared to germination alone (34% inactivation).

Germination is a process of medium efficiency, but it has an additional advantage over other strategies: it increases concentration and bioavailability of a variety of nutrients and improves certain characteristics of pulses. If time is not a limiting factor, germination could be combined with other strategies, of at least similar in effectiveness, like gamma irradiation. A combination of both methods may help for example, to overcome the losses of vitamin C caused by gamma irradiation.

Fermentation

Fermentation is an anaerobic, catabolic process where complex molecules are transformed into simple ones by microorganisms. For example, bacterial and yeast fermentation involves proteolytic activity that increases amino acid bioavailability by degrading unwanted substances, such as proteinase inhibitors.

Some references indicate that fermented soybean foods such as soy sauce, miso, and tempeh are safe to consume in terms of TIs when *Aspergillus oryzae*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, and *Saccharomyces cerevisiae* are used. When *A. oryzae* was used for Solid-State Fermentation (SSF) over a period of 5 d, Gao and others (2013) reported 89.2% of TI inactivation. Likewise, Adeyemo and Onilude (2013) concluded that fermentation with *L. plantarum* inactivated 99.17% of the trypsin activity and Chi and Cho (2016) reported that by SSF with *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus amyloliquefaciens*, and *Saccharomyces cerevisiae*, separately over a period of 2 d, TIA was reduced by 82.6, 88.9, 85.9, and 73.8% respectively. In the case of tempeh produced from soybeans, the use of *Rhizopus oligosporus*, yielded a slight increase in trypsin inhibitor (Egounlety and Aworh 2003), because these molds, which express high amounts of carbohydrases, are more effective to ferment carbohydrates such as sucrose, raffinose, and stachyose.

Other legume seeds have been also subjected to fermentation with the aim of reducing TI. Common beans fermented with *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931 reduced around 38% the TIA (Barampama and Simard 1994).

Table 2 summarizes the methods previously discussed, pointing out their advantages, disadvantages, efficiencies, and treatment conditions.

Conclusions

This review assesses the effect of different methods on the TI of a wide range of legumes, highlighting the various novel processes developed in order to overcome the disadvantages related to conventional treatments (energy inefficiency as well as nutritional and physicochemical impairment). In general, the most effective treatments are thermal such as cooking, microwaving, extrusion, and infrared irradiation, as well as chemical and biotechnological approaches such as fermentation. The processes with medium effectiveness are ultrasound, gamma irradiation, germination, and high pressure applied alone. Soaking and ultrafiltration are considered as the lowest effective. The process efficiency appears to be partially dependent on the legume type, and when low or medium efficiency processes do not reduce TI activity in a significant way, a combination with other most effective treatments (for example, high pressure + thermal treatment) significantly improves the results. The trend is toward development of effective and simple strategies, which depend on the legume type, processing time, and the use of energy in an efficient way, to make them feasible from the technological and economic points of view.

The information generated by this review should help the food industry as well as regulatory bodies to identify the appropriate treatments for the effective usage of legumes.

Acknowledgments

The authors would like to thank Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey and CONACyT for their support for this study. The authors report no conflict of interest.

References

Adamidou S, Nengas I, Grigorakis K, Nikolopoulou D, Jauncey K. 2011. Chemical composition and antinutritional factors of field peas (*Pisum sativum*), chickpeas (*Cicer arietinum*), and faba beans (*Vicia faba*) as affected by extrusion preconditioning and drying temperatures. *Cereal Chem* 88(1):80-86.

Adeparusi EO. 2001. Effect of processing on the nutrients and anti-nutrients of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) flour. *Mol Nutr Food Res* 45(2):94-96.

Adeyemo SM, Onilude AA. 2013. Enzymatic reduction of anti-nutritional factors in fermenting soybeans by *Lactobacillus plantarum* isolates from fermenting cereals. *Ng Food J* 31(2):84-90.

Alajaji SA, El-Adawy TA. 2006. Nutritional composition of chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by microwave cooking and other traditional cooking methods. *J Food Comp Anal* 19(8):806-812.

Alonso R, Aguirre A, Marzo F. 2000. Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and *in vitro* digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chem* 68(2):159-165.

Andrade JC, Mandarino JMG, Kurozawa LE, Ida EI. 2016. The effect of thermal treatment of whole soybean flour on the conversion of isoflavones and inactivation of trypsin inhibitors. *Food Chem* 194:1095-1101.

Baker EC, Mustakas GC. 1973. Heat inactivation of trypsin inhibitor, lipoxygenase and urease in soybeans: effect of acid and base additives. *J Am Oil Chem Soc* 50(5):137-141.

Barać M, Stanojević S. 2005. The effect of microwave roasting on soybean protein composition and components with trypsin inhibitor activity. *Acta Aliment* 34(1):23-31.

Barampama Z, Simard RE. 1994. Oligosaccharides, antinutritional factors, and protein digestibility of dry beans as affected by processing. *J Food Sci* 59(4):833-838.

Batista KA, Prudêncio SH, Fernandes KF. 2010. Changes in the functional properties and antinutritional factors of extruded hard-to-cook common beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *J Food Sci* 75(3): C286-C290.

