

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**“Efecto del tiempo de germinación sobre el perfil proteico,
digestibilidad y propiedades funcionales en harinas de *Lupinus
angustifolius*”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

P R E S E N T A:

Q. A. CIRO BARUCHS MUÑOZ LLANDES

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. APOLONIO VARGAS TORRES**

**CO-DIRECTORA DE TESIS:
DRA. FABIOLA ARACELI GUZMÁN ORTIZ**

TULANCINGO DE BRAVO, AGOSTO, 2020



COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos
Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: "Efecto del tiempo de germinación sobre el perfil proteico, digestibilidad y propiedades funcionales en harinas de *lupinus angustifolius* germinados", que desarrolla el estudiante **Ciro Baruchs Muñoz Llandes**

Asistentes:

Dr. Apolonio Vargas Torres

Dra. Fabiola Araceli Guzmán Ortiz

Dra. Heidi María Palma Rodríguez

Dra. Alma Delia Román Gutiérrez

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por el estudiante, comunicando a el estudiante, **Ciro Baruchs Muñoz Llandes**, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. El estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que el estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 2 de septiembre de 2020

Dr. Apolonio Vargas Torres

Dra. Fabiola Araceli Guzmán Ortiz

Dra. Heidi María Palma Rodríguez

Dra. Alma Delia Román Gutiérrez





El presente trabajo se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. Apolonio Vargas Torres y Co-dirección de la Dra. Fabiola Araceli Guzmán Ortiz.



Este trabajo de investigación se realizó con el apoyo del proyecto de cátedras CONACYT 1232 de “Nuevos productos innovadores que impacten a la salud del consumidor y a la industria alimentaria”

No es grande el que siempre triunfa, sino el que jamás se desalienta
(José Luis Martín Descalzo)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primero a Dios, por darme salud para salir adelante y triunfar en cada propósito que tengo, en este camino llamado vida.

Agradezco a mis padres por la vida, gracias por apoyar cada decisión y por sus palabras de aliento para continuar día con día. Gracias a mis hermanos por las enseñanzas aprendidas.

Gracias Dra. Faby por creer en mí, y ver cualidades en mí persona para realizar investigación, gracias por la confianza, pero sobre todo gracias por el apoyo que me ha brindado siempre, estaré eternamente agradecido con usted por todas las enseñanzas, experiencia y conocimiento que me transmite, gracias por motivarme a seguir creciendo de manera profesional, gracias por inspirarme y alentarme a continuar para nunca rendirme, gracias porque me hizo creer, que soy capaz de realizar todo lo que me proponga.

Gracias también a mi director el Dr. Polo, por los buenos consejos y motivaciones, gracias a los sinodales e integrantes de mi comité evaluador por tomarse el tiempo y contribuir al desarrollo de este producto de investigación, gracias por las críticas constructivas que contribuyen a la mejora del trabajo, pero sobre todo al crecimiento profesional.

Agradezco a cada uno de mis profesores, que compartieron el aula y conocimiento, para formar recursos humanos capaces de fomentar el cambio, y lograr un mundo mejor.

Gracias a mis compañeros, amigos y amigas que compartimos juntos esta divertida aventura, gracias por sus palabras de aliento, me llevo lo mejor de cada uno de ustedes. Gracias a mi mejor amigo por apoyarme en todo momento a pesar de las discusiones y dificultades sin tu apoyo todo lo logrado no sería posible.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de maestría otorgada

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. MARCO TEÓRICO	12
2.1 Descripción y características de las leguminosas	12
2.2 Importancia de las leguminosas	15
2.3 Calidad proteica de las leguminosas.....	16
2.4 <i>Lupinus angustifolius</i>	18
2.4.1 Potencial nutraceutico de las semillas de <i>Lupinus angustifolius</i>	19
2.4.2 Composición nutricional	20
2.5 Germinación de granos y semillas	21
2.5.1 Movilización de las reservas	23
2.6 Influencia de la germinación en la composición nutricional de harinas de leguminosas	25
2.6.1 Efecto en carbohidratos.....	26
2.6.2 Efecto en fibra	27
2.6.3 Efecto en lípidos.....	28
2.6.4 Efecto en proteínas	28
2.6.5 Efecto en otros compuestos de interés	29
2.7 Influencia de la germinación sobre compuestos antinutricionales presentes en harinas de leguminosas	30
2.7.1 Ácido Fítico	31
2.7.1.1 Interacciones y efecto fisiológico	32
2.7.1.2 Efectos nocivos.....	33
2.7.1.3 Efectos benéficos	34
2.7.1.4 Cambios en la concentración por efecto de la germinación	36
2.7.2 Inhibidores de proteasas	39
2.7.2.1 Clasificación	40
2.7.2.2 Efecto fisiológico	42
2.7.2.3 Efectos nocivos.....	43
2.7.2.4 Efectos benéficos	44
2.7.2.5 Cambios en la concentración por efecto de la germinación	45

2.8 <i>Influencia de la germinación en las propiedades tecnofuncionales de harinas de leguminosas</i>	46
3. OBJETIVOS	49
3.1 <i>Objetivo general</i>	49
3.2 <i>Objetivo específicos</i>	49
4. MATERIALES Y MÉTODOS	50
4.1 <i>Germinación y secado del grano</i>	50
4.2 <i>Obtención de las diferentes harinas de <i>Lupinus angustifolius</i> germinado</i>	50
4.2.1 <i>Determinación de nitrógeno total</i>	50
4.2.2 <i>Desgrasado de las harinas obtenidas</i>	51
4.3 <i>Perfil electroforético de las harinas obtenidas</i>	51
4.4 <i>Evaluación de las propiedades tecnofuncionales de las harinas obtenidas</i>	52
4.4.1 <i>Capacidad de absorción de agua</i>	52
4.4.2 <i>Capacidad de absorción de aceite</i>	52
4.4.3 <i>Capacidad de formación de espuma</i>	53
4.4.4 <i>Estabilidad de la espuma</i>	53
4.4.5 <i>Densidad aparente</i>	54
4.4.6 <i>Capacidad emulsionante</i>	54
4.4.7 <i>Capacidad de hinchamiento</i>	55
4.5 <i>Digestibilidad proteica</i>	55
4.6 <i>Cuantificación de fitatos</i>	56
4.7 <i>Cuantificación de inhibidores de tripsina</i>	57
4.8 <i>Análisis Estadístico</i>	58
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	59
5.1 <i>Determinación de nitrógeno total de las diferentes harinas</i>	59
5.2 <i>Perfil electroforético</i>	62
5.3 <i>Evaluación de las propiedades tecnofuncionales de las harinas</i>	65
5.3.1 <i>Capacidad de absorción de agua (CAA) y aceite (CAAc)</i>	65
5.3.2 <i>Capacidad de formación de espuma (CFE) y estabilidad de la espuma</i>	68
5.3.3 <i>Densidad aparente (DA)</i>	72
5.3.4 <i>Capacidad emulsionante y estabilidad de la emulsión</i>	75

5.3.5 <i>Capacidad de hinchamiento (CH)</i>	78
5.4 <i>Digestibilidad de las harinas</i>	80
5.5 <i>Determinación de fitatos</i>	82
5.6 <i>Cuantificación de inhibidores de tripsina</i>	85
6. CONCLUSIONES	87
7. PERSPECTIVAS	88
8. REFERENCIAS	89
9. ANEXOS	120

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

ILUSTRACIÓN 1. PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LAS HARINAS ANALIZADAS, EL PRIMER CARRIL DE IZQUIERDA A DERECHA INDICA EL MARCADOR DE PESO MOLECULAR, LÍNEA 0 MUESTRA SIN GERMINAR, LÍNEA 2-7: MUESTRAS GERMINADAS DE 2 A 7 DÍAS.....	63
ILUSTRACIÓN 2. ESTABILIDAD DE LA ESPUMA DE LUPINUS ANGUSTIFOLIUS GERMINADO Y SIN GERMINAR	71

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE SEMILLA DE *LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* 20

TABLA 2. CONTENIDO PROTÉICO DE *LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* GERMINADO Y SIN GERMINAR 61

TABLA 3. CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE AGUA Y ACEITE DE *LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* GERMINADO Y SIN GERMINAR 67

TABLA 4. CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE ESPUMA (CFE) DE *LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* GERMINADO Y SIN GERMINAR 69

TABLA 5. DENSIDAD APARENTE *LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* GERMINADO Y SIN GERMINAR 74

TABLA 6. PROPIEDADES DE EMULSIFICACIÓN DE *LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* GERMINADO Y SIN GERMINAR 77

TABLA 7. CAPACIDAD DE HINCHAMIENTO DE *LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* GERMINADO Y SIN GERMINAR 79

TABLA 8. DIGESTIBILIDAD PROTEICA DE *LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* GERMINADO Y SIN GERMINAR 81

TABLA 9. CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO FÍTICO EN *LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* GERMINADO Y SIN GERMINAR 84

TABLA 10. UNIDADES INHIBIDORAS DE TRIPSINA EN *LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* GERMINADO Y SIN GERMINAR 86

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el perfil proteico, propiedades funcionales, digestibilidad proteica, concentración de ácido fítico y la actividad inhibidora de tripsina, esta última por su influencia en la digestibilidad proteica en harinas de *Lupinus angustifolius* L. germinado. Las semillas se germinaron a 26 ° C durante 2-7 días. La muestra no germinada se utilizó como control. *Lupinus angustifolius* L. no germinado mostró un contenido proteico inicial de 24.06% que se incrementó (31.33%) al día 3 de germinación. Las subunidades proteicas de γ -conglutina se hidrolizaron durante la germinación y las subunidades de δ -conglutina aumentaron en intensidad en gel de poliacrilamida. En las propiedades funcionales, la densidad aparente disminuyó desde el día 3 de germinación al 28%. Mientras que la absorción de agua y el poder de hinchamiento aumentaron 75 y 95.9% respectivamente. La capacidad de absorción de aceite, la formación de espuma, la actividad emulsionante y la estabilidad aumentaron un 138, 36.14, 93 y 113% respectivamente al día 7 de germinación. La estabilidad de la formación de espuma fue más estable el día 5 de germinación en comparación con los días 3 y 7 de germinación y la muestra sin germinar. Por otro lado, la digestibilidad de las proteínas se mantuvo sin cambios después de la germinación debido a la presencia de compuestos antinutricionales como el ácido fítico. La actividad de los inhibidores de tripsina disminuyó al 97% después de 7 días de germinación. La germinación es un bioproceso que modifica las propiedades funcionales y mejora el valor nutricional. Las modificaciones creadas en las semillas germinadas pueden actuar como coadyuvante en el uso alternativo de harinas de *Lupinus angustifolius* L. en la industria alimentaria

1. INTRODUCCIÓN

La germinación es una técnica eficaz, económica y sencilla que involucra cambios metabólicos importantes permitiendo mejorar la calidad nutricional, biológica y tecnofuncional de las harinas obtenidas a partir de la germinación en comparación a las semillas sin germinar (Vidal-Valverde *et al.*, 2002). Durante la germinación se activan enzimas hidrolíticas, de tal manera que algunos de los nutrientes de reserva se degradan para ser utilizados durante la respiración, o en la síntesis de nuevos compuestos celulares del embrión que está en desarrollo, generando cambios importantes en las leguminosas tratadas (Sangronis & Machado 2007).

Lupinus angustifolius, es una leguminosa de interés para la industria alimentaria por su elevado contenido proteico, bajo contenido en grasa y almidón, sin embargo; su aprovechamiento se encuentra limitado por la presencia de compuestos antinutricionales, así como una baja disponibilidad y digestibilidad de nutrientes (Rumiyati *et al.*, 2012). Se ha reportado que el proceso de germinación genera un aumento significativo en el contenido de proteína total en semillas de *Lupinus angustifolius*, aunado a una hidrólisis proteica por efecto de la germinación, generando péptidos de bajo peso molecular con posible efecto biológico (Gulewicz *et al.*, 2008). También se ha evidenciado un aumento significativo en la capacidad antioxidante de las semillas de *Lupinus* debido a un incremento en el contenido de vitamina E, C y tocoferoles. (Fernández-Orozco *et al.*, 2006). Estudios in vivo han demostrado que la proteína de *Lupinus* es un ingrediente de calidad, por lo tanto, las harinas obtenidas a partir de las mismas podrían ser utilizadas en la industria alimentaria para el desarrollo de alimentos funcionales con diversos beneficios a la salud humana, sin embargo, caracterizar las harinas es de interés para determinar su posible uso como ingrediente o aditivo alimentario (Kasprowicz-Potocka *et al.*,

2013). Las harinas de *Lupinus angustifolius* germinado podrían tener características estructurales, fisicoquímicas y funcionales deseables o mejoradas en comparación a las harinas obtenidas de leguminosas convencionales. La evaluación de las propiedades tecno-funcionales en *Lupinus* no ha sido reportado y esto proporcionaría información sobre las ventajas o desventajas de su uso para su incorporación en el desarrollo de alimentos, así como evidenciar un posible comportamiento durante el desarrollo, innovación y almacenamiento del producto final (Ahmad & Pathak 2000). Obtener harinas con elevadas propiedades emulsificantes permitiría su incorporación en procesos industriales, debido a una elevada capacidad de adhesión por efecto de la reducción en la tensión de la interfase agua y aceite, por otra parte, tener una proteína de calidad, altamente soluble en agua y flexible permite obtener propiedades de hidratación y formación de espuma deseables gracias a la formación de una película cohesiva en la interfaz agua-aire (Cano-Medina *et al.*, 2011). Debido a que la germinación tiene la capacidad de modificar la estructura y concentración de los nutrientes de las leguminosas, podrían también modificarse las propiedades funcionales dependiendo las condiciones del proceso de germinación, por lo tanto, el objetivo fue evaluar el perfil electroforético, las propiedades funcionales, digestibilidad de la proteína, concentración de inhibidores de tripsina y ácido fítico en harinas de *Lupinus angustifolius* sometido a un proceso de germinación.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Descripción y características de las leguminosas

La palabra leguminosa proviene del latín *legumen* que significa fruto alargado o en espiral (fruto en “legumbre” o “vaina”) que contiene varias semillas dispuestas en fila constituyendo el fruto o legumbre (López Amóros, 2000).

Sus semillas maduras se emplean en alimentación principalmente por su elevado contenido proteico (17-30%). Esta familia comprende unos 600 géneros y 13.000 especies, de las cuales unas 200 son de consumo humano y animal (Moreno, 1983; Torija & Díez, 1999). Se clasifican en dos grupos en función de su contenido lipídico, diferenciándose así las leguminosas oleaginosas (soja y cacahuete) con unos niveles de grasa elevados: 20-50% y las legumbres secas o leguminosas grano (judía, haba, guisante, garbanzo, lenteja, altramuz) con un contenido en grasa muy inferior: 1-7% (Torija & Díez, 1999).

Las leguminosas, desde el punto de vista botánico, pertenecen a la familia *Fabaceae*, cuyas especies presentan la característica común de producir vainas. Las *Fabaceas* se dividen en tres subfamilias, siendo la *Papilionoideae* la más amplia y prácticamente la única cuyas especies se cultivan para el consumo humano (López Amóros, 2000). De las más de 18.000 especies conocidas, y de todas las que son cultivadas, sólo se producen 20 tipos distintos y que se utilizan como alimento para el ser humano en los diferentes continentes, destacando las semillas de soja (*Glycine max* L.), cacahuete (*Arachis hypogaea* L.), judías (entre las que se encuentran diversas especies del género *Phaseolus*), guisantes (*Pisum sativum* L.), garbanzos (*Cicer arietinum* L.) y lentejas (*Lens culinaris* Medik) (Zulet & Martínez, 2001).

Las semillas de las leguminosas se diferencian por el color, forma, tamaño y grosor del tegumento (testa), pero la mayoría de éstas tienen una estructura similar,

y cuando madura tienen tres partes estructurales principales: cubierta, cotiledón y embrión. La composición química de las semillas está determinada genéticamente, pero las cantidades relativas pueden variar en función de factores ambientales como la presencia de nutrientes minerales en el suelo o el clima. Sin embargo, la composición de las leguminosas varía considerablemente entre las distintas especies, e incluso entre variedades dentro de una misma especie (McCance & Winddson, 2014).

La composición nutricional media de las leguminosas destaca por la fracción de almidón y proteína como las más abundantes respecto al total de los componentes. El valor nutritivo de las leguminosas se debe primeramente a su contenido proteico, a la vez que son fuente importante de carbohidratos complejos, algunos de absorción lenta como el almidón y otros no digeribles como los componentes de la fibra alimentaria, cuyos efectos beneficiosos son debidos principalmente a sus propiedades físico-químicas. Por otro lado, presentan un bajo contenido en lípidos, excepto en el caso de semillas oleaginosas, estando mayoritariamente constituidos por ácidos grasos poliinsaturados (Zulet & Martínez, 2001). Presentan también algunos componentes bioactivos minoritarios, y son una importante fuente de minerales (calcio, hierro, cinc) y vitaminas (Rege, 1981). Son las fracciones mayoritarias las que tendrán un mayor peso en las propiedades tecnofuncionales de las harinas de leguminosas como el almidón y otros no digeribles como los componentes de la fibra alimentaria, cuyos efectos beneficiosos son debidos principalmente a sus propiedades físico-químicas. Por otro lado, presentan un bajo contenido en lípidos, excepto en el caso de semillas oleaginosas, estando mayoritariamente constituidos por ácidos grasos poliinsaturados (Zulet & Martínez, 2001). Presentan también algunos componentes bioactivos minoritarios, y son una importante fuente de minerales (calcio, hierro, cinc) y vitaminas (Rege, 1981). Son las fracciones mayoritarias las que tendrán un mayor peso en las propiedades tecnofuncionales de las harinas de leguminosas.

Además de los componentes mayoritarios como proteínas, carbohidratos y fibra, las leguminosas contienen numerosos compuestos bioactivos, presentes en pequeñas cantidades, pero que pueden tener efectos metabólicos y fisiológicos de interés. Algunos de estos componentes (fitatos, galactooligosacáridos, inhibidores de proteasas, lectinas, saponinas, etc.) se han clasificado como factores antinutricionales, pero en numerosos estudios se ha reconsiderado el impacto beneficioso que pueden tener en la salud, por lo que actualmente se les considera compuestos bioactivos. Algunos de ellos pueden tener un papel en la prevención de enfermedades como trastornos cardiovasculares, diabetes y cáncer (Champ, 2002; Duranti, 2006).

Los contenidos minerales de las leguminosas son altos en general, pero de biodisponibilidad baja debido a que se unen a los fitatos, compuestos que constituyen el principal inhibidor de la absorción de hierro y zinc. Algunas leguminosas tienen además contenidos importantes de polifenoles que inhiben la absorción de hierro. La deficiencia nutricional de hierro alcanza su máxima prevalencia en poblaciones con dietas a base de cereales y legumbres, pero la situación mejora sensiblemente con la adición de proteína animal o por eliminación de los fitatos y degradación de los polifenoles, en cuyo caso las legumbres pueden ser buenas fuentes de hierro y zinc por sus contenidos elevados de estos minerales (Sandberg, 2002).

2.2 Importancia de las leguminosas

Las leguminosas tienen importancia desde el punto de vista agrícola debido a la superficie mundial que se dedica a su cultivo y por su capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico por la simbiosis con la bacteria *Rhizobium* del suelo, lo que permite elevar la fertilidad del sustrato, reemplazando parcialmente el uso de fertilizantes nitrogenado. Las leguminosas, que pueden ser utilizadas en la alimentación humana y animal, revisten una especial importancia nutritiva y económica debido a su presencia en la nutrición de millones de personas de todo el mundo (FAO, 2003). Desde la más remota antigüedad, las leguminosas han sido utilizadas por la humanidad, tornándose alimentos esenciales y de consumo diario o semanal en la mayor parte del mundo. Estos alimentos presentan beneficios significativos para la nutrición humana y para la salud cuando se consumen con regularidad en dietas bien equilibradas, provocando una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes entre otras (Mazur *et al.*, 1998; Zulet & Martínez, 2001).

La utilización de las leguminosas como alimentos se concentra en los países en desarrollo, que representan el 90% del consumo mundial de legumbres destinadas a alimentación humana. Las leguminosas presentan una importancia especial para los países de bajo desarrollo y con déficit de alimentos, cuyas principales fuentes de proteínas y energía son los productos de origen no animal contribuyendo al 10% de las proteínas diarias recomendadas y a un 5% del aporte energético de la población. Alrededor del 75% de las leguminosas en estos países se destina al consumo humano, mientras que el uso como pienso representa menos del 15% (FAO, 2010).

En los países industrializados se ha observado un incremento en el consumo per cápita de leguminosas, lo que se atribuye a la conciencia sobre los beneficios para la

salud. En este sentido las legumbres constituyen una excelente alternativa y ofrecen la ventaja adicional de un buen aporte de fibra. Otro factor que puede haber contribuido al incremento de su consumo es la inmigración, que ha aumentado de forma espectacular en el periodo de estudio (FAO, 2005). El consumo de leguminosas es menor en Europa que en otras regiones del mundo y muestra una amplia variabilidad, debido a las diferencias interregionales en los hábitos alimentarios y las tradiciones, así como a diferencias en el aprovisionamiento. Se ha reportado que España, Francia y Reino Unido consumen un 60% del total de leguminosas en Europa (Shneider, 2002).

La industria alimentaria está continuamente adquiriendo nuevas tecnologías e ingredientes para generar nuevos alimentos o bien mejorar propiedades organolépticas, funcionales y nutritivas ya existentes. Las leguminosas han sido empleadas, en función de su composición, de forma directa como ingredientes en las dietas o piensos para animales y, alternativamente, en la obtención de aceites vegetales, así como la preparación de concentrados de proteína y la formulación de alimentos funcionales con múltiples efectos biológicos.

2.3 Calidad proteica de las leguminosas

El elevado contenido proteico en la mayoría de las especies de leguminosas convierte a esta familia en la principal fuente de proteína vegetal para el hombre (Cubero & Moreno, 1983). El porcentaje medio de contenido en las leguminosas se sitúa entre el 20-25%, encontrándose valores de hasta un 40% en el caso del altramuza. La mayoría de estas (80%) se encuentra en forma de proteínas de almacenamiento, principalmente globulinas (Rubio *et al.*, 2004).

La digestibilidad y el valor biológico de las proteínas de leguminosas si se compara con las de origen animal resulta algo inferior (Belitz & Grosh, 1997). Sin embargo, en el caso del garbanzo el contenido de cisteína y metionina es bastante superior al del resto de legumbres, lo que en parte explica la mejor calidad proteica del garbanzo respecto a las demás leguminosas.

Las leguminosas presentan baja digestibilidad proteica debido especialmente a (1) deficiencia de aminoácidos azufrados (principalmente metionina), (2) naturaleza compacta de las proteínas de reserva mayoritarias, (3) presencia de anti nutrientes como inhibidores enzimáticos (inhibidores de tripsina y quimotripsina), lectinas y ácido fítico, (4) impedimento estérico de los azúcares que están presentes en la mayoría de las proteínas de reserva (glicoproteínas), (5) presencia de compuestos fenólicos, que establecen uniones con las proteínas (enzimas digestivas incluidas) afectando al grado de proteólisis, (6) presencia de minerales, mediadores entre las interacciones de fitatos y proteínas, formando complejos proteína-fitato-mineral resistentes a la proteólisis, (7) interacciones proteína-proteína: las proteínas solubles en agua (fracción de albúminas) interaccionan con las proteínas de reserva, provocando un descenso de la velocidad de proteólisis, (8) baja digestibilidad de las proteínas solubles en agua, y finalmente (9) debido al descenso de la actividad proteolítica por interferencias físicas como consecuencia de la presencia de fibra alimentaria (Aguilera, 2009).

Las alergias relacionadas con el consumo de leguminosas son poco comunes en humanos, debido a la baja capacidad alergénica de las proteínas de almacenamiento (Lallés & Peltre, 1996). Asimismo, estudios referentes a modificaciones proteolíticas y enriquecimientos con metionina procedentes de proteína de soja, revelan una reducción de la alergia y una mejora en el valor alimentario del producto derivado de soja (Hajós *et al.*, 1996).

Se les ha atribuido a las proteínas de leguminosas propiedades nutraceuticas, por sus efectos beneficiosos en la salud, principalmente su papel protector frente a determinadas enfermedades (Duranti, 2006). Existen algunos estudios que relacionan fracciones específicas de proteínas, con la reducción del colesterol en sangre y los niveles de triglicéridos (Fukui *et al.*, 2002). Además las proteínas de leguminosas se han visto asociadas a la reducción del riesgo cardiovascular como es el caso de la soja (Anderson & Major, 2002), a un efecto anticarcinogénico como consecuencia de la presencia de lectinas e inhibidores de proteasa en distintas leguminosas (Clemente *et al.*, 2004), a la prevención de obesidad y diabetes debido a la acción del inhibidor de amilasa (Suzuki *et al.*, 2003; Muri *et al.*, 2004; Oneda *et al.*, 2004) y a una capacidad de transporte de minerales que mejoran su absorción, en lupino, por la presencia de aconglutina (Duranti *et al.*, 2001). Dentro de las leguminosas con mayor contenido de proteína y de interés para la industria alimentaria se encuentra el *Lupinus angustifolius*.

2.4 *Lupinus angustifolius*

El altramuz azul (*Lupinus angustifolius*) es una planta herbácea anual, una de las pocas especies cultivadas del género *Lupinus*, cuyo fruto se aprovecha como alimento, siendo un aperitivo típico de la región mediterránea. Los altramuces son cultivos de leguminosas, caracterizados por su alto contenido de proteína en la semilla, y se cultivan en todo el mundo en más de un millón de hectáreas, presentando una amplia gama de usos y aplicaciones dentro de la industria alimentaria (Erbas, Certel, & Uslu, 2005).

Una amplia gama de semillas de leguminosas ha sido utilizada para la producción de alimentos funcionales, entre los que se destacan las semillas de

Lupinus debido a su exclusiva composición química y gran diversidad en funciones biológicas como diurético, antidiabético, hipoglucémico, hipocolesterolémico etc. (Linnemann & Dijkstra, 2002).

2.4.1 Potencial nutracéutico de las semillas de *Lupinus angustifolius*

El efecto nutracéutico y funcionalidad biológica de la semilla radica principalmente en la proteína que esta contiene, se ha reportado que el efecto benéfico en la salud humana depende directamente de la concentración y estructura en que se encuentre dicha proteína (Pastor-Cavada, Juan, Pastor, Alaiz, & Vioque, 2009).

Lupinus angustifolius ha demostrado alcanzar valores de hasta el 40% de proteína bruta, siendo una de las leguminosas con mayor contenido proteico al igual que la soya. Dicha proteína se encuentra en forma de almacenamiento en la semilla la cual será la fuente de aminoácidos requeridos para el crecimiento y desarrollo de la plántula (Duranti, Consonni, Magni, Sessa, & Scarafoni, 2008).

Estudios realizados a finales del siglo XX demostraron que la ingesta de numerosas leguminosas tiene un efecto benéfico en la salud humana, principalmente un efecto hipocolesterolémico. La Administración de Drogas y Alimentos aprobó una declaración donde se establecen las propiedades saludables de las proteínas de soya, resaltando principalmente su potencial de reducción de colesterol (Wang & De Mejia, 2005). En este contexto, se establece un interés en analizar otras leguminosas, por ejemplo, *Lupinus angustifolius*, con la finalidad de aumentar el tratamiento y prevención de la hipercolesterolemia; se han hecho nuevos descubrimientos en las últimas décadas con respecto a la funcionalidad de las proteínas de *Lupinus* (Duranti *et al.*, 2008)

Diversos estudios han demostrado que las proteínas de las semillas de *Lupinus* podría disminuir y prevenir la obesidad, así como el riesgo de enfermedades cardiovasculares a través de un efecto significativo al poder reducir niveles de colesterol e inhibir la formación de tejido adiposo (Duranti & Morazzoni, 2011).

2.4.2 *Composición nutricional*

Como se observa en la Tabla 1, *Lupinus angustifolius* es de interés nutricional, científico e industrial, principalmente por su alto aporte proteico, el cual lo convierte en una buena fuente de proteína de origen vegetal. Su contenido en minerales es alto, destacando su aporte en hierro (7,6 mg) y en calcio (180 mg) por cada 100g de semilla. También aporta zinc, potasio, fósforo, magnesio, vitaminas del grupo B y vitamina E. Aunque el aporte de lípidos es alto, se debe considerar que contiene principalmente ácidos grasos, cuyo aporte también es beneficioso para la salud del consumidor (Sujak, Kotlarz, & Strobel, 2006).

Tabla 1. Composición nutricional de semilla de Lupinus angustifolius

Nutriente	%
Proteínas	39
Hidratos de Carbono	24
Lípidos	15
Fibra	24

(Sujak, Kotlarz, & Strobel, 2006)

Por otra parte, la semilla de *Lupinus angustifolius* contiene compuestos antinutricionales, como las serino y sulfhidril proteinasas las cuales son inhibidores de proteasas. También contienen ciertos alcaloides (esparteína, lupinina, ácido lupínico y lupanina) los cuales son responsables de proporcionar un sabor ligeramente amargo, dichos compuestos deben ser eliminados por que podrían generar una intoxicación del sistema nervioso denominada latirismo. Este riesgo

desaparece totalmente si se somete la semilla a diversos procesos como la germinación (Khan, Karnpanit, Nasar-Abbas, Huma, & Jayasena, 2015).

2.5 Germinación de granos y semillas

La germinación de la semilla comprende una serie de procesos que comienzan con la imbibición de agua y culminan con la emergencia de la plántula a través de las cubiertas. La absorción de agua por la semilla desencadena una secuencia de cambios metabólicos, que incluyen la activación del proceso respiratorio, la síntesis proteica y la movilización de las reservas. A su vez la división y alargamiento celular en el embrión produce la rotura de las cubiertas de las semillas, que generalmente es ocasionada por la emergencia de la radícula (Rosental *et al.*, 2014).

El primer proceso que tiene lugar durante la germinación es la toma de agua por la semilla: fase de imbibición. La magnitud de esta fase está determinada por tres factores: composición química de la semilla, permeabilidad de la envuelta seminal y disponibilidad de agua en el medio. La fase de absorción de agua provoca alteraciones temporales en la permeabilidad diferencial de las membranas de la semilla y, por consiguiente, una pérdida al medio circundante de solutos y diferentes metabolitos de bajo peso molecular (azúcares, ácidos orgánicos, iones, aminoácidos, péptidos, etc) (Azcón-Bieto & Talón, 2008).

Las semillas que almacenan almidón en sus cotiledones, como en el caso de las leguminosas, son capaces de reparar y activar las mitocondrias existentes en la semilla seca. Así pues, durante los primeros instantes de la imbibición la respiración de la semilla es fundamentalmente anaerobia, y se transforma en aerobia a medida que la radícula o el eje embrionario atraviesan los tejidos envolventes y la cubierta

seminal (Bewley,1997). Por otra parte, todos los componentes están presentes en la semilla seca viable, y a los pocos minutos de comenzar la imbibición, empieza la desaparición de los ribosomas. La entrada de agua en el interior de la semilla se debe exclusivamente a una diferencia de potencial hídrico. La entrada de agua en la semilla rehidrata las reservas alimenticias, que sólo pueden transformarse en sustancias disponibles al embrión en presencia de agua, como también, los sistemas enzimáticos responsables de la hidrólisis de las sustancias de reserva sólo se activan en presencia de agua.