Bellido G, Arntfield SD, Cenkowski S, Scanlon M. 2006. Effects of micronization pretreatments on the physicochemical properties of navy and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *LWT-Food Sci Technol* 39(7):779-787.

Borchers R, Ackerson CW, Kimmelt L. 1947 Trypsin inhibitor. IV. Occurrence in seeds of the Leguminosae and other seeds. *Arch Biochem* 13:291-293.

Borse LB, Borse SL, Gujarathi NA. 2016. Natural toxins and antinutrients in plants and fungi: ecological biochemistry of food. In: Bagchi D, Swarrop A, editors. *Food toxicology*. Florida: CRC press. p 263-273.

Brough SH, Azam-Ali SN. 1992. The effect of soil moisture on the proximate composition of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L) Verdc). *J Sci Food Agri* 60(2):197-203.

Chen Y, Xu Z, Zhang C, Kong X, Hua Y. 2014. Heat-induced inactivation mechanisms of Kunitz trypsin inhibitor and Bowman-Birk inhibitor in soymilk processing. *Food Chem* 154:108-116.

Chi CH, Cho SJ. 2016. Improvement of bioactivity of soybean meal by solid-state fermentation with *Bacillus amyloliquefaciens* versus *Lactobacillus* spp. and *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT Food Sci Technol* 68:619-625.

Chitra R, Sadasivam S. 1986. A study of the trypsin inhibitor of black gram (*Vigna mungo* (L.) Hepper). *Food Chem* 21(4):315-320.

Chrispeels MJ, Baumgartner B. 1978. Trypsin inhibitor in mung bean cotyledons purification, characteristics, subcellular localization, and metabolism. *Plant Physiol* 61(4):617-623.

De Toledo TCF, Canniatti-Brazaca, SG, Arthur V, Piedade SMS. 2007. Effects of gamma radiation on total phenolics, trypsin and tannin inhibitors in soybean grains. *Radiat Phys Chem* 76(10):1653-1656.

Dixit AK, Kumar V, Rani A, Manjaya JG, Bhatnagar D. 2011. Effect of gamma irradiation on lipoxygenases, trypsin inhibitor, raffinose family oligosaccharides and nutritional factors of different seed coat colored soybean (*Glycine max* L.). *Radiat Phys Chem* 80(4):597-603.

Egounlety M, Aworh OC. 2003. Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms). *J Food Eng* 56(2):249-254.

EI-Adawy TA. 2002. Nutritional composition and antinutritional factors of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) undergoing different cooking methods and germination. *Plant Foods Hum Nutr* 57(1):83-97.

EI-Adawy TA, Rahma EH, El-Bedawy AA, Sobihah TY. 2000. Effect of soaking process on nutritional quality and protein solubility of some legume seeds. *Nahrung* 44(5):339-343.

Embaby HES. 2010a. Effect of heat treatments on certain antinutrients and *in vitro* protein digestibility of peanut and sesame seeds. *Food Sci Technol Res* 17(1):31-38.

Embaby HES. 2010b. Effect of soaking, dehulling, and cooking methods on certain antinutrients and *in vitro* protein digestibility of bitter and sweet lupin seeds. *Food Sci Biotechnol* 19(4):1055-1062.

Estrada-Girón Y, Swanson BG, Barbosa-Cánovas GV. 2005. Advances in the use of high hydrostatic pressure for processing cereal grains and legumes. *Trends Food Sci Technol* 16(5):194-203.

Friedman M. 1999. Chemistry, biochemistry, nutrition, and microbiology of lysinoalanine, lanthionine, and histidinoalanine in food and other proteins. *J Agric Food Chem* 47(4):1295-1319.

Gaber MH. 2005. Effect of γ -irradiation on the molecular properties of bovine serum albumin. *J Biosci Bioeng* 100(2):203-206.

Gao YL, Wang CS, Zhu QH, Qian GY. 2013. Optimization of solid-state fermentation with *Lactobacillus brevis* and *Aspergillus oryzae* for trypsin inhibitor degradation in soybean meal. *J Integr Agric* 12(5):869-876.

Gemedede HF, Ratta N. 2014. Antinutritional factors in plant foods: potential health benefits and adverse effects. *Glob Adv Res Food Sci Technol* 3(4):103-117.

Gilani GS, Sepehr E. 2003. Protein digestibility and quality in products containing antinutritional factors are adversely affected by old age in rats. *J Nutr* 133(1):220-225.

Guerrero-Beltrán JA, Estrada-Girón Y, Swanson BG, Barbosa-Cánovas GV. 2009. Pressure and temperature combination for inactivation of soymilk trypsin inhibitors. *Food Chem* 116(3):676-679.

Habiba RA. 2002. Changes in anti-nutrients, protein solubility, digestibility, and HCl-extractability of ash and phosphorus in vegetable peas as affected by cooking methods. *Food Chem* 77(2):187-192.

Haddad J, Allaf K. 2007. A study of the impact of instantaneous controlled pressure drop on the trypsin inhibitors of soybean. *J Food Eng* 79:353–357.

Hernández-Nistal J, Martín I, Jiménez T, Dopico B, Labrador E. 2009. Two cell wall Kunitz trypsin inhibitors in chickpea during seed germination and seedling growth. *Plant Phys Biochem* 47(3):181-187.

Huang H, Kwok KC, Liang HH. 2008. Inhibitory activity and conformation changes of soybean trypsin inhibitors induced by ultrasound. *Ultrason Sonochem* 15(5):724-730.

Iqbal A, Khalil IA, Ateeq N, Khan MS. 2006. Nutritional quality of important food legumes. *Food Chem* 97(2):331-335.

Jambrak AR, Lelas V, Mason TJ, Krešić G, Badanjak M. 2009. Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *J Food Eng* 93(4):386-393.

Jasti LS, Lavanya K, Fadnavis NW. 2015. Adsorption induced denaturation: application to denaturation of soybean trypsin inhibitor (SBTI) and lipoxygenase (LOX) in soymilk. *Biotechnol Lett* 37(1):147-151.

Jung S, Murphy PA, Sala I. 2008. Isoflavone profiles of soymilk as affected by high-pressure treatments of soymilk and soybeans. *Food Chem* 111(3):592-598.

Kakade ML, Rackis JJ, McGhee JE, Puski G. 1974. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chem* 51(3):376-382.

Khattab RY, Arntfield SD. 2009. Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments 2. Antinutritional factors. *LWT Food Sci Technol* 42(6):1113-1118.

Klomklao S, Benjakul S, Kishimura H, Osako K, Tanaka M. 2010. A heat-stable trypsin inhibitor in adzuki bean (*Vigna angularis*): effect of extraction media, purification and biochemical characteristics. *Int J Food Sci Technol* 45(1):163-169.

Koepke J, Ermler U, Warkentin E, Wenzl G, Flecker P. 2000. Crystal structure of cancer chemopreventive Bowman-Birk inhibitor in ternary complex with bovine trypsin at 2.3 Å resolution. Structural basis of Janus-faced serine protease inhibitor specificity. *J Mol Biol* 298(3):477-491.

Kumar V, Gowda LR. 2013. The contribution of two disulfide bonds in the trypsin binding domain of horse gram (*Dolichos biflorus*) Bowman-Birk inhibitor to thermal stability and functionality. *Arch Biochem Biophys* 537(1):49-61.

Linsberger-Martin G, Weiglhofer K, Phuong TPT, Berghofer E. 2013. High hydrostatic pressure influences antinutritional factors and *in vitro* protein digestibility of split peas and whole white beans. *LWT-Food Sci Technol* 51(1):331-336.

Lorensen E, Prevosto R, Wilson KA. 1981. The appearance of new active forms of trypsin inhibitor in germinating mung bean (*Vigna radiata*) seeds. *Plant Physiol* 68(1):88-92.

Ma Z, Boye JI, Simpson BK, Prasher SO, Monpetit D, Malcolmson L. 2011. Thermal processing effects on the functional properties and microstructure of lentil, chickpea, and pea flours. *Food Res Int* 44(8):2534-2544.

Machado FPP, Queiróz JH, Oliveira MGA, Piovesan ND, Peluzio MCG, Costa NMB, Moreira MA. 2008. Effects of heating on protein quality of soybean flour devoid of Kunitz inhibitor and lectin. *Food Chem* 107(2):649-655.

Meena RS, Yadav RS, Meena H, Kumar S, Meena YK, Singh A. 2015. Towards the current need to enhance legume productivity and soil sustainability worldwide: a book review. *J Clean Prod* 104:513-515.

Mejia EG, Valadez-Vega MDC, Reynoso-Camacho R, Loarca-Pina G. 2005. Tannins, trypsin inhibitors and lectin cytotoxicity in tepary (*Phaseolus acutifolius*) and common (*Phaseolus vulgaris*) beans. *Plant Foods for Hum Nutr* 60(3):137-145.

Mondor M, Aksay S, Drolet H, Roufik S, Farnworth E, Boye JI. 2009. Influence of processing on composition and antinutritional factors of chickpea protein concentrates produced by isoelectric precipitation and ultrafiltration. *Innov Food Sci Emerg Technol* 10(3):342-347.

Mubarak AE. 2005. Nutritional composition and antinutritional factors of mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes. *Food Chem* 89(4):489-495.

Mumba PP, Chilera F, Alinafe G. 2004. The effect of the length of soaking time on trypsin inhibitor, crude protein and phosphorus contents of soybeans (*Glycine max*). *Int J Consum Stud* 28(1):49-54.

Nishino N, Uchida S, Ohshima M. 1995. Formation of lysinoalanine following alkaline processing of soya bean meal in relation to the degradability of protein in the rumen. *J Sci Food Agric* 68(1):59-64.

O'Sullivan J, Murray B, Flynn C, Norton I. 2016. The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins. *Food Hydrocoll* 53:141-154.

Patras A, Oomah BD, Gallagher E. 2011. By-product utilization. In: Tiwari, BK, Gowen A, McKeena B, editors. *Pulse foods*. 1th ed. United Kingdom: Elsevier. P 325-362.