La absorción de agua por parte de la semilla se divide en tres fases:

Fase 1 → rápida e inmediata salida de solutos y metabolitos de bajo peso molecular al medio.

Fase 2 → principales procesos metabólicos que conducen a la emergencia de la radícula.

Fase 3 → la elongación de la radícula Uno de los primeros cambios que se observan durante la imbibición es la reanudación de la actividad respiratoria.

En este sentido se observan tres rutas respiratorias, glucólisis, ciclo de las pentosas fosfato y ciclo del ácido cítrico son funcionales en las semillas imbibidas. Estas tres rutas producirán una serie de compuestos intermediarios del metabolismo vegetal, así como considerables cantidades de energía y poder reductor. La toma de oxígeno es superior en los primeros días de germinación probablemente debido a la actividad fermentativa observada en muchas semillas en estos primeros momentos de la germinación. Posteriormente se observa la rotura de la testa por parte de la radícula, lo que hace que el intercambio de bases tenga lugar sin la limitación impuesta a veces por la cubierta seminal. Finalmente, se disminuye la respiración y coincidente con la desintegración de los cotiledones, una vez que se han agotado las

reservas nutritivas, puede observarse en muchas semillas. Al iniciarse la germinación de las semillas se produce una activación de la síntesis proteica que da lugar, entre otras proteínas, a la formación de enzimas hidrolíticas que producen la movilización de las reservas (Botha *et al.*, 1992).

2.5.1 Movilización de las reservas

Las semillas contienen cantidades relativamente importantes de reservas alimenticias, que mantienen el crecimiento y el desarrollo de la plántula hasta que ésta es capaz de alimentarse por sí misma. Estas reservas se encuentran en su mayor parte, aunque no exclusivamente, formando cuerpos intracelulares que contienen lípidos, proteínas, carbohidratos y compuestos inorgánicos. En las leguminosas, por ejemplo, las reservas están localizados en los cotiledones (Azcón-Bieto & Talón, 2008). Aunque se hayan encontrado en semillas diversos polisacáridos como material de reserva, sólo el almidón ha sido extensamente estudiado en su metabolismo durante la germinación, debido a estar presente en casi todas las semillas y constituir en la mayoría de ellas la principal reserva de energía. El almidón se encuentra formando corpúsculos intracelulares denominados granos de almidón. Dichos gránulos muestran una apariencia característica en cada especie (Botha *et al.*, 1992).

En las semillas de la mayoría de las leguminosas que acumulan almidón en los cotiledones se produce un descenso en el contenido de este compuesto durante la germinación. En algunos casos, se aprecia también una acumulación de azúcares solubles en los primeros días de germinación que tiende a disminuir posteriormente. En otros casos no se detecta ningún aumento en la concentración de azúcares solubles en los cotiledones, lo que indica que se produce una rápida movilización de

los productos hacia la plántula en desarrollo. La reducción en el contenido de almidón en los cotiledones viene acompañada, generalmente, por un aumento de la actividad amilasa (Rosental *et al.*, 2014). Dos rutas catabólicas participan en la degradación del almidón. Una de ellas es hidrolítica e implica la acción de las α y β -amilasas. Actualmente se sabe que la amilasa es la única enzima capaz de atacar al gránulo de almidón nativo. La tasa de desaparición del almidón se incrementa durante la germinación. Durante los primeros días el almidón es atacado lentamente, posteriormente la degradación es rápida, y desemboca en la práctica desaparición del polisacárido, como ocurre en guisante, aunque también se dan casos como en lenteja en los que al cabo de trece días aún queda el 50% del almidón sin degradar (Dierking & Bilyeu, 2009). La movilización del almidón en los cotiledones de leguminosas se inicia después de que la radícula ha comenzado su elongación. La primera enzima que aumenta su actividad en los cotiledones es la fosforilasa, seguida algunos días después por un aumento en las amilasas. Parece, por tanto, que la degradación inicial lenta del almidón en leguminosas es consecuencia de la actividad fosforolítica. El papel de la fosforilasa durante estos primeros momentos de la germinación podría ser también el de suministrar el sustrato para la glucólisis (glucosa 1-P) sin necesidad de consumir ATP. La degradación de las proteínas de reserva se logra por la acción más o menos específica de enzimas proteolíticas cuya importancia es vital para el desarrollo de la nueva plántula. En las dicotiledóneas la degradación de las proteínas de reserva ha sido estudiada intensamente utilizando semillas de *Phaseolus vulgaris* y *Lens culinaris*. Durante la germinación de semillas de algunas leguminosas hay una degradación de las proteínas de reserva que se corresponde con una acumulación de aminoácidos libres en los cotiledones. La digestión de los cuerpos proteicos comienza en la periferia y avanza progresivamente hacia el centro de los cotiledones. El máximo de

actividad proteolítica se produce a los cinco días de germinación, que coincide con el máximo de acumulación de aminoácidos libres (Raijou *et al.*, 2012).

La emergencia radicular marca el fin de la germinación y el comienzo del crecimiento de la plántula. La señal que induce el inicio de la elongación y el mecanismo íntimo de ésta no se conoce; sin embargo, existen tres posibilidades: o acumulación de solutos osmóticos para provocar el incremento de la presión de turgencia o aumento en la extensibilidad de las paredes celulares, previo al inicio de la elongación o acción conjunta de los procesos de elongación de la radícula y relajación de los tejidos que la rodean (hidrólisis de los componentes polisacáridos de la pared celular) (Dierking & Bilyeu, 2009).

2.6 Influencia de la germinación en la composición nutricional de harinas de leguminosas

El proceso de germinación ha sido aplicado a las semillas de leguminosas, como proceso natural para obtener alimentos funcionales con mayor contenido nutricional. Entre los más importantes se encuentran las semillas germinadas de soja, y últimamente se han introducido otras variedades de leguminosas como lentejas y judías. La germinación de semillas de leguminosas es realizada extensivamente en muchos países, principalmente donde la producción de las mismas tiene mayor demanda por los consumidores (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2006).

El proceso de germinación generalmente mejora la calidad nutricional de las leguminosas, no sólo por la reducción de los componentes antinutritivos, sino también por el aumento de los niveles de aminoácidos libres, carbohidratos aprovechables, fibra alimentaria y otros componentes (Urbano *et al.*, 2005; Zielinski

et al., 2006; Martínez-Villaluenga *et al.*, 2006), simultáneamente aumenta la funcionalidad de las semillas debido al aumento de determinados compuestos bioactivos (Fernández-Orozco *et al.*, 2003; Fernández-Orozco *et al.*, 2006).

2.6.1 Efecto en carbohidratos

Los carbohidratos presentes en la semilla de leguminosa son hidrolizados durante la germinación, proporcionando energía necesaria para la síntesis de proteínas, que serán utilizadas en el crecimiento de la planta (Adjei-Twum & Splittstoesser, 1976; Bau *et al.*, 1997). Durante este periodo, aumenta la digestibilidad del almidón y por tanto el contenido en monosacáridos, debido a la mayor actividad de las α -amilasas y fosforilasas responsables de la hidrólisis de este polisacárido de reserva (Thompson & Yoon, 1984; Ghorpade & Kadam, 1989; Thompson, 1993; Alonso *et al.*, 2000; Saharan *et al.*, 2002). Además, se incrementan las α -galactosidasas encargadas de hidrolizar los oligosacáridos de la familia de la rafinosa a azúcares de menor tamaño, necesarios para el desarrollo de la planta (Czukur *et al.*, 2000). En el caso de los glucósidos pirimidínicos vicina y convicina, generalmente las reducciones son pequeñas (Hegazy & Marquardt, 1983; Griffiths & Ramsay, 1996; Jamalian, 1999).

Durante este proceso, el almidón es modificado y transformado, indicando que en un momento determinado de la germinación se aumentará el almidón digerible (Mahadevamma & Tharanathan, 2004; Ghavidel & Prakash, 2007). Por lo tanto, la germinación mejora la disponibilidad del almidón, de manera que, si se requiere como fuente de energía, el proceso de germinación puede ser un buen método para obtenerla. El aumento de la actividad amilasa probablemente reduce

el contenido de almidón resistente de la pared celular, resultado de los cambios fisiológicos en el desarrollo del germinado.

2.6.2 *Efecto en fibra*

Se ha podido observar en semillas de leguminosas que el proceso de germinación tiende a modificar la estructura de los nutrientes, afectando posiblemente a la integridad de los tejidos y provocando la ruptura de las asociaciones entre macro moléculas. Esto implicaría una considerable síntesis de pared celular y, por tanto, un aumento y modificación de la fibra alimentaria y, en consecuencia, de sus propiedades físico-químicas y efectos fisiológicos (Martín-Cabrejas *et al.*, 2008). Esto sugiere una síntesis de polisacáridos, además de la síntesis de nuevas proteínas y RNA mensajero durante la germinación (Abdel-Rehim *et al.*, 1995; Mohamed-Abdel *et al.*, 1995).

Los incrementos observados en el contenido de fibra alimentaria de semillas germinadas pueden ser debidos a una mayor solubilización de sustancias pécticas, que presentan una estructura ramificada y son más susceptibles de sufrir una ruptura durante este proceso (Pérez- Hidalgo *et al.*, 1997; Almeida Costa *et al.*, 2006). Por tanto, los polisacáridos son movilizados durante la germinación, proporcionando a la planta cantidades de carbohidratos solubles que pueden ser utilizados para la formación de otros componentes celulares y para la respiración produciendo energía (Brett & Waldron, 1996).

Los polisacáridos son movilizados durante la germinación, proporcionando a la planta cantidades de carbohidratos solubles que pueden ser utilizados para la formación de otros componentes celulares y para la respiración produciendo energía (Brett & Waldron, 1996).

2.6.3 *Efecto en lípidos*

La germinación puede provocar aumento en los niveles de grasa en harinas de leguminosas, debido a la actividad fotosintética que ejercen los cotiledones del producto germinado (Osman, 2007). Las lipasas aumentan gradualmente a lo largo de la germinación provocando la hidrólisis de los lípidos, que son utilizados como fuente de energía para la síntesis de proteínas durante el desarrollo de la planta (Adjei-Twum & Splittstoesser, 1976; García-Agustín & Primo-Millo, 1993; Bau *et al.*, 1997).

2.6.4 *Efecto en proteínas*

La digestibilidad proteica se incrementa y el contenido en aminoácidos libres también y esto se debe a la mayor actividad de las proteasas y a la reducción de factores no-nutritivos como el ácido fítico o los taninos condensados que interaccionan con proteínas, formando complejos menos susceptibles al ataque proteolítico (Briarty *et al.*, 1970; Adjei-Twum & Splittstoesser, 1976; Ghorpade & Kadam, 1989; Bau *et al.*, 1997; Alonso *et al.*, 2000). Este aumento de la digestibilidad de la proteína, también está relacionado con la reducción de inhibidores de proteasas (Khalil & Mansour, 1995; Chau & Cheung, 1997; Alonso *et al.*, 2000). Incluso las lectinas y saponinas, que interfieren con la hidrólisis de proteínas, se reducen durante la germinación por degradación enzimática (Khokhar & Chauhan, 1986; Thompson *et al.*, 1989; Savelkoul *et al.*, 1992; Thompson, 1993; Bau *et al.*, 1997; Saharan *et al.*, 2002).

2.6.5 *Efecto en otros compuestos de interés*

La germinación de las semillas de leguminosas modifica su composición fenólica, de forma diferente dependiendo del tipo de leguminosa que se trate. En compuestos de tipo flavonoideo se han observado cambios importantes, destacando su formación, en judías, de glicósidos de flavonoles (López-Amorós *et al.*, 1998) y la disminución de proantocianidinas en lentejas (Bartolomé *et al.*, 2000; López-Amorós, 2000; López-Amorós *et al.*, 2006).

En lentejas también se observa un aumento de los compuestos hidroxicinámicos y una cierta disminución de los hidroxibenzoicos (Bartolomé *et al.*, 1997, López-Amorós, 2000; López-Amorós *et al.*, 2006). Los cambios metabólicos observados están afectados por las condiciones de germinación, como luz y días de germinación (López-Amorós *et al.*, 2006). De esta forma, estos autores observaron que la actividad antioxidante se reduce en el sexto día de germinación.

La gran variación en cuanto al comportamiento de los componentes fenólicos podría ser explicada por el complejo metabolismo bioquímico de las semillas durante el proceso germinativo (Dueñas *et al.*, 2009). Las enzimas endógenas de las leguminosas se activan durante la germinación provocando diferencias en las variaciones de la composición química de judía y lenteja. Dichas enzimas, como las hidrolasas y polifenoloxidasas, están directamente relacionadas con los compuestos fenólicos ya que su actividad aumenta durante la germinación, aunque de una manera diferente, dependiendo del tipo de leguminosa (Rao & Deosthale, 1987). La concentración en estos compuestos bioactivos que se producen como consecuencia de la germinación, se traduce en la modificación de su capacidad antioxidante, pudiéndose valorar de esta forma los posibles efectos biológicos de las leguminosas germinadas (López-Amorós *et al.*, 2001). No obstante, en la literatura se encuentran artículos que describen una tendencia al incremento de la actividad antioxidante

cuanto más tiempo permanece la muestra germinada (Lin & Lai, 2006; Fernandez-Orozco *et al.*, 2008, Dueñas *et al.*, 2009). Por otra parte, la germinación ejerce una gran influencia en el contenido de vitaminas, ya que estimula la biosíntesis de determinadas vitaminas hidrosolubles, dando lugar en algunos casos a la aparición de vitamina C en lentejas (Frías *et al.*, 2002), y también riboflavina, tiamina y niacina, incrementando también los niveles de aminoácidos libres (Urbano *et al.*, 1995).

La germinación no parece influir directamente sobre la composición mineral de la semilla, pero con el incremento de las fitasas endógenas que hidrolizan el ácido fítico, el fósforo que formaba parte de la molécula se libera y también aumenta la biodisponibilidad de otros minerales (Tabekhia & Luh, 1980; Skoglund *et al.*, 1997; Greiner & Konietzny, 2001; Egli *et al.*, 2002).

2.7 Influencia de la germinación sobre compuestos antinutricionales presentes en harinas de leguminosas

Dentro de las plantas destinadas a la alimentación, las leguminosas son unas de las más interesantes por su gran potencial nutritivo. Sin embargo, la utilización de sus nutrientes (proteínas, carbohidratos, minerales) se ve limitada por la presencia de una serie de compuestos de carácter no nutritivo que obstaculizan su aprovechamiento y que producen efectos fisiológicos y bioquímicos adversos en humanos y animales, pudiendo llegar a presentar toxicidad en algunos casos. Es por ello, que a estos compuestos se les ha designado tradicionalmente como “factores antinutritivos” (Grant, 1989; Liener, 1989) y en los últimos tiempos como “factores no-nutritivos” (Bartholomai *et al.*, 2000).

2.7.1 *Ácido fítico*

El mioinositol hexaquisfosfato, comúnmente conocido como ácido fítico (IP6), fue aislado por Pfeffer (1872) en forma de derivado de calcio/magnesio de los granos de aleurona del endospermo de semillas de trigo. Su concentración relativa y su distribución en la semilla fueron descritas por primera vez por Palladin en 1894, e identificado como un inositol por Winterstein en 1897 (Gibson & Ullah, 1990).

Es un compuesto ampliamente distribuido en las semillas de leguminosas, que puede ser degradado por fitasas (mioinositol hexaquisfosfato fosfohidrolasas) tanto endógenas como exógenas. Estas enzimas pertenecen al grupo de las fosfatasas, y son capaces de hidrolizar secuencialmente el IP6 a ésteres de mioinositol con menor número de grupos ortofosfato (mioinositol pentaquis-, tetraquis-, tri-, di- y monofosfato) y fosfato inorgánico. Se conocen dos tipos de fitasas: 3-fitasas y 6-fitasas, que inician la desfosforilación del anillo de mioinositol en la posición 3 y 6, respectivamente. Las 3-fitasas suelen estar presentes en microorganismos, mientras que las 6-fitasas se encuentran generalmente en las semillas de plantas superiores (Gibson & Ullah, 1990; Muzquiz & Wood, 2007).

Durante la maduración de la semilla, el ácido fítico se sintetiza en el citoplasma, posiblemente en asociación con el retículo endotelial y es transportado por medio de vesículas a los cuerpos proteicos (Greenwood & Bewley, 1984; Brinch-Pedersen *et al.*, 2002). En unas inclusiones de estos cuerpos proteicos conocidas como globoides, el ácido fítico se almacena en su forma aniónica (fitato) unido a cationes mono- y divalentes, como K^+ , Mg^{2+} o Ca^{2+} , formando unas sales denominadas fitinas (Lott & Buttrose, 1977; Cosgrove 1980; Griffiths, 1981; Honke *et al.*, 1998). El IP6 podría ser inductor de la dormición de la semilla, ya que, al unirse a cationes multivalentes necesarios para el control de procesos celulares, el metabolismo se ralentiza (Williams, 1970; Cosgrove, 1980; Gibson & Ullah, 1990). Además, gracias a

su propiedad antioxidante, el IP6 podría preservar la viabilidad de la semilla durante el periodo de latencia (Graf *et al.*, 1987).

El ácido fítico constituye la principal forma de reserva de fosfato inorgánico y mio-inositol de la semilla, y concretamente en leguminosas entre un 40-60% del fósforo total se encuentra en forma de IP6. Con la activación de las fitasas preexistentes y la síntesis de fitasas *de novo*, segregadas por el aparato de Golgi y transportadas a los cuerpos proteicos durante la germinación, puede hidrolizarse el mio-inositol hexaquisfosfato allí presente. A partir de este compuesto se obtiene el fosfato inorgánico necesario para el crecimiento de la planta, y el mio-inositol utilizado *in situ* para la síntesis de la pared celular (Gabard *et al.*, 1986; Crans *et al.*, 1995; Ravindran *et al.*, 1995; Fernández *et al.*, 1997; Loewus & Murthy, 2000). También, los cationes mono- y divalentes que se encontraban formando sales con el ácido fítico, quedan disponibles para ser utilizados en el desarrollo de la planta (Cosgrove, 1980).

El mioinositol hexaquisfosfato ha sido considerado tradicionalmente como un antinutriente por su unión a minerales, proteínas y almidón, con los que forma complejos que no pueden ser asimilados. Sin embargo, estas interacciones moleculares también pueden ser favorables para la salud (Rickard & Thompson, 1997).

2.7.1.1 Interacciones y efecto fisiológico

Los animales monogástricos, entre ellos el hombre, tienen escasas fitasas a nivel de estómago e intestino delgado, de manera que no pueden hidrolizar la molécula de ácido fítico y utilizar el fósforo que se encuentra formando parte de su estructura, ni los minerales con los que forma sales. Al llegar al intestino grueso, la actividad fitásica de la mucosa tampoco es suficiente para hidrolizar el IP6, por lo

que es metabolizado por bacterias de la flora intestinal, aunque el fósforo y los demás minerales liberados ya no pueden ser absorbidos a ese nivel (Fernández *et al.*, 1997; Steer & Gibson, 2002).

2.7.1.2 *Efectos nocivos*

La capacidad del ácido fítico para formar complejos insolubles con minerales esenciales como Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, Mn^{2+} , Ca^{2+} y Mg^{2+} , hace que disminuya la absorción intestinal y biodisponibilidad de éstos (Evans y Pierce, 1982; Nolan *et al.*, 1987; Pallauf & Rimbach, 1997; Persson *et al.*, 1998). En estudios realizados con animales y humanos, se ha observado que el IP5 y el IP6 tienen un efecto negativo sobre la biodisponibilidad de minerales, mientras que los inositoles fosfato menos fosforilados, IP1, IP2, IP3 e IP4, tienen baja capacidad de unión a cationes inorgánicos y los complejos que forman son más solubles. Sin embargo, el IP3 y el IP4 en presencia de inositoles fosfato altamente fosforilados, contribuyen a reducir la biodisponibilidad del hierro (Lönnerdal *et al.*, 1989; Sandström & Sandberg, 1992; Sandberg *et al.*, 1999).

Otra limitación a nivel nutritivo es la interacción iónica del ácido fítico con proteínas formando complejos proteína-fitato a pH ácido y proteína-mineral-fitato a pH básico. En ensayos realizados *in vitro* se ha observado una reducción de la solubilidad y biodisponibilidad de las proteínas, mientras que trabajos *in vivo* no siempre confirman este efecto (Cosgrove, 1980; Deshpande & Damodaran, 1989; Thompson, 1990). Además, debido a las interacciones fitato-proteína enzimática, el ácido fítico inhibe enzimas digestivas como lipasas, proteasas o α -amilasas, paralizando reacciones enzimáticas a nivel digestivo (O'Dell & de Boland, 1976; Knuckles & Betschart, 1987).

2.7.1.3 *Efectos benéficos*

Las interacciones del ácido fólico con cationes pueden ser en algunas ocasiones beneficiosas, como en el caso de su unión a metales tóxicos como Cd^{2+} o Al^{3+} para ser excretados por las heces (Evans & Martin, 1988). También posee propiedades anticancerígenas, ya que gracias a su unión a Zn^{2+} y Mg^{2+} , reduce la biodisponibilidad de estos minerales necesarios para la síntesis de ADN, evitando la proliferación celular (Steer & Gibson, 2002). Además, parece estar implicado en la prevención de caries dentales por su capacidad de unión al calcio del esmalte, quedando los dientes más protegidos frente al ataque de ácidos y bacterias (Zulet & Martínez, 2001). El inositol hexafosfato actúa como un agente hipolipidémico a nivel plasmático, minimizando el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Esto se debe a su mayor afinidad por el Zn^{2+} frente al Cu^{2+} . El exceso de Zn^{2+} , produce una reducción en la absorción de Cu^{2+} a nivel del intestino delgado, ya que el Zn^{2+} y el Cu^{2+} compiten por el mismo transportador. Pero el ácido fólico preferentemente que la Zn^{2+} , se reducen los niveles de Zn^{2+} en plasma sin interferirse la absorción de Cu^{2+} , con la consecuente reducción de los niveles de colesterol y triglicéridos (Rickard & Thompson, 1997; Zulet & Martínez, 2001). El IP6 también tiene propiedades antioxidantes gracias a las cuales previene el desarrollo de cáncer y daños celulares. Concretamente, al ser un agente quelante de Fe^{3+} , evita la intervención de este catión metálico en la formación de radicales hidroxilos ($\cdot\text{OH}$), reduciendo así la peroxidación lipídica (factor cancerígeno) y daños en el ADN. Además, con la quelación de este catión a nivel intestinal, se reduce su absorción y se inhibe la peroxidación de las lipoproteínas de baja densidad en plasma, con lo que disminuye la posibilidad de padecer arteriosclerosis (Urbano *et al.*, 2000; Shamsuddin, 2002). El ácido fólico puede retrasar la digestión y absorción del almidón de varias formas: por su unión directa a este polisacárido, por su unión a

las α -amilasas, o por su quelación de Ca^{2+} necesario para la activación de la amilasa. A través de estos mecanismos se produce un retraso en la respuesta glucémica, por lo tanto, debido a la disminución de glucosa en sangre, es requerida menos insulina y disminuye el riesgo de padecer diabetes (Rickard & Thompson, 1997; Pallauf & Rimbach, 1997). Además, al reducirse la digestibilidad del almidón y producirse una mala absorción del mismo, queda disponible en el colon para ser fermentado por bacterias colónicas, y como consecuencia, se liberan ácidos grasos de cadena corta que provocan la bajada del pH. Esta reducción del pH tiene un efecto protector, ya que precursores tumorales como ácidos biliares y amoniaco se insolubilizan y neutralizan, respectivamente, disminuyendo así el riesgo de padecer cáncer de colon. Aunque una excesiva fermentación y su consecuente bajada de pH, puede provocar carcinogénesis (Thompson, 1993; Steer & Gibson, 2002). Por otro parte, la interacción entre el ácido fólico y proteínas enzimáticas puede ser beneficiosa.

Concretamente, al unirse a enzimas bacterianas como β -glucuronidasas y mucinasas en el colon, reduce la actividad de estas enzimas, evitando la conversión de ácidos biliares primarios en secundarios, que son precursores tumorales (Thompson, 1993). La actividad antineoplásica del IP6 puede estar mediada por sus derivados de menor peso molecular, principalmente IP3, que además de poseer propiedades antiinflamatorias, incrementa la actividad de las células “natural killer” que se encuentran involucradas en la destrucción e inhibición del crecimiento de células tumorales (Cecconi *et al.*, 1994; Zhou & Erdman, 1995). También se ha observado, que la elevada ingesta de ácido fólico, lleva a un incremento de los niveles de mioinositoles menos fosforilados (IP2, IP3) en el contenido urinario, que podrían ser responsables de inhibir la formación de cálculos renales (Konietzny & Greiner, 2003). A través de una serie de estudios realizados en el cerebro de mamíferos se ha llegado a la conclusión de que los inositoles fosfato podrían controlar a nivel central la presión sanguínea (Vallejo *et al.*, 1987). El efecto positivo o negativo del mio-

inositol hexaquisfosfato para un individuo depende de varios factores: (i) la concentración relativa de este compuesto y de otros nutrientes, (ii) las condiciones bajo las cuales es consumido (efecto del procesado, presencia de enzimas hidrolíticas, interacción con otros compuestos de la dieta) y (iii) su estado nutricional y de salud. Por tanto, aquellas personas que consumen alimentos ricos en ácido fítico, pero pobres en otros nutrientes como minerales y proteínas, tendrán una mayor predisposición a desarrollar enfermedades relacionadas con deficiencias en minerales o a padecer malnutrición proteica. Concretamente los niños, al requerir un mayor aporte de nutrientes, serán más susceptibles al efecto del ácido fítico. Por el contrario, individuos que consumen exceso de calorías y nutrientes, al igual que aquellos con un mayor riesgo de padecer enfermedades crónicas como el cáncer, afecciones cardiovasculares o diabetes, pueden tolerar mayores dosis, actuando incluso como anticancerígeno, hipolipidemiante o hipoglucemiante, pero han de confirmarse las dosis apropiadas de ácido fítico necesarias para disminuir los efectos adversos y potenciar los efectos favorables para la salud (Fernández *et al.*, 1997; Steer & Gibson, 2002).

2.7.1.4 Cambios en la concentración por efecto de la germinación

Durante el proceso de germinación, el ácido fítico se desfosforila enzimáticamente mediante fitasas endógenas, las cuales, son más abundantes cuando se sintetizan de Novo o después de la activación de las preexistentes (Shimelis & Rakshit, 2007; Greiner & Konietzny, 2006). Posteriormente, se obtiene mioinositol penta-, tetra-, tri-, di- y monofosfato además del fosfato inorgánico y mioinositol que son necesarios para la plántula en desarrollo (Gupta & Gangoliya, 2015; Vats & Banerjee, 2004) Por otro lado, se sabe que durante la germinación el

ácido giberélico induce la secreción de fitasa, aunque no promueve la síntesis (Konietzny & Greiner, 2002). Por el contrario, el fosfato inorgánico parece inhibir estas enzimas o prevenir su síntesis al comienzo de la germinación (Sartirana *et al.*, 1967; Mandal *et al.*, 1972).

Estudios han demostrado que, en los cotiledones de leguminosas germinados durante 10 días, hay una disminución del 75% en el ácido fítico, se ha reportado una concentración de 4.36 mg/g a 1.09 mg/g, mientras que en períodos más cortos de germinación (2-3 días), el contenido de estos compuestos se reduce en un 39% en soya (de 40 a 24.4 g/kg) y *P. aureus*, (de 13.44 a 8.2 g/kg) 41% en *P. mungo*, y 64% (de 15.76 a 9.3 g/kg) en garbanzos (Beal & Mehta, 1985; Chitra *et al.*, 1996). El comportamiento observado en los cotiledones se atribuyó a la desfosforilación enzimática de los fosfatos de inositol por las fitasas endógenas, cuyo volumen aumenta gradualmente durante la germinación. Además, el fosfato inorgánico liberado después de la hidrólisis del fosfato de inositol en los cotiledones se transfiere al eje embrionario para ser utilizado en su desarrollo y transformación en una plántula.

Aguilera *et al.*, (2013) analizaron harinas de soya germinada y no germinada para cuantificar los fosfatos de inositol, demostrando que la germinación afecta positivamente el factor antinutricional, logrando hasta un 70%. En consecuencia, se elimina la capacidad quelante de los fitatos y, por lo tanto, los minerales consumidos en la dieta se utilizan mejor. La reducción en el ácido fítico se atribuyó principalmente a la activación de la enzima fitasa endógena, que no solo hidroliza el ácido, sino que también aumenta la biodisponibilidad de las proteínas de reserva y el contenido de aminoácidos (Alonso *et al.*, 2000).

Además, se ha informado que el uso de inductores en la germinación permite la reducción de compuestos antinutricionales. Estudios en el frijol Dalia (*Phaseolus*

vulgaris L.) indican una disminución del 36% en la germinación y mayores porcentajes de reducción cuando el quitosano se usa como inductor en el proceso, ya que la planta usa el fósforo como recurso energético en la hidrólisis por fitasas y el inductor desencadena el estrés (Azeke *et al.*, 2011).

Shimelis *et al.*, (2007) informaron una disminución de hasta el 96% en la concentración de fitato en brotes de frijol de 4 días (*Phaseolus vulgaris* L.).

Además de las leguminosas, en otras semillas, por ejemplo, cereales como el maíz, la concentración de ácido fítico también se reduce. Sokrab *et al.*, (2012) evaluaron el efecto de la germinación durante 6 días en dos fenotipos de maíz: var-113 y TL-9B-6225-0 x TL617. Informaron un contenido reducido de ácido fítico en el día 2 de germinación, aumentando hasta el 80% de eliminación en el día 6. Como otros trabajos, esta investigación indica que la reducción se debe principalmente a la activación de la enzima endógena como fitasa durante la germinación.

A diferencia de Sokrab *et al.*, (2012), Khetarpaul & Chauhan, (1990) informaron una disminución más leve en el mijo: 50% a 30°C / 24 h y 70% con remojo previo de 24 h (Abdelrahman *et al.*, 2007; Vadivel *et al.*, 2001). Alonso *et al.*, (2000) Khattab & Arntfield, (2009) y Mubarak (2005) informaron un comportamiento similar en guisantes, habas, frijoles y frijol mungo con remojo previo (12–25 h). Se informa que la malta del mijo reduce el ácido fítico de 1,277.5 mg/100g de materia seca a 972.1 mg/100g de materia seca y 671.44 mg/100g de materia seca después de 72 h y 96 h respectivamente (Makokha *et al.*, 2002; Coulibaly *et al.*, 2011) Aunque el remojo puede reducir las concentraciones de ácido fítico, el tiempo ejerce un efecto similar. Shi *et al.*, (2018) observaron el mismo comportamiento en guisantes, lentejas, habas, garbanzos, frijoles y soya a las 4 h de germinación; aun así, no hubo cambios significativos en las legumbres. Jan *et al.*, (2017) asociaron la temperatura al tiempo como desencadenante de la reducción de fitato en la germinación. Informaron que

Chenopodium (*Chenopodium album*) muestra concentraciones reducidas de fitato de 3.41 a 0.11 mg/100 g a 23°C por 44 h y 25°C por 48 h, respectivamente, a medida que aumenta la temperatura y el tiempo de germinación. Del mismo modo, los estudios sobre el mijo cola de zorra informan una disminución de 0.341 a 0.102 mol/kg después de remojar durante 15.8 h y germinar a 25°C durante 40 h (Sharma *et al.*, 2015).