Pedrosa MM, Cuadrado C, Burbano C, Allaf K, Haddad J, Gelencsér E, Muzquiz M. 2012. Effect of instant controlled pressure drop on the oligosaccharides, inositol phosphates, trypsin inhibitors and lectins contents of different legumes. *Food Chem* 131(3):862-868.

Pedrosa MM, Cuadrado C, Burbano C, Muzquiz M, Cabellos B, Olmedilla-Alonso B, Asensio-Vegas C. 2015. Effects of industrial canning on the proximate composition, bioactive compounds contents and nutritional profile of two Spanish common dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem* 166:68-75.

Peñas E, Gomez R, Frias J, Baeza ML, Vidal-Valverde C. 2011. High hydrostatic pressure effects on immunoreactivity and nutritional quality of soybean products. *Food Chem* 125(2):423-429.

Porzucek H, Duszkiwicz-Reinhard W, Piecyk M, Klepacka M, Gniewosz M. 2002. Changes of flatulence-causing sugars in legume protein samples by high hydrostatic pressure. *Electr J Pol Agr Univ Food Sci Tech* 5(2).

Rathod RP, Annapure US. 2016. Effect of extrusion process on antinutritional factors and protein and starch digestibility of lentil splits. *LWT-Food Sci Technol* 66:114-123.

Rebello CJ, Greenway FL, Finley JW. 2014. A review of the nutritional value of legumes and their effects on obesity and its related co-morbidities. *Obes Rev* 15(5):392-407.

Rao KN, Suresh CG. 2007. Bowman-Birk protease inhibitor from the seeds of *Vigna unguiculata* forms a highly stable dimeric structure. *Biochim Biophys Acta* 1774(10):1264-1273.

Rivas-Vega ME, Goytortúa-Bores E, Ezquerro-Brauer JM, Salazar-García MG, Cruz-Suárez LE, Nolasco H, Civera-Cerecedo R. (2006). Nutritional value of cowpea (*Vigna*

unguiculata L. Walp) meals as ingredients in diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). Food Chem 97(1):41-49.

Sánchez-Chino X, Jiménez-Martínez C, Dávila-Ortiz G, Álvarez-González I, Madrigal-Bujaidar E. 2015. Nutrient and non-nutrient components of legumes, and its chemopreventive activity: a review. Nutr Cancer 67(3):401-410.

Sangronis E, Machado CJ. 2007. Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. LWT-Food Sci Technol 40(1):116-120.

Sessa DJ, Baker EC, Friedrich JP. 1988. Inactivation of trypsin inhibitors in whole and cracked soybeans with sodium metabisulfite. Lebensm Wiss Technol 21:163-168.

Shi L, Mu K, Arntfield SD, Nickerson MT. 2017. Changes in levels of enzyme inhibitors during soaking and cooking for pulses available in Canada. J Food Sci Technol 54(4):1014-1022.

Singh U, Jambunathan R. 1981. Studies on desi and kabull chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars: levels of protease inhibitors, levels of polyphenolic compounds and in vitro protein digestibility. J Food Sci 46(5):1364-1367.

Singh U. 1988. Antinutritional factors of chickpea and pigeonpea and their removal by processing. Plant Foods for Hum Nutr 38(3):251-261.

Smith J, Hardacre A. 2011. Development of an extruded snack product from the legume *Vicia faba* minor. Procedia Food Sci 1:1573-1580.

Soetan KO, Oyewole OE. 2009. The need for adequate processing to reduce the anti-nutritional factors in plants used as human foods and animal feeds: A review. Afr J Food Sci 3(9):223-232.

Song HK, Suh SW. 1998. Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator. J Mol Biol 275(2):347-363.

Sreerama YN, Neelam DA, Sashikala VB, Pratapa VM. 2010. Distribution of nutrients and antinutrients in milled fractions of chickpea and horse gram: seed coat phenolics and their distinct modes of enzyme inhibition. J Agric Food Chem 58(7):4322-4330.

Świeca M, Baraniak B. 2014. Influence of elicitation with H₂O₂ on phenolics content, antioxidant potential and nutritional quality of *Lens culinaris* sprouts. J Sci Food Agr 94(3):489-496.

Tetenbaum J, Miller LM. 2001. A new spectroscopic approach to examining the role of disulfide bonds in the structure and unfolding of soybean trypsin inhibitor. Biochemistry 40(40):12215-12219.

Valdebouze P, Bergeron E, Gaborit T, Delort-Laval J. 1980. Content and distribution of trypsin inhibitors and hemagglutinins in some legume seeds. *Can J Plant Sci* 60(2):695-701.

Valdez-Anguiano DM, Herrera-Cabrera E, Dávila-Ortiz G, Oomah BD, Cardador-Martínez A, Jiménez-Marínez C. 2015. Content and distribution of nutritional and non-nutritional compounds during germination of three Mexican faba bean (*Vicia faba*) varieties. *Int J Res Agric Food Sci* 2(9):1-14

Voss R, Ermler U, Essen LO, Wenzl G, Kim YM, Flecker P. 1996. Crystal Structure of the Bifunctional Soybean Bowman-Birk Inhibitor at 0.28-nm Resolution. *Eur J Biochem* 242(1):122-131.