2.7.2 *Inhibidores de proteasas*

Los inhibidores de proteasas son proteínas, que tienen la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de enzimas digestivas como las serina proteasas (tripsina y quimotripsina) propias del tracto gastrointestinal de los animales, aunque también pueden inhibir proteasas endógenas y enzimas de bacterias, hongos e insectos (Domoney, 1999).

Se ha comprobado que los inhibidores de tripsina se incrementan en los cotiledones y en el eje embrionario durante el desarrollo de la semilla, alcanzando los niveles máximos durante el periodo de desecación. Por lo tanto, una de sus funciones en la semilla, podría estar relacionada con la adquisición de tolerancia a la desecación, proporcionando estabilidad a las proteínas (Kute *et al.*, 1984; Giri *et al.*, 1998; Welham *et al.*, 1998; Lam *et al.*, 1999). Aunque también, gracias al elevado contenido en cisteína que los inhibidores de tripsina presentan en su estructura, la semilla podría utilizarlos como fuente de aminoácidos azufrados (Pusztai, 1972).

Uno de los principales papeles de los inhibidores de proteasas, es el de defensa frente a la invasión de microorganismos e insectos, y para ello, las leguminosas elaboran inhibidores de proteasas tanto microbianas, como digestivas de insectos (Ryan, 1983; Janzen *et al.*, 1986; Giri *et al.*, 1998; Pusztai *et al.*, 2004).

Estos inhibidores podrían también regular la proteólisis de la proteína almacenada en los cuerpos proteicos antes y durante la germinación de la semilla, inhibiendo proteasas endógenas, ya que en algunas ocasiones la actividad de los inhibidores de proteasas no se modifica o incluso se incrementa a lo largo del periodo germinativo (Bhatty, 1977; Rani & Hira, 1993; Alonso *et al.*, 2000).

También se ha observado, la actividad de los inhibidores de proteasas se reduce durante la germinación, mientras que las proteasas endógenas van incrementando su actividad. Por ello, se ha pensado que las propias proteasas de la semilla, podrían degradar los inhibidores de proteasas (Liener & Kakade, 1980; Norton, 1991; Savelkoul *et al.*, 1992; Lam *et al.*, 1999). Según los estudios llevados a cabo por Birk (1968), estos inhibidores no pueden intervenir en la regulación de la hidrólisis proteica, ya que al ser extraídos de la planta son incapaces de inhibir sus propias proteasas. Además, si es cierto que se encuentran localizados en el citoplasma (Wolf, 1972), su actividad inhibitoria no puede estar asociada a los cuerpos proteicos, pero podrían evitar la hidrólisis de proteínas citoplasmáticas en situaciones de ruptura accidental de los cuerpos proteicos que contienen proteasas (Baumgartner & Chrispeels, 1976).

2.7.2.1 *Clasificación*

Los estudios de caracterización realizados en semillas de soya son los más amplios y han permitido clasificar a los inhibidores de serina proteasas en: inhibidor de Kunitz e inhibidor de Bowman-Birk, denominados así tras su aislamiento por Kunitz (1945) y Bowman (1946), respectivamente. En el último caso, la caracterización fue llevada a cabo por Birk *et al.* (1968), por lo que se añadió este nombre. Los inhibidores de serina proteasas han sido aislados también en otras

semillas de leguminosas, aunque no todas contienen los dos tipos de inhibidores (Domoney, 1999).

a) Inhibidores de proteasas tipo Kunitz

El inhibidor de tripsina de Kunitz de soja es termolábil, con un peso molecular de 21 KDa y dos puentes disulfuro. Está formado por 181 aminoácidos, con un único sitio activo localizado en Arg63-Ile64. Su especificidad está directamente relacionada con la tripsina, de manera que inhibe fuertemente tripsina y débilmente quimotripsina. Una molécula de inhibidor, inactiva una molécula de tripsina y el complejo que forma es análogo al complejo enzima-sustrato. En otras leguminosas como *Albizzia julibrissin*, *Acacia elata* o *Psophocarpus tetragonolobus*, se han aislado y caracterizado inhibidores de proteasas tipo Kunitz, homólogos al de la soja, con pesos moleculares de 20-25 KDa, con algunos puentes disulfuro y con una especificidad más relacionada con la quimotripsina, que, con la tripsina, formando así complejos quimotripsina-inhibidor en proporción 2:1 (Norioka *et al.*, 1988; Liener, 1989; Norton, 1991; Domoney, 1999; Datta *et al.*, 2001).

b) Inhibidores de proteasas tipo Bowman-Birk

El inhibidor de Bowman-Birk de soja, está constituido por una cadena polipeptídica de 71 aminoácidos, con cisteína en elevada proporción formando siete puentes disulfuro. Tiene un peso molecular de 8 KDa y se le denomina inhibidor de doble cabeza porque posee lugares de unión independientes para tripsina y quimotripsina, de manera que el sitio activo para tripsina es Lys16-Ser17, mientras que para quimotripsina es Leu44-Ser45. Es estable frente al calor, ácidos y bases, y

esta propiedad es atribuible al efecto estabilizador de los puentes disulfuro de la estructura de esta proteína (Liener & Kakade, 1980; Norton, 1991; Domoney, 1999).

Los inhibidores tipo Bowman-Birk identificados en semillas de distintas especies de leguminosas como judía, garbanzo, haba, guisante, lenteja o cacahuete, tienen un peso molecular de entre 8-9 KDa y son homólogos del inhibidor de Bowman-Birk de soja. Son inhibidores no-competitivos que inhiben simultáneamente y de forma independiente dos enzimas, identificando así: inhibidores tripsina/tripsina, tripsina/quimotripsina o tripsina/elastasa (Griffiths, 1984; Sastry & Murray, 1987; Norioka *et al.*, 1988; Weder & Kahleyß, 1998; Domoney, 1999). Concretamente los inhibidores de serina proteasas presentes en *V. faba* son de tipo Bowman-Birk, e inhiben simultáneamente tripsina y quimotripsina (Warsy *et al.*, 1974; Gupta *et al.*, 2000).

2.7.2.2 *Efecto fisiológico*

Los inhibidores de proteasas presentes en las semillas de leguminosas son denominados compuestos antinutritivos como resultado de su actuación sobre enzimas digestivos animales (tripsina y quimotripsina), pero también podrían considerarse compuestos nutritivos al ser proteínas con un alto contenido en aminoácidos azufrados (Domoney, 1999).

2.7.2.3 *Efectos nocivos*

Los inhibidores de proteasas ingeridos con las leguminosas provocan efectos nocivos en animales. En primer lugar, forman complejos inactivos con tripsina y/o quimotripsina, por lo que los niveles de estas enzimas digestivos libres se reducen, dificultándose así la proteólisis y absorción de la proteína adquirida con la dieta (Friedman & Brandon, 2001). Además, estos complejos enzima-inhibidor ricos en aminoácidos azufrados son excretados. Por último, los inhibidores provocan una hipertrofia/hiperplasia del páncreas debido a la crónica hipersecreción de enzimas pancreáticos (tripsina y quimotripsina), consiguiendo que los aminoácidos azufrados que se encontraban sintetizando proteínas del tejido corporal, se desvíen hacia la síntesis de estas enzimas. Todo esto, lleva a una reducción en el contenido de aminoácidos esenciales, que provoca una inhibición del crecimiento del animal, agravándose así una situación ya crítica con respecto a la proteína de leguminosas que en sí misma es deficiente en aminoácidos azufrados (Grant, 1989; Liener, 1989; Hedemann *et al.*, 1999; Carbonaro *et al.*, 2000; Friedman & Brandon, 2001).

El mecanismo a través del cual los inhibidores de proteasas estimulan la secreción pancreática no está del todo claro. Existe una teoría según la cual esta secreción estaría regulada mediante un mecanismo de retroalimentación negativo, de manera que, cuando el contenido de tripsina/quimotripsina se reduce en el duodeno por debajo de un determinado nivel, las células endocrinas de la mucosa duodenal liberan la hormona colecistoquinina, induciendo al páncreas a sintetizar más serina proteasas. La reducción de los niveles de tripsina y quimotripsina se produce cuando los inhibidores de proteasas ingeridos con la dieta, llegan al duodeno y se unen a estas enzimas digestivas formando complejos. Aunque éste, no parece ser el único mecanismo por el cual la secreción pancreática se activa. Estudios recientes han demostrado, que tanto los inhibidores de proteasas libres, como los

complejos enzima-inhibidor, se unen a la mucosa duodenal y estimulan la liberación de colecistoquinina, incrementándose así la secreción pancreática de serina proteasas (Liener, 1989; Pusztai *et al.*, 1997).

La acción que ejercen los inhibidores de tripsina sobre el hombre no está del todo clara, ya que la tripsina humana tiene dos formas: una catiónica que constituye el principal componente del jugo pancreático y que es débilmente inhibida, y una aniónica que comprende alrededor del 10-20% de la tripsina total, que es inhibida completamente (Liener & Kakade, 1980; Liener, 1989).

Los inhibidores de tripsina pueden llegar a producir cáncer a nivel de páncreas o incluso potenciar el efecto cancerígeno de otros compuestos (McGuinness *et al.*, 1980). Además, son capaces de desencadenar procesos alérgicos en individuos predispuestos, y un buen ejemplo de ello es el inhibidor de Kunitz, que puede provocar anafilaxia en personas sensibles a la soja (Rodríguez, 2004).

2.7.2.4 Efectos benéficos

Debido a que los inhibidores tipo Bowman-Birk son proteínas con una cantidad elevada de cisteína, hacen una contribución importante en el contenido de aminoácidos azufrados, incrementando así el valor nutritivo de la leguminosa (Sastry & Murray, 1987; Hedemann *et al.*, 1999).

Los inhibidores de Bowman-Birk de soja, al igual que sus homólogos presentes en otras leguminosas, intervienen en la prevención y tratamiento de cáncer (colon, mama, hígado, pulmón, próstata, etc.) mediante la inhibición de quimotripsina. Un mecanismo a través del cual estos compuestos pueden evitar la carcinogénesis es con la reducción de la digestibilidad de la proteína y menor disponibilidad de aminoácidos como leucina, fenilalanina o tirosina, necesarios para

el desarrollo de células cancerígenas (Troll *et al.*, 1987; Tamir *et al.*, 1996; Kennedy, 1998; Clemente *et al.*, 2004). Según los estudios realizados por Fernandes y Banerji (1995), los inhibidores de Bowman-Birk de *V. faba* previenen la formación de tumores estomacales.

2.7.2.5 Cambios en la concentración por efecto de la germinación

Kamalakannan *et al.*, (1981) analizaron los cotiledones *Vigna mungo*, donde la actividad antitripsina se redujo cada vez más durante los seis días de germinación. Según los investigadores, este comportamiento podría ser la consecuencia de la hidrólisis de las proteínas acumuladas en los cotiledones que son necesarias para el desarrollo del eje embrionario. Los estudios en habas demuestran que la concentración de estos compuestos se redujo a los 2 y 6 días de germinación en un 21 y 69%, respectivamente (Saharan *et al.*, 2002).

Alonso *et al.* (2000) también detectaron un aumento en la digestibilidad de las proteínas. Estudios similares han demostrado que los inhibidores de la tripsina del frijol se reducen en un 27 y 84% después de 2-3 días de germinación, respectivamente (Hbday *et al.*, 1973; Alonso *et al.*, 1998). Por otro lado, después de períodos de 1 a 10 días, la pérdida de antitripsina en el frijol rojo es del 17 al 63% (Trugo *et al.*, 1990).

En lentejas, se han informado reducciones entre 21 y 54% después de 4 y 6 días de germinación, respectivamente (El-Mahdy *et al.*, 1985). De acuerdo con Vidal-Valverde *et al.*, (1994) y Frías *et al.*, (1995), esto es probable porque los inhibidores se utilizan como fuente de energía para el desarrollo de las plántulas. En contraste, los porcentajes de reducción en el garbanzo germinado durante 3 a 6 días son 24–83% (Savage & Thompson, 1993) y en soja, 17–23% (Ndzondzi-Bokouango *et al.*, 1989).

Autores como Wilson, (1980) coinciden en que la reducción de las legumbres podría atribuirse a la movilización enzimática y la degradación de proteínas, incluidos los inhibidores de la tripsina, durante la germinación de las semillas. Sin embargo, según los estudios de Ryan, (1983), esta reducción no parece estar vinculada a ningún proceso bioquímico en la germinación de la semilla.

Mendoza-Sánchez *et al.*, (2016) informaron una disminución del 41% en los inhibidores de tripsina en el frijol Dalia (*Phaseolus vulgaris* L.) germinado a 25°C en la oscuridad durante 3 días. La adición de inductores (quitosano, ácido salicílico y peróxido de hidrógeno) mejoró la reducción en un 57%. Al agregar inductores, las plantas alcanzan un estado de estrés, reduciendo las concentraciones de componentes de reserva en los que se incluyen los inhibidores de tripsina (Swieca *et al.*, 2013; Zeid, 2004).

2.8 Influencia de la germinación en las propiedades tecnofuncionales de harinas de leguminosas

Las propiedades tecno-funcionales son propiedades físico-químicas que proporcionan información sobre cómo un ingrediente en particular podría comportarse en una matriz alimentaria. Dichas propiedades se establecen por la composición y estructura molecular de los componentes individuales, como carbohidratos y proteínas, y de las interacciones que se establecen entre ellos (Kinsella, 1976). Entre las propiedades tecno-funcionales destacan aquellas que están relacionadas con el agua, ya que desarrollan un papel importante en los principales cambios que tienen lugar durante el procesado de alimentos. Por lo tanto, se puede decir que las propiedades tecnofuncionales, entre las que destacan la capacidad de absorción de agua y la capacidad de retención de agua, capacidades

emulsificantes y espumantes, influyen directamente en las características que conforman la matriz del alimento (McWatters, 1983).

Cuando se activan enzimas hidrolíticas por efecto de la germinación, comienza la desintegración de macromoléculas, principalmente proteínas y carbohidratos, modificando las propiedades tecnofuncionales de las harinas de manera directa (Kaur *et al.*, 2015). Identificar y conocer las propiedades tecnofuncionales específicas de las harinas de leguminosas es esencial para determinar sus posibles usos como ingredientes alimentarios. Además, encontrar harinas con propiedades tecno funcionales ideales, a partir de leguminosas no convencionales es de interés para la industria alimentaria para desarrollar alimentos que no contengan proteínas alergénicas o bien sustituir las existentes (Megat *et al.*, 2011).

Se ha reportado que durante la germinación de leguminosas ocurren cambios importantes que afectan las propiedades tecnofuncionales, por ejemplo, la capacidad de absorción de agua se incrementa de manera positiva, y esto se debe a la desnaturalización de nutrientes como carbohidratos y proteínas, incrementando el número de moléculas que pueden interactuar con el agua disponible (Kaushal *et al.*, 2012; Lawal, 2014). Mayor capacidad de absorción de agua se ha reportado en harinas de leguminosas con mayor contenido proteico y esto se debe a la propia capacidad de las proteínas de interactuar con el agua.

Por otro lado, la capacidad de absorción de aceite es también la función propia de las proteínas de interactuar con otros lípidos, sin embargo, dependerá del tipo de aminoácido presente en las moléculas de proteína y a los cambios generados por efecto de la germinación (Olalekan & Bosede, 2010). Los aminoácidos hidrofóbicos tienden a absorber más aceite y, por lo tanto, conducen a una alta capacidad de absorción de aceite. El incremento o decremento general en el contenido proteico de las harinas durante la germinación puede causar la exposición

de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, que a su vez aumentan la capacidad de absorción de aceite y agua después de la germinación (Rangel *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 2000).

La germinación puede mejorar las propiedades funcionales de las proteínas, reduciendo la tensión superficial entre la interfase agua y aire, mejorando así la capacidad de formación de espuma de las harinas resultantes. La capacidad emulsificante y la estabilidad de la emulsión formada, dependerá de la naturaleza anfifílica de la proteína en la harina obtenida, así como de los cambios en la concentración de lípidos y proteínas durante la germinación ya que se trata de una interacción única entre lípido-proteína (Seena & Sridhar, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo general*

Evaluar el efecto del tiempo de germinación sobre el contenido proteico, propiedades tecnofuncionales y digestibilidad de harinas de *Lupinus angustifolius* para potenciar su valor nutricional.

3.2 *Objetivo específicos*

- Obtener harinas de *Lupinus angustifolius* germinado por diferentes días para evaluar sus propiedades tecnofuncionales y proponer su aplicación como ingrediente en el desarrollo de alimentos funcionales.
- Determinar el contenido proteico de las harinas por el método Kjeldahl para evaluar la eficiencia de los tiempos de germinación.
- Evaluar el perfil electroforético de las harinas de *Lupinus angustifolius* germinado y sin germinar, para determinar las fracciones proteicas existentes.
- Determinar el porcentaje de digestibilidad proteica para analizar el efecto de la germinación a través de pruebas *in vitro*.
- Analizar el contenido de ácido fítico e inhibidores de tripsina para correlacionar su concentración con la digestibilidad de la proteína.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Germinación y secado del grano

Las semillas de *Lupinus angustifolius* se obtuvieron del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agrícolas de la Universidad de Guadalajara, México. Las semillas se lavaron con agua destilada y se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 0.07%, después de un proceso de remojo durante 24 h. Posteriormente se incubaron en una cámara de germinación a 26 °C durante siete días (González-Montoya *et al.*, 2018, Guzmán- Ortiz *et al.*, 2017). Cada 24 h, se retiraron 300 g de granos germinados de la cámara para deshidratarse en un horno convencional a 40 °C hasta obtener una humedad promedio de 7.5%.

4.2 Obtención de las diferentes harinas de *Lupinus angustifolius* germinado

Los granos fueron molidos y tamizados a través de una malla de 60 mm para obtener harina de *Lupinus angustifolius* germinado a diferentes tiempos. Estas harinas se desengrasaron según lo establecido por la AACC (2000) y se almacenaron herméticamente para su posterior análisis. La harina de *Lupinus angustifolius* no germinada se usó como harina nativa o control.

4.2.1 Determinación de nitrógeno total

La determinación de nitrógeno total se realizó de acuerdo a lo establecido por la AOAC, (2006) método 960.52.

4.2.2 Desgrasado de las harinas obtenidas

La determinación de grasa se realizó por el método de la AOAC (2006), basado en un método gravimétrico.

4.3 Perfil electroforético de las harinas obtenidas

El perfil electroforético se realizó siguiendo la metodología de Laemmli, (1970). Se utilizaron geles de poliacrilamida, el gel concentrador al 5%, y gel separador al 13%. Se tomó una muestra de las harinas de *Lupinus angustifolius* germinado y sin germinar, se mezclaron con buffer de muestra Trizma base (pH6.8) con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) 0.12M, glicerol 2M, azul de bromofenol y β -mercaptoetanol 10% (V/V), a una proporción muestra/solución tampón de 1mg/mL, y se sometió a ebullición durante 5 minutos. Posteriormente se cargaron cada una de las muestras en los carriles del gel concentrador (15 μ l). Se sometieron los geles concentrador y separador a una corriente constante y sucesiva de 100V, durante 1 h 40 min. La tinción del gel se realizó con azul brillante Coomassie R250 0.05% (P/V) en metanol al 50% (V/V) y ácido acético al 10% (V/V) con agitación constante durante 15 minutos. Se destiñó el gel mediante lavado con agitación durante 12 h aproximadamente, en una solución de ácido acético /metanol/agua en proporción 1:4:5 (V/V).

4.4 Evaluación de las propiedades tecnofuncionales de las harinas obtenidas

4.4.1 Capacidad de absorción de agua

La capacidad de absorción de agua (CAA) de las diferentes muestras fueron analizadas de acuerdo a Elkhalfa y Bernhardt, (2010). Se pesaron 3 g de muestra en un tubo de centrífuga y se suspendió en 30mL de agua destilada para la CAA a temperatura ambiente. Para las determinaciones, las muestras se agitaron suavemente durante un minuto y después cada 10 minutos durante 30 minutos antes de centrifugarlas a 3000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se decantó y los tubos se dejaron drenar durante 5 minutos. La ganancia de peso se utilizó para calcular el % de capacidad de absorción de agua.

4.4.2 Capacidad de absorción de aceite

La capacidad de absorción de aceite (CAAc) de las diferentes muestras fueron analizadas de acuerdo a Elkhalfa y Bernhardt, (2010). Se pesaron 3 g de muestra en un tubo de centrífuga y se suspendió en 30mL de aceite de girasol refinado para a temperatura ambiente. Para las determinaciones, las muestras se agitaron suavemente durante un minuto y después cada 10 minutos durante 30 minutos antes de centrifugarlas a 3000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se decantó y los tubos se dejaron drenar durante 5 minutos. La ganancia de peso se utilizó para calcular el % de capacidad de absorción de aceite.

4.4.3 *Capacidad de formación de espuma*

Para la evaluación de formación y estabilidad de la espuma, se siguió el método de Elkhalfa y Bernhardt (2010). Se preparó una suspensión con 100 mL de agua destilada y 2 g de muestra en un vaso de precipitado de 250 mL. La suspensión se licuó durante 5 minutos. Posteriormente, se transfirió a un cilindro graduado de 250 mL y se midió el volumen. La capacidad de formación de espuma se expresó como porcentaje de aumento de volúmenes basándose en los volúmenes iniciales y después de la formación de la espuma mediante la siguiente ecuación:

$$\%CFE = \frac{V_2 - V_1}{V_1} * 100$$

Dónde:

V₁= volumen inicial (antes de la agitación)

V₂= volumen después de la agitación

4.4.4 *Estabilidad de la espuma*

La estabilidad de la espuma (%EES) se midió en intervalos de tiempo de 15, 30, 60 y 120 minutos empleando la siguiente ecuación:

$$\%EES = \frac{V_3 * 100}{V_2 - V_1}$$

Dónde:

V₁ = volumen inicial (antes de la agitación)

V₂ = volumen después de la agitación

V₃ = volumen de la suspensión medido a 15, 30, 60 y 120 minutos.

4.4.5 Densidad aparente

La densidad aparente (DA) se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Elkhalfa y Bernhardt, (2010). Se colocaron 10g por separado de las diferentes harinas (germinadas y sin germinar), en un cilindro de medición graduado de 25 mL. Las harinas se empaquetaron golpeando suavemente diez veces, se midió el volumen final de la harina prensada y los resultados se expresaron en g/mL.

4.4.6 Capacidad emulsionante y estabilidad de la emulsión

Las propiedades emulsionantes se midieron siguiendo la metodología de Elkhalfa y Bernhardt (2010). Se mezclaron 2 g de muestra de harina con 20 mL de agua destilada fría (4 ° C) y 20 mL de aceite de girasol refinado. Las muestras se agitaron suavemente durante 20 minutos y luego se centrifugaron a 4000 rpm por 10 minutos. Después de la centrifugación, se observó la altura de la capa de emulsión formada y se calculó la actividad de la emulsión (AE) usando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad emulsionante} = \frac{\text{Altura de la capa emulsionada}}{\text{Altura de la capa total}} \times 100$$

Para la estabilidad de la emulsión, se calentó la emulsión formada en un baño de agua (80°C) durante 30 minutos, seguido de 20 minutos de enfriamiento a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron nuevamente 4000 rpm por 10 minutos y se midió la altura de la capa emulsionada para calcular la estabilidad de la emulsión formada usando la siguiente fórmula:

$$\text{Estabilidad de la emulsión} = \frac{\text{Altura de la capa emulsionada después de calentar}}{\text{Altura de la capa total}} \times 100$$

4.4.7 Capacidad de hinchamiento

Se pesa 0,1 g de harina de leguminosa en un cilindro graduado de 10 mililitros. Se rellena el cilindro con agua destilada hasta 10 ml. Se apunta el volumen inicial ocupado por la muestra y se agita suavemente y se deja reposar durante 16 horas para que se hidrate. Transcurrido ese tiempo se mide el volumen final que ocupa la muestra (Robertson *et al.*, 2000). La capacidad de hinchamiento (CH) se expresa como:

$$CH \left(\frac{mL}{g} \right) = \frac{V_f - V_i}{P_m}$$

Dónde:

V_f = volumen final ocupado por la muestra (mL)

V_i = Volumen inicial de la muestra (mL)

P_m = peso de la muestra (g)

4.5 Digestibilidad proteica

La digestibilidad proteica se determinó de acuerdo con lo reportado por Tinus *et al.*, (2012). Se pesó la harina de *Lupinus* equivalente a 62.5 mg de proteína y se hidrató en 10 mL de agua milli-Q a 37 ° C durante 1 hora, después se ajustó el pH aproximadamente 8.0 con NaOH 0.1M / HCl 0.1N. Se prepararon 10 mL de una solución multienzimática que consiste en aproximadamente 16 mg de tripsina

(T0303 Trypsin del páncreas porcino Tipo IX-S, polvo liofilizado, 13,000–20,000 unidades BAEE / mg de proteína), 31 mg de quimotripsina (C4129 a-Quimotripsina del páncreas bovino C4129 Tipo II, polvo liofilizado, unidades P40 / mg de proteína) y 13 mg de proteasa (P5147 Proteasa de *Streptomyces griseus* Tipo XIV, P3.5 unidades / mg de sólido. La solución multienzimática se preparó fresca el día del análisis (Mensa-Wilmot *et al.*, 2001) y se ajustó a pH aproximado de 8.0. Se adicionó 1mL de la solución multienzimática a los 10 mL de la muestra y se mantuvo en agitación a 37°C. El pH se registró automáticamente cada 5 segundos durante 15 minutos. El cambio en el pH a los 10 min de digestión (ΔpH 10 min) fue utilizado en la siguiente ecuación para calcular la digestibilidad de la proteína. $\text{IVPD} = 65:66 + 18:10\Delta\text{pH}$ 10 in vitro (IVPD) de las muestras.

4.6 Cuantificación de fitatos

Siguiendo el método de Vaintraub y Lapteva (1988) y Latta y Eskin (1980) se determinó la concentración de fitato. Primero, se pesaron 0.5 g de harina. Luego se añadieron 10 ml de HCl al 3.5% y se agitó continuamente durante 1 hora, seguido de centrifugación a 10 000 rpm durante 10 minutos. La reacción se llevó a cabo con 200 μl de extracto, 2800 μl de agua destilada y 1 ml de reactivo de Wade (30 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + 300 mg de ácido sulfosalicílico y 100 ml de agua destilada). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 500 nm. La concentración se informó con base en la curva de calibración de fitato de sodio de 0 a 160 μg / ml, y los resultados se expresaron en mg de equivalente de fitato de sodio por 100 g de muestra en base seca (db).

4.7 Cuantificación de inhibidores de tripsina

La actividad de los inhibidores de tripsina se determinó, siguiendo el método enzimático de Welham y Domoney (2000), basado a su vez en el de Kakade *et al.*, (1970). Se utilizó α -N-benzoyl-DL-arginine- ρ -nitroanilidehydrochloride (BAPNA) como sustrato de tripsina. Se realizó la valoración del control de tripsina. Este valor debe estar en 0.4 unidades de absorbancia aproximadamente. El procedimiento para el testigo fue similar al control, sin embargo, después de la adición de 200 μ L de solución de tripsina se dejó reposar 1 minuto para posteriormente añadir 100 μ L de ácido acético al 30 %. Para la extracción de la muestra se pesaron 0.025 g, se añadió 1 mL de HCl 0.05 M, se agitaron durante 1 h a 4 °C, pasado este tiempo se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos, se recogió el sobrenadante y se mantuvo en un baño de hielo hasta el momento de su valoración. La reacción se realizó adicionando 5 μ L del extracto y 195 μ L de solución reguladora Tris – HCl 0.05 M pH 7.5 a 37 °C, posteriormente se agregaron 200 μ L de solución de tripsina, después de 2 minutos se añadieron 500 μ L de solución BTC previamente calentada a 37 °C, se dejó en reposo por 10 minutos y posteriormente se adicionaron 100 μ L de ácido acético al 30 %, se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 410 nm. Para el blanco del ensayo se procedió de igual forma que en la muestra, pero los 200 μ L de solución de tripsina fueron sustituidos por 200 μ L de HCl 1 mM. La concentración de inhibidores de tripsina fue reportada como unidades inhibidoras de tripsina (UTI)/ g de muestra en base seca.

4.8 Análisis Estadístico

Los resultados fueron expresados como el promedio de tres determinaciones \pm la desviación estándar. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA). Se realizó una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95% utilizando el software SPSS v.16.0 (SPSS, EE. UU.).

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Determinación de nitrógeno total de las diferentes harinas

En la Tabla 2 se muestra el contenido de proteína de *Lupinus angustifolius* germinado de 2 a 7 días, además, de la muestra sin germinar. Se observó que la concentración de proteína se incrementa de manera significativa ($p < 0.05$) a través del tiempo de germinación.

La muestra sin germinar presentó un contenido de 24.06% y se incrementó hasta 33.61% al día 6 de germinación. Dagnia *et al.*, (1992) reportaron un comportamiento similar en *Lupinus angustifolius*, sin embargo, el incremento fue observado hasta los 7 días de germinación a 29°C. Fouad y Rehab (2015), informaron un aumento en el contenido de proteína en lenteja de 25.63 a 28.86% después 6 días de germinación, Masood *et al.*, (2014) reportaron en garbanzo un aumento proteico de 17.80 a 23.37% después de 5 días de germinación. Ghumman *et al.*, (2016) reportaron un incremento a los 4 días de germinación en lenteja (*Lens culinari*) de 24.69 a 27.14% y en horsegram (*Macrotyloma uniflorum* L.) de 23.64 a 25.21%. Por otro lado, Atlaw *et al.*, (2018) y Echendu *et al.*, (2009) han reportado el incremento de proteína desde el día 3 de germinación en Fenugreek, cowpea y groundbean.

El tiempo en el que la proteína presenta la mayor concentración es dependiente del tipo de leguminosa y condiciones de germinación, sin embargo, la tendencia a incrementar prevalece. El incremento de la proteína puede ser debido a que se activan enzimas como las proteinasas que ocasionan la liberación de aminoácidos y péptidos, los cuales pueden utilizarse para formar nuevas proteínas (Atlaw and Kumar *et al.*, 2018). Debido a que durante la germinación se genera una síntesis de proteína a partir de la duplicación de ARN mensajero proveniente de la división celular, esta síntesis proteica es requerida por la planta para formar parte

de su estructura. Sin embargo, el comportamiento de la proteína durante la germinación también puede variar dependiendo las condiciones de tiempo y temperatura del proceso (Singh *et al.*, 2017).

Tabla 2. Contenido protéico de *Lupinus angustifolius* germinado y sin germinar

Día de Germinación	% de Proteína*
0	24.06±0.61 ^d
2	30.06±0.81 ^{bc}
3	31.33±0.65 ^{bca}
4	29.77±0.45 ^b
5	32.61±1.18 ^{ca}
6	33.61±0.09 ^a
7	31.68±0.26 ^{bca}

Los resultados son el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar.