Westfall RJ, Hauge SM. 1948. The nutritive quality and the trypsin inhibitor content of soybean flour heated at various temperatures. *J Nutr* 36:379-389.

Yalcin S, Basman A. 2015. Effects of infrared treatment on urease, trypsin inhibitor and lipoxygenase activities of soybean samples. *Food Chem* 169:203-210.

Yang HW, Hsu CK, Yang YF. (2014). Effect of thermal treatments on anti-nutritional factors and antioxidant capabilities in yellow soybeans and green-cotyledon small black soybeans. *J Sci Food Agr* 94(9):1794-1801.

Yatsu FK, Koester LS, Bassani VL. 2016. Isoflavone-aglycone fraction from *Glycine max*: a promising raw material for isoflavone-based pharmaceutical or nutraceutical products. *Rev Bras de Farmacogn* 26(2):259-267.

Žilić S, Bozović I, Šukalović VHT. 2012. Thermal inactivation of soybean bioactive proteins. *Int J Food Eng* 8(4):1556-3758.

Tables and Figures

Table 1. Comparative trypsin inhibitor activities of some legume seeds.

Scientific Name	Common Name	Trypsin Inhibitor Activity (U/mg)	Studies
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Kidney bean	3.10 ± 0.24	(Alonso and others 2000)
<i>Cicer arietinum</i>	Chickpea	8.10 - 12.1; 9.90 - 15.7	(Singh and Jambunathan 1981)
<i>Lens culinaris</i>	Lentil	7.40 ± 0.00	(Świeca and Baraniak 2014)
<i>Pisum sativum</i>	Pea	2.20	(Habiba 2002)
<i>Vigna unguiculata</i>	Cowpea	7.52 ± 0.34	(Rivas-Vega and others 2006)
<i>Vicia faba</i>	Broad bean	4.47 ± 0.21	(Alonso and others 2000)
<i>Arachis hipogea</i>	Peanut	5.60 ± 0.26	(Embaby 2010a)
<i>Cajanus cajan</i>	Pigeon bean	4.75 ± 0.10	(Sangronis and Machado 2007)
<i>Glycine max</i>	Soybean	94.1	(Yalcin and Basman 2015)
<i>Vigna radiata</i>	Mung bean	1.83	(Lorensen and others 1981)
<i>Lupinus spp</i>	Lupine	1.48 ± 0.04; 1.74 ± 0.07	(Embaby 2010b)
<i>Vigna mungo</i>	Black gram	0.61 - 1.03	(Chitra and Sadasivam 1986)
<i>Phaseolus acutifolius</i>	Tepary bean	11.5 - 18.0	(Mejia and others 2005)
<i>Vigna subterranea</i>	Earth pea	13.0	(Brough and Azam-Ali 1992)
<i>Phaseolus lunatus</i>	Lima bean	5.89	(Adeparusi 2001)

Table 2. Different methods used to inactivate trypsin inhibitors associated to legume seeds.

Method	Legumes	Treatment Conditions	Maximum inactivation yield (%)	TIs	Advantages	Disadvantages	Studies
Thermal treatment	1.-Pea.	1.-Microwaving (2450 MHz for 4 min); cooking (100 °C for 20 min); pressure cooking (120 °C 10 min); boiling (90 °C for 20 min);cooked presoaked seeds (95 °C for 1 h). 2.-Microwave (2450 MHz for 15 min); boiling (100 °C for 90 min); autoclaving (121 °C at 15 atm for 35 min). 3.-Boiling (90 min); autoclaving (121 °C for 35 min); microwaving (15 min); Cooked presoaked seeds (95 °C for 1 h). 4.-Roasting (80 °C for 1 min); cooked presoaked seeds (116 °C for 42 min); cooked presoaked seeds (95 °C for 1 h). 5.-108 °C (15-30 min); boiling (100 °C	1.- 100; 100; 100; 37.8 ; 81.3		-Very high efficiency. -Fully standardized. -Scalable processes. -Increases aromatic amino acids. -Improves gelling capacity. -Decrease of raffinose, stachyose, and verbascose. ¹	-Energy demanding. -Solubility reduction. -Decrease on lysine, tryptophan, and sulfur-containing amino acids. -Minerals lost (Na, Ca, and Mg). -Reduction of B vitamins. -Increase fat binding capacity.	1.-(Habiba 2002; Ma and others 2011;Shi and others 2017) 2.- (Mubarak 2005) 3.- (Alajaji and El-Adawy 2006; Shi and others 2017) 4.-(Ma and others 2011; Pedrosa and others 2015; Shi and others 2017). 5.- (Westfall and Hauge 1948; Egounlety and Aworh 2003; Barač and Stanojević 2005; Machado and others 2008; Chen and others 2014;Yang and others 2014;Andrade and others 2016) 6.-(Embaby 2010a) 7.-(Shi and others 2017) 8.- (Shi and others 2017) 9.-(Klomklao and others 2010) 10.-(Kumar and Gowda 2013)
	2.-Mung bean.		2.- 100; 100; 100				
	3.-Chickpea.		3.-82.3; 83.9; 80.5; 88.4				
	4.-Lentil.		4.-95.6; 98.0; 100				
	5.-Soybean.		5.-100; 96.2; 86.7; 82.2;				
	6.-Peanut.		>90.0; 67.3				
	7.-Faba bean.		6.-100; 62.5; 100;				
	8.-Common bean.		90.0; 88.0				
	9.-Adzuki bean.		7.- 100				
	10.-Horse gram.		8.- 93.7 9.- 0 10.- 0				