Las letras a-d indican la comparación de medias entre la misma muestra.

Las muestras con la misma letra no presentaron diferencias significativas con la prueba de Tukey (p <0.05)

*Base seca

5.2 Perfil electroforético

Las principales proteínas de almacenamiento en semillas de *Lupinus* son denominadas conglutinas, las cuales pertenecen a las globulinas y se dividen en α , β , γ y δ -conglutina dependiendo su peso molecular (Duranti *et al.*, 2018). Estas fracciones proteicas fueron evidenciadas en el perfil electroforético de las muestras germinadas a diferentes días y la muestra sin germinar (Figura 1). En la primera línea de la Figura 1, se observa el marcador de peso molecular (6-200 KDa). Posteriormente se reflejan las muestras de los diferentes días de germinación (2-7 días). La línea 0 representa la muestra sin germinar donde se detectaron todas las fracciones de la conglutina (β , γ y δ). A partir del día 2 de germinación (línea 2), se observó que la intensidad de las bandas entre 45 y 21 KDa aumentaron, lo que se relaciona directamente con el contenido de proteína (Tabla 1).

En el día 3 se observó una ligera degradación alrededor de los 60KDa correspondiente a la fracción γ de la conglutina, además se observaron bandas más pequeñas alrededor de este peso molecular, esto puede ser debido a la hidrólisis de la proteína generada por la actividad enzimática. Durante este proceso se ha reportado que la actividad proteolítica incrementa de 2 a 5 días después de las exposiciones al agua (Brijs *et al.*, 2002; Wrobel *et al.*, 1991; Martinez *et al.*, 2009). En el día 5 de germinación se observó un comportamiento similar que en el día 2, sin embargo, la banda en 60KDa se observó ligeramente más intensa a diferencia de las demás muestras (línea 5). En la muestra del día 7 de germinación, los cambios en las fracciones proteicas fueron más visibles (línea 7). Se observó que, debido al proceso de germinación, se generan cambios importantes en las fracciones de proteínas, reduciendo notablemente la intensidad de las bandas de 40, 50, 97 y 116 KDa pertenecientes a las fracciones β y γ conglutina.

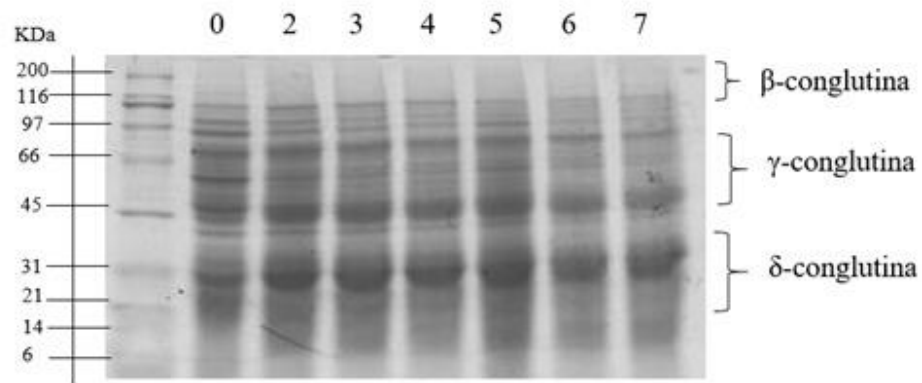


Ilustración 1. Perfil electroforético de las harinas analizadas, el primer carril de izquierda a derecha indica el marcador de peso molecular, línea 0 muestra sin germinar, línea 2-7: muestras germinadas de 2 a 7 días.

Rumiyati *et al.*, (2012) reportan cambios similares en la germinación a 25°C, reportaron una disminución en la intensidad de las bandas de 40, 50, 60 y 90 KDa a partir del día 5 de germinación en semillas de *Lupinus angustifolius*. De igual manera, reportan no tener cambios en la banda de 46 KDa aun prolongando el tiempo de germinación hasta 9 días.

Gulewicz *et al.*, (2008) también reportaron en *Lupinus* germinado por 5 días a 20°C, que la fracción proteica de 20KDa incrementó su intensidad. Los cambios generados en el perfil proteico durante la germinación se deben a la activación de enzimas, que generan una hidrólisis proteica, a partir de las proteínas de almacenamiento, las cuales son utilizadas como fuente de carbono y nitrógeno. Posteriormente las fracciones polipeptídicas pueden ser utilizadas para la síntesis de nuevas biomoléculas de acuerdo a los requerimientos para el desarrollo y crecimiento de la plántula (Duranti *et al.*, 2008).

La modificación de la proteína durante la germinación puede ser responsable de diversos cambios en la funcionalidad y su interacción con otros componentes. Además, se observaron cambios similares en las fracciones proteicas de algunos días de germinación, por lo que solo se seleccionaron los días 3, 5 y 7 y la muestra control (sin germinar) para los análisis de las propiedades tecno funcionales.

5.3 Evaluación de las propiedades tecnofuncionales de las harinas

5.3.1 Capacidad de absorción de agua (CAA) y aceite (CAAc)

La Tabla 3 muestra los resultados de CAA de las diferentes muestras. Se observó que con el tiempo de germinación se incrementa la CAA. La muestra sin germinar presentó un valor de 1.55 g H₂O/g, este valor se incrementó significativamente a partir del día 3 de germinación ($p < 0.05$) llegando a valores de 3.78 g H₂O/g al día 7 de germinación. Se han reportado tendencias similares en frijoles y lentejas en el día 7 de germinación (Sangronis *et al.*, 2004). El aumento en CAA ha sido inferior a lo encontrado en este estudio. Ghavidel y Prakash (2006), también reportaron incremento de la CAA con la germinación en cowpea y lenteja.

El incremento de la CAA con la germinación puede ser por el aumento de proteínas de bajo peso molecular y la mayor disponibilidad de grupos polares a través de la germinación (Ghumman *et al.*, 2016), estos datos coinciden con lo observado en el perfil electroforético (Figura 1) ya que a medida transcurre el tiempo de la germinación se observaron fracciones más pequeñas. Además, la descomposición de moléculas de polisacáridos que se generan durante la germinación incrementa la interacción con el agua y por lo tanto se incrementa su retención (Elkhalifa and Bernhardt, 2010).

Una baja capacidad de absorción de agua en la harina sin germinar y en los primeros días de germinación está relacionado con el contenido de proteína nativa, y su capacidad de interactuar con el agua; debido principalmente a la estructura, conformación, secuencia, número y tipo de aminoácidos (Butt y Batool, 2010). Por otro lado, constituyentes como el almidón y la fibra dietética o fracciones de los mismos generados durante la germinación, pueden intervenir en una alta CAA. (Granito *et al.*, 2004).

Las diferentes capacidades de absorción de agua por efecto de la germinación permiten dar usos alternos a este tipo de harinas. Una alta CAA, está estrechamente relacionada con una textura suave en los productos de panadería (Aguilera-Gutiérrez, 2009). El uso de este tipo de harina en la confitería es deseable ya que evita la solubilización de otras proteínas sin perder la capacidad de absorción de agua (Seena y Sridhar, 2005). En productos cárnicos podría mejorar las propiedades de textura del producto final, mejorando la viscosidad, elasticidad, adhesión y consistencia (Granito *et al.*, 2007).

En la Tabla 3 se muestra la CAAC de las diferentes muestras. Se observó que la germinación incrementa la CAAC. La muestra sin germinar presentó un valor de 0.84 g de aceite / g de muestra el cual se incrementó significativamente ($p < 0.05$) a partir del día 3 de germinación. El incremento se mantuvo constante hasta el día 7, donde se observó un valor de 1.64 g de aceite / g de muestra.

Sangronis *et al.*, (2004) reportaron un aumento de 90% y 67% en el CAAC en frijoles y lentejas respectivamente, después de 7 días de germinación, sin embargo, los valores son más bajos comparados con los obtenidos en este estudio. Por otro lado, Singh *et al.*, (2017) informaron un incremento de la CAAC de 82.26% a 88.12% en sorgo germinado durante 48 horas a 30 °C. El aumento de la CAAC en la germinación, puede ser debido a la retención de aceite por capilaridad y, por otro lado, a la propia hidrofobicidad de las proteínas, además hay mayor presencia de cadenas laterales no polares de aminoácidos que se unen al lado de cadenas de hidrocarburos de aceites (Chau y Cheung, 1998; Aguilera-Gutiérrez, 2009). El aparente aumento en la CAAC puede deberse también al aumento en la exposición de dichas cadenas generadas por la hidrólisis de proteínas durante el proceso de germinación.

Tabla 3. *Capacidad de absorción de agua y aceite de Lupinus angustifolius germinado y sin germinar*

Día de Germinación	CAA g H ₂ O/g de muestra	CAAc g of oil /g de muestra
0	1.55±0.26 ^c	0.84±0.05 ^b
3	3.24±0.09 ^b	1.47±0.11 ^a
5	3.50±0.13 ^{ab}	1.57±0.05 ^a
7	3.78±0.03 ^a	1.64±0.03 ^a

Los resultados son el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar.

Las letras a-c indican la comparación de medias entre la misma muestra.

Las muestras con la misma letra no presentaron diferencias significativas con la prueba de Tukey (p <0.05)

*Base seca

Por otra parte, durante este proceso, la proteína nativa se desnaturaliza, lo que resulta en la exposición de una superficie lipofílica más grande que genera una mejora en la capacidad de absorción de aceite (Elkhalifa y Bernhardt, 2010).

Estas harinas se pueden usar en la preparación de alimentos donde mantener y proteger el contenido de lípidos es necesario como en las formulaciones infantiles (Singh y Sharma, 2017), además podría resultar más eficiente comparado con algunas leguminosas convencionales como el frijol y lenteja ya que se obtuvieron valores más altos de CAAC en *Lupinus*.

5.3.2 Capacidad de formación de espuma (CFE) y estabilidad de la espuma

La muestra de *Lupinus angustifolius* no germinada tuvo una capacidad de formación de espuma de 51.66% (Tabla 4), significativamente diferente al día 5 y 7 de germinación ($p < 0.05$). El incremento al día 7 fue de 37.96% mayor comparado con la muestra sin germinar. Miquilena *et al.*, (2016) reportaron una disminución de 45 y 48% en frijoles negros y chinos sin germinar.

Tabla 4. Capacidad de formación de espuma (CFE) de *Lupinus angustifolius* germinado y sin germinar

Día de Germinación	%CFE
0	51.66±2.88 ^c
3	55.66±0.57 ^{cb}
5	59.67±0.57 ^b
7	70.33±1.52 ^a

Los resultados son el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar.

Las letras a-c indican la comparación de medias entre la misma muestra.

Las muestras con la misma letra no presentaron diferencias significativas con la prueba de Tukey (p <0.05)

*Base seca

Singh *et al.*, (2017) informan un comportamiento similar en sorgo germinado durante 48 h, encontraron que la capacidad de formación de espuma aumento 20.13% con el proceso. Setia *et al.*, (2019) también reportaron con la germinación incremento del 31.18 y 27.82% en la capacidad de formación de espuma en harina de guisantes amarillos y habas respectivamente. La germinación mejora significativamente la capacidad de formación de espuma, esto puede deberse a que durante la germinación la cantidad de proteínas solubilizadas se incrementa favoreciendo esta propiedad (Elkhalifa y Bernhardt, 2010). Las proteínas se solubilizan en la fase acuosa, se difunden y concentran en la fase aire-agua, tienen buena flexibilidad para extenderse parcialmente y formar capas cohesivas alrededor de las burbujas de gas; también poseen suficiente viscosidad y resistencia mecánica para evitar la ruptura y la coalescencia del sistema formado (Rangel *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha informado que la formación de espumas depende claramente de la configuración estable de las moléculas de proteína del sistema alimentario (Olalekan y Bosede, 2010).

La Figura 2, muestra la estabilidad de la espuma con respecto al tiempo de las diferentes muestras germinadas. La muestra sin germinar y la germinada por 3 días mostraron un comportamiento similar, siendo constante la estabilidad a partir de los 60 minutos. Este comportamiento está relacionado con la capacidad de formación de la espuma debido a que estas dos muestras no mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$). La muestra germinada por 5 días presentó mayor estabilidad a medida que aumenta el tiempo.

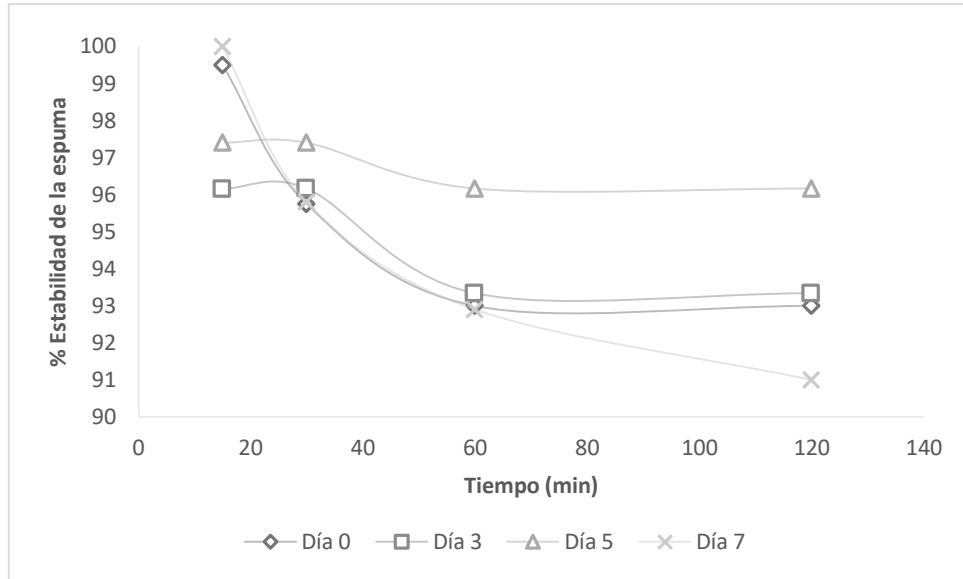


Ilustración 2. Estabilidad de la espuma de Lupinus angustifolius germinado y sin germinar

Hsu *et al.* (1982) observaron que la germinación de *V. faba* aumenta significativamente la capacidad espumante en 34%. Elkhalfa y Bernhardt, (2010) también informaron este comportamiento cuando germinaron sorgo durante 48 horas y su estabilidad fue constante cuando el tiempo se prolongó, debido a la desnaturalización de proteínas y al aumento de la proteína soluble en medio acuoso que permite la formación de interacciones hidrofóbicas. Sangronis *et al.*, (2004), informaron el mismo comportamiento estable en la formación de espuma desde el minuto 5 hasta los 60 min, cuando las lentejas fueron germinadas durante 7 días a 30 ° C.

El aumento de la estabilidad puede deberse a la desnaturalización y a la reducción de la tensión superficial de las moléculas de proteína que dan una buena capacidad de espuma (Singh *et al.*, 2013).

Los resultados indicarían que la germinación de las leguminosas produjo un cambio estructural en las proteínas, lo que incrementó su capacidad para formar espuma, propiedad que depende de la cantidad de proteínas presentes, de su estructura y de la habilidad relativa de esas proteínas para desnaturalizarse, precipitar y disminuir la tensión superficial en la interfase aire-líquido de la espuma (Sgarbieri, 1998).

5.3.3 Densidad aparente (DA)

La Tabla 5 muestra los resultados de la densidad aparente para las diferentes muestras analizadas. La muestra sin germinar presentó una densidad de 1.13 g/mL. La densidad disminuyó significativamente ($p < 0.05$) a partir del día 3 de germinación y se mantuvo constante hasta el día 7. (Ghavidel & Prakash, 2006) reportaron un comportamiento similar cuando germinaron frijoles (*Phaseolus aureus*) y lentejas (*Lens*

culinaris) durante 24 h, encontrando solo un porcentaje de disminución del 6.22 y 2.8% respectivamente. Elkhalfa and Bernhardt (2010), evaluaron el tiempo de germinación en sorgo, reportando una disminución del 21% al día 5 de germinación, Atlaw and Kumar *et al.*, (2018) reportaron en Fenugreek una disminución del 10% al día 3 de germinación. Por otro lado, Singh *et al.*, (2017) informaron una disminución de 8.3% en la densidad en sorgo germinado durante 2 días. Estos reportes parecen indicar que el porcentaje de disminución en la densidad está estrechamente relacionado con el tiempo de germinación, sin embargo, en este estudio se mantuvo la disminución desde el día 3 hasta el día 7 de germinación (Tabla 4). Esto puede ser por la modificación estructural y molecular de las diferentes macromoléculas que constituyen a la semilla principalmente proteínas y carbohidratos, considerando su modificación por la activación enzimática (Chinma *et al.*, 2009, 2015). Además, durante la germinación, la semilla tiende a ablandarse lo que facilita la disminución del tamaño de partículas durante la molienda (Mbithi-Mwikya *et al.*, 2000).

Esto demuestra que la germinación es un proceso que mejora la densidad aparente, al disminuir dicha propiedad se disminuye el volumen que las harinas utilizan y se facilita su almacenamiento y transporte a nivel industrial. En el caso de *Lupinus angustifolius* bajo estas condiciones de germinación bastaría un tiempo de 3 días para disminuir su densidad en un 28.3%.

Tabla 5. Densidad aparente Lupinus angustifolius germinado y sin germinar

Día de germinación	DA g/mL
0	1.13±0.01 ^a
3	0.81±0.01 ^b
5	0.85±0.02 ^b
7	0.87±0.051 ^b

Los resultados son el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar.

Las letras a-b indican la comparación de medias entre la misma muestra.

Las muestras con la misma letra no presentaron diferencias significativas con la prueba de Tukey (p <0.05)

*Base seca

5.3.4 *Capacidad emulsionante y estabilidad de la emulsión*

La Tabla 6 muestra los resultados obtenidos en las propiedades de emulsión de las muestras germinadas y sin germinar. La muestra no germinada presentó un porcentaje de emulsión de 40.33% e incrementó significativamente con el tiempo de germinación ($p < 0.05$), alcanzando un aumento del 18.67% al día 7 de germinación.

El proceso germinativo afecta esta propiedad de diferentes maneras en las leguminosas. En frijoles germinados durante 5 días, se ha reportado un aumento del 68% en la capacidad emulsionante con respecto a la muestra no germinada. Elkhalifa y Bernhardt, (2010) no reportaron estas propiedades en los primeros días de germinación de sorgo, ellos observaron que la funcionalidad se detectaba a partir del día 3 de germinación. Elbaloula *et al.*, (2013) también reportaron un incremento en la actividad y estabilidad emulsificante en sorgo de 61.65 y 51.8% respectivamente.

Cuando la capacidad emulsionante es relativamente alta, podría atribuirse a altos niveles de proteínas solubilizadas que actúan como tenso activo, así como a un cambio en el equilibrio de fuerzas de Van der Waals y las fuerzas repulsivas electrostáticas de las mismas (Chau y Cheung, 1997; Adebowale y Lawal, 2004), lo que permite deducir que la germinación modifica la estructura de la proteína nativa, impactando de manera directa en las propiedades funcionales de las harinas obtenidas. Este comportamiento coincide con lo observado en la capacidad de formación de espuma debido a la modificación de la proteína.

También se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) en la estabilidad de la emulsión entre todas las muestras. La tendencia fue la misma que en la actividad emulsionante, la estabilidad se incrementó con el tiempo de germinación. Estos resultados son parecidos a los reportados por Singh *et al.*, (2017) cuando germinaron

sorgo por 48 horas. La estabilidad y la capacidad de emulsión aumentan a medida que el tiempo de germinación se prolonga debido a un aumento en las interacciones entre las fracciones de proteínas provenientes de una hidrólisis de la proteína nativa con la grasa presente en el medio, así como el aumento de las partes hidrofóbicas de estas proteínas que interactúan con los lípidos presentes en la muestra (Singh *et al.*, 2017).

Las proteínas solubles son más activas en la superficie y se sabe que promueven la emulsión de aceite en agua (Subba Rao y Srinivasan, 1988). Por otro lado, algunos tipos de polisacáridos, pueden ayudar a estabilizar la reacción de la emulsión al aumentar la viscosidad del sistema (Elbaloula *et al.*, 2013). De acuerdo a estas características de las harinas germinadas, podrían ser utilizadas para incorporarse en productos de panadería.

Tabla 6. *Propiedades de emulsificación de Lupinus angustifolius germinado y sin germinar*

Día de germinación	% Emulsión	% Estabilidad
0	40.33±0.57 ^d	36.23±0.13 ^d
3	56.71±0.62 ^c	54.71±0.15 ^c
5	64.13±0.14 ^b	62.31±0.51 ^b
7	78.29±0.28 ^a	77.25±0.38 ^a

Los resultados son el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar.

Las letras a-d indican la comparación de medias entre la misma muestra.

Las muestras con la misma letra no presentaron diferencias significativas con la prueba de Tukey (p <0.05)

*Base seca

5.3.5 *Capacidad de hinchamiento (CH)*

Los resultados de la capacidad de hinchamiento de las muestras analizadas se muestran en la Tabla 7. La muestra sin germinar presento un valor de 4.16 mL/g el cual se incrementó 95.91% a partir del día 3 de germinación, siendo estadísticamente diferente a la muestra sin germinar ($p < 0.05$). Una disminución significativa se observó al día 7 de germinación ($p < 0.05$).

Sangronis *et al.*, (2004) informaron un incremento del 66% en la capacidad de hinchamiento cuando germinaron lentejas durante 7 días. La disminución de la capacidad de hinchamiento al día 7 de germinación puede ser debido a una mayor desnaturalización de proteínas sin tener moléculas capaces de interactuar con el agua del medio disponible y aumentando así la solubilidad de las mismas (Waldia *et al.*, 1996). Además, se debe considerar que esta propiedad también esta influenciad por la cantidad de amilopectina presente, la cual suele degradarse con la germinación y de esa manera afectar la capacidad de hinchamiento cuando se incrementa el tiempo del proceso (Li *et al.*, 2017; Gutierrez-Osnaya *et al.*, 2020).

Obtener harinas con una elevada capacidad de hinchamiento permite el desarrollo de alimentos con elevado contenido de humedad evitando la sinéresis del producto final prolongando la vida de anaquel por la baja disponibilidad de agua, así como mejorar la viscosidad y textura del producto final (Waldia, 1996).

Tabla 7. *Capacidad de hinchamiento de Lupinus angustifolius germinado y sin germinar*

Día de Germinación	CH mL/g
0	4.16±0.01 ^b
3	8.15±0.12 ^a
5	8.25±0.24 ^a
7	2.14±0.09 ^c

Los resultados son el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar.

Las letras a-c indican la comparación de medias entre la misma muestra.

Las muestras con la misma letra no presentaron diferencias significativas con la prueba de Tukey (p <0.05)

*Base seca

5.4 Digestibilidad de las harinas

La proteína ha jugado un rol importante en la modificación de las propiedades físicas durante la germinación, sin embargo, su digestibilidad no se vio afectada por el proceso germinativo. En la Tabla 8 se muestra que no se encontró diferencia significativa debido al efecto de germinación en las muestras ($p > 0.05$); Chaparro-Rojas *et al.*, (2010) informaron un comportamiento similar de soya germinada durante 48 h. Setia *et al.*, (2019) reportaron pequeña disminución a los 3 días de germinación de 1.6 y 3.07% en guisante amarillo y haba respectivamente.

Esto puede deberse a la presencia de péptidos que son resistentes a las enzimas proteolíticas (Chang *et al.*, 1988). Además, la presencia de compuestos antinutricionales como los inhibidores de tripsina y ácido fítico pueden afectar la digestibilidad formando complejos con la proteína y evitando de esa manera su hidrólisis y por lo tanto su digestión.

Tabla 8. Digestibilidad proteica de Lupinus angustifolius germinado y sin germinar

Día de Germinación	% de digestibilidad
0	73.09±4.87 ^a
3	74.38±1.89 ^a
5	71.20±0.70 ^a
7	70.26±2.13 ^a

Los resultados son el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar.

Las letras a indican la comparación de medias entre la misma muestra.

Las muestras con la misma letra no presentaron diferencias significativas con la prueba de Tukey (p <0.05)

*Base seca

5.5 *Determinación de fitatos*

La Tabla 9 muestra el contenido de ácido fítico en *Lupinus angustifolius* germinado y sin germinar. La muestra sin germinar presentó una concentración de 3.06 mg/g de muestra y disminuyó 22.22% significativamente ($p < 0.05$) a partir del día 3 de germinación. La concentración se mantuvo constante hasta el día 7. Beal & Mehta, (1985) reportaron en germinados de chickpea por 10 días una reducción del 75% de ácido fítico; en *Phaseolus vulgaris* se ha reportado una de reducción del 96% durante 4 días de germinación (Shimelis & Rakshit, 2007). Aguilera *et al.*, (2013) evidenciaron que los fosfatos de inositol representan un 70% del fósforo contenido en leguminosas no convencionales y se han reportado reducciones del 18 y 15 % por efecto de la germinación en cowpea (*Vigna unguiculata*) y Jack vean (*Canavalia ensiformis*) a los cuatro días de germinación a 26°C .

Esto puede deberse a que el proceso de germinación disminuye de manera progresiva la concentración de dichos compuestos, debido a una desfosforilación enzimática de los fosfatos de inositol por la activación de fitasas endógenas cuyo efecto aumenta gradualmente con el tiempo de germinación (Sokrab *et al.*, 2012).

En las leguminosas existen dos tipos de fitasas que contribuyen a la reducción de los fitatos, una es denominada constitutiva y otra inductiva ya que es inducible por el proceso de germinación y/o un remojo previo del grano, ambas están relacionadas con la desfosforilación, sin embargo, la fitasa constitutiva comienza la hidrólisis durante los estadios primarios de la germinación, mientras que la fitasa inducible es sintetizada de novo durante la germinación a través de un ARNm preexistente (Greiner & Konietzny, 2006). Guzmán-Ortiz *et al.*, (2018) reportaron que la actividad de las fitasas es gradualmente reducida, probablemente como consecuencia de la degradación enzimática por proteasas activadas, lo que también

podría asociarse a que la concentración del ácido fítico se mantuvo constante después de un periodo de germinación.

El porcentaje de disminución en las muestras analizadas fue relativamente bajo en comparación a lo reportado por otros autores y no se evidencia una diferencia significativa ($p < 0.05$) cuando se prolonga el tiempo de germinación, esto se puede deber a que, bajo las condiciones de germinación utilizadas, no se está sintetizando la fitasa inductiva. Lo que se relaciona con la digestibilidad de proteína, debido a que las condiciones de germinación no permitieron una degradación de los fitatos y estos pareciera que formaron complejos evitando incrementar la digestibilidad de la proteína (Tabla 8), ya que, en estudios *in vitro* se ha demostrado que los fitatos afectan negativamente las enzimas proteolíticas pancreáticas.

Tabla 9. Concentración de ácido fítico en *Lupinus angustifolius* germinado y sin germinar

Día de germinación	mg *EFS/g
0	3.06±0.03 ^a
3	2.38±0.05 ^b
5	2.50±0.09 ^b
7	2.59±0.15 ^b

Los resultados son el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar.

Las letras a-b indican la comparación de medias entre la misma muestra.

Las muestras con la misma letra no presentaron diferencias significativas con la prueba de Tukey (p <0.05)

*Equivalentes de fitato de sodio

5.6 Cuantificación de inhibidores de tripsina

En la Tabla 10 se observan los valores de la actividad de inhibidores de tripsina de *Lupinus angustifolius* germinado y sin germinar. Se observó que la muestra sin germinar presentó valores de 34.64 unidades inhibidoras de tripsina (UTI)/ g de muestra, el proceso de germinación demostró tener un efecto positivo desde el día 3 de germinación, generando una disminución significativa ($p < 0.05$) conforme se aumenta el tiempo de germinación. La disminución fue hasta de un 77.36% al día 7 de germinación. de la Rosa-Millán *et al.*, (2018), no reportaron modificación en la actividad de inhibidores de tripsina con la germinación en black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Sin embargo, Shimelis *et al.*, (2007) observaron una disminución de 15.25% en kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germinado por 4 días. Kumar *et al.*, (2006) encontraron una disminución de 45.65% en soya germinada a 25°C por 6 días, el porcentaje de reducción fue más alto cuando germinaron a 35°C, reportaron una disminución de 62.08%. Trugo *et al.*, (2000) reportaron en *Phaseolus vulgaris* y soya *Glycine max* una reducción de 20 y 25% respectivamente a los 2 días de germinación.

El porcentaje de disminución puede variar dependiendo de las condiciones de germinación y el tipo de leguminosa. Según Vidal-Valverde *et al.*, (1994) y Frías *et al.*, (1995) esto es probable a que los inhibidores se utilizan como fuente de energía para el desarrollo de las plántulas. A pesar que la actividad de inhibidores de tripsina disminuye significativamente con la germinación, no se observó un impacto en la digestibilidad de la proteína esto puede ser por la concentración de ácido fítico que pueden estar formando complejos con la proteína (Tabla 9).

Tabla 10. Unidades inhibidoras de tripsina en *Lupinus angustifolius* germinado y sin germinar

Día de germinación	UTI/g
0	34.64±0.33 ^a
3	26.32±0.79 ^b
5	17.92±0.45 ^c
7	7.84±0.67 ^d

Los resultados son el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar.

Las letras a-d indican la comparación de medias entre la misma muestra.

Las muestras con la misma letra no presentaron diferencias significativas con la prueba de Tukey (p <0.05)

6. CONCLUSIONES

La germinación resulto un método efectivo para obtener harinas con diferentes propiedades tecnofuncionales a partir de *Lupinus angustifolius* y potenciar el valor nutricional en comparación con la harina no germinada. La capacidad de absorción de agua y aceite, así como la capacidad de emulsión y espuma aumentaron, con la germinación. Esto permite ampliar las alternativas de su uso como ingrediente modificado en el desarrollo de alimentos con carácter funcional.

El contenido de proteína aumento de manera significativa desde el día 3 de germinación convirtiendo a la semilla en una excelente fuente de proteína vegetal, además, se evidencia una hidrólisis proteica, generando fracciones peptídicas de menor peso molecular con posibles funciones biológicas, estudios son requeridos para evidenciarlo.

Los resultados revelaron que la germinación bajo estas condiciones no tiene efecto sobre la digestibilidad proteica por la presencia de compuestos antinutricionales como inhibidores de tripsina y fitatos, a pesar que los inhibidores de tripsina disminuyeron con la germinación no presentaron impacto en la digestibilidad. La concentración de ácido fítico se mantuvo constante a partir del día 3 hasta el día 7 de germinación lo que influye en la digestibilidad de la proteína. Tres días de germinación en *Lupinus* son necesarios para observar cambios en la funcionalidad de las harinas. Prolongar el tiempo del proceso puede sugerirse dependiendo la aplicación de las harinas obtenidas.

Evaluar técnicas económicas y eficaces que mejoren las propiedades tecnológicas y nutricionales de las harinas permite diversificar y potenciar su uso en la industria de los alimentos, ya que de acuerdo a la modificación de sus propiedades serán