		for 9 min); cooking (30 min); roasting (2 min); autoclaving (121 °C for 15 min); boiling with 3 mM NaCl (5 min); Microwaving (3 min); oven (200 °C for 20 min).				
		6.- Boiling (20 min); microwaving (12 min); autoclaving (10 min); roasting salting; oil-roasting.				
		7.- Cooked presoaked seeds (95 °C for 1 h).				
		8.- Cooked presoaked seeds (95 °C for 1 h).				
		9.- Incubation (90 °C for 60 min).				
		10.- 95 °C for 4 h.				
Extrusion	1.- Common bean.	1.- 150 °C, ratio of 3:1.5 mm, and 150 rpm.	1.- 70.7	-Improves water solubility and absorption.	-Energy demanding.	1.- (Batista and others 2010)
	2.- Pea.	2.- (Previous cooking and humidified processes) 120 °C, 55 mm dia, and 380 rpm.	2.- 58.9	-Reduces phytate and total tannin levels ²	-Reduces emulsifying activity.	2.- (Adamidou and others 2011)
	3.- Chickpea.	3.- Previous cooking and humidified processes) 120 °C, 55 mm dia, and 380 rpm.	3.- 91.8	-Increases protein digestibility.	-Sometimes, there is the need of previous processes.	3.- (Adamidou and others 2011)
	4.- Faba bean.		4.- 53.7			4.- (Adamidou and others 2011)
	5.- Soybean.		5.- 95.0; 60.0			5.- (Žilić and others 2012)
	6.- Lentil.		6.- >93.0			6.- (Rathod and Annapure 2016)

		4.-(Previous cooking and humidified processes) 120 °C, 55 mm dia, and 380 rpm. 5.-150 °C dry extrusion; 150 °C wet extrusion. 6.- 140-180 wet extrusion.				
Ultrafiltration	1.-Chickpea.	1.-50 kDa.	1.- 9.47	-Selective method. -No harmful residues in the final product.	-Energy demanding.	1.-(Mondor and others 2009)
Ultrasound	1.-Soybean.	1.-20 kHz, 3-3 s pulses for 20 min.	1.- 55.0	-Selective method.	-Energy demanding.	1.-(Huang and others 2008)
High hydrostatic pressure	1.-Soybean. 2.-Common bean. 3.-Peas.	1.-550 MPa, 65 °C for 15 min (previous treatment with 0.5% sodium bicarbonate). 2.-600 MPa and 60 °C for 60 min 3.-600 MPa at 60 °C.	1.- 76.0 5.- 84.0 3.- 100	-Extends shelf-life. -Preserves and improves organoleptic characteristics. -Reduces phytic acid and lectin content. -No time consuming. -Maintenance of heat-labile compounds.	-For a high effectiveness, it requires to be combined with other methods.	1.- (Guerrero-Beltrán and others 2009) 2.-(Linsberger-Martin and others 2013) 3.-(Linsberger-Martin and others 2013)
Instant controlled pressure drop	1.-Soybean. 2.-Lentil. 3.-Chickpea. 4.-Roasted peanut.	1.-Moistened seeds at 7 bar for 1 min and 6 min; moistened seeds at 6 bar for 1 min.	1.- 94.8 and 98.6; 99.7 2.- 95.9 3.- 97.4 4.- 77.3	-Reduces phytic acid and lectin content. -It is possible to process whole legume seeds.	-Reduces inositol content.	1.-(Haddad and Allaf 2007; Pedrosa and others 2012) 2.-(Pedrosa and others 2012)

		2.-Moistened seeds at 3 bar for 3 min. 3.-Moistened seeds at 6 bar for 1 min. 4.-Moistened seeds at 6 bar for 3 min.		-Shortest processing time.		3.-(Pedrosa and others 2012) 4.-(Pedrosa and others 2012)	and and
Infrared irradiation	1.-Soybean.	1.-1342 W for 25 min (with a previous 45 min soaking process).	1.- 95.0	-Energy saving, comparing with other thermal treatments. -Efficient. -Reduce cooking time and provides a seed softer texture.	-Solubility loss.	1.-(Yalsin Basman 2015)	and
Gamma irradiation	1.-Soybean.	1.-8 kGy; 5 kGy.	1.- 38.7; 63.2	-Enhance isoflavone, phenol, and anthocyanin content.	-Vitamin C reduction.	1.-(De Toledo and others 2007; Dixit and others 2011)	
Soaking	1.-Soybean. 2.-Cowpea. 3.-Common bean. 4.-Pea. 5.-Lupine.	1.- 96 h 2.- 22 h at room temperature and a ratio 1:5 (w/v). 3.- 22 h at room temperature and a ratio 1:5 (w/v). 4.- 22 h at room temperature and a ratio 1:5 (w/v). 5.- 96 h.	1.- 35.0 2.- 18.2 3.- 19.4 4.- 19.8 5.- TIA increased 22.3	-Simple and cost-effective.	-Time consuming. -Losses of water-soluble proteins and other components such as minerals.	1.- (Mumba and others 2004) 2.- (Khattab and Arntfield 2009) 3.-(Khattab and Arntfield 2009) 4.-(Khattab and Arntfield 2009) 5.-(Embaby 2010b)	and and and and
Reducing agents	1.-Soybean.	1.- Sodium metabisulfite 0.1M at 65 °C for 2 h; tris (2-carboxietil)-phosphine at 40 °C for 60-90 min.	1.- >94.0; 100	-It does not require high temperatures (less energy demanding).	-If not processed correctly, chemical substances can remain in any final product.	1.-(Sessa and others 1988; Tetenbaum and Miller 2001)	

Apéndice

Acids and bases	1.-Soybean.	1.- NaOH 1% at 74 °C for 15min; NH ₄ OH 1% at 74 °C for 15 min.	1.- 63.0; 100	-Decreases the required TIs inactivation temperature.	-If not processed correctly, chemical substances can remain in any final product.	1.-(Baker and Mustakas 1973)
Functionalized copolymer	1.- Soybean	1.- Allyl glycidyl ether-ethylene glycol dimethacrylate functionalized with amines (dibenzyl amino).	1.-22.5 a 27 mg of TIs/g of copolymer ³	-No energy demanding. -The copolymer can be reused 10 times.	-No toxicological tests have been performed.	1.- (Jasti and others 2015)
Germination	1.-Black gram. 2.-Chickpea. 3.-Common beans. 4.-Pigeon beans.	1.-3 d at 25 °C. 2.-3 d at 25 °C in the dark. 3.-5 d at 25 °C in the dark. 4.-5 d at 25 °C in the dark.	1.- 88.2 2.- 34.0 3.- 25.0-52.0 4.- 19.2	-No energy demanding. -Improves natural compounds content. -Eliminates undesirable taste (reduces lipoxygenase content). -Improves ascorbic acid content. -Reduces blood cell agglutinating compounds (hemagglutinin). -Improves protein digestibility. -Reduces saponins and phytic acid content. -Increase protein content.	-Time consuming. -Usually, inactivation yields are low.	1.-(Chitra and Sadasivan 1986) 2.-(El-Adawy 2002) 3.-(Sangronis and Machado 2007) 4.-(Sangronis and Machado 2007)

Fermentation	1.-Common beans.	1.- <i>Lactobacillus fermentum</i> at 37 °C for 3 d.	1.- 38.0	-Increase fiber content.		
	2.-Soybean.	2.- <i>Aspergillus oryzae</i> for 5 d; <i>Lactobacillus plantarum</i> for 5 d; <i>Lactobacillus acidophilus</i> for 2 d; <i>Lactobacillus plantarum</i> for 2 d; <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> for 2 d; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> for 2 d.	2.- 89.2; 99.2; 82.6; 88.9; 95.9; 73.8	-Fat content is reduced. -It decreases phytic acid content. -Scalable process. -Does not require excessive energy output. .	-Time consuming.	1.-(Barampama and Simard 1994) 2.-(Gao and others 2013; Adeyemo and Onilude 2013; Chi and Cho 2016)

¹Raffinose, stachyose, and verbascose are considered antinutritional compounds since they cause flatulence and affect the activity of digestive enzymes; nevertheless, some researchers classify them as soluble fiber since they serve as a substrate for intestinal microbiota.

²Tannins are considered as antinutritional compounds since they bind to enzymes, proteins, polysaccharides, nucleic acids, steroids, and saponins, and form complexes with iron, affecting nutrient digestion. Some researchers consider them as nutraceutical compounds since they possess antioxidant properties and reduce cholesterol absorption. ³This value is the only one not presented as a percentage given the information generated by the corresponding authors.

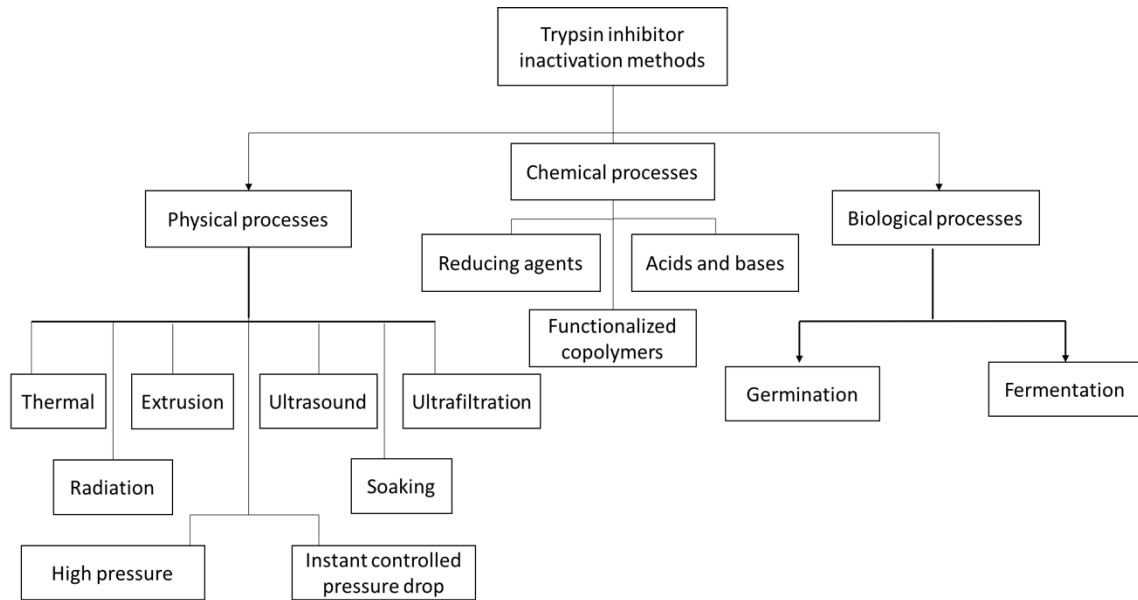


Figure 1. Classification of trypsin inhibitor inactivation (TIA) methods.

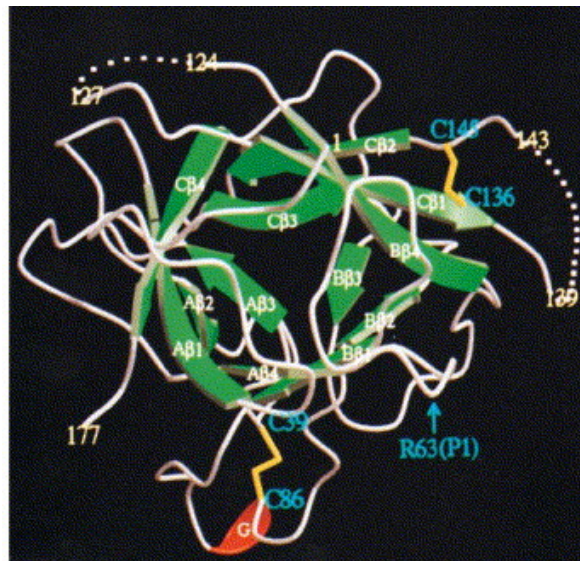


Figure 2. Overall fold of Kunitz Type soybean Trypsin Inhibitor (KTI) obtained by X-ray diffraction at 2.3 Å by Song and Suh (1998).

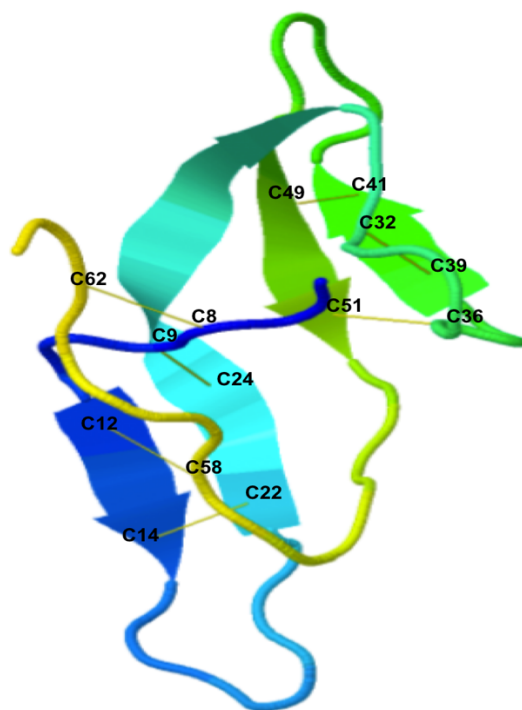


Figure 3. Representation of soybean Bowman-Birk Trypsin Inhibitor (BBTI) obtained by X-ray diffraction at 2.8 Å [Brookhaven Protein Data Bank (Voss and others, 1996)].

Ponencia en Congreso Internacional

May it be known that

Sara Avilés-Gaxiola

Attended and presented at the 2016 AACCI Annual Meeting
in Savannah, Georgia, USA, October 23 – 26, 2016.

A handwritten signature in black ink that reads "Lydia T. Midness".

Lydia Tooker Midness, President

A light gray, rounded rectangular bar located at the bottom of the page.

Currículim Vítae

Sara Avilés Gaxiola nació en Sinaloa, México, el 08 de septiembre de 1992. En diciembre de 2015, obtuvo e título de Ingeniera en Biotecnología en el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Monterrey. En enero de 2016 fue aceptada en el programa de posgrado en ciencias con Especialidad en Biotecnología en el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Monterrey, trabajando bajo la supervisión de la Dra. Cristina Elizabeth Chuck Hernández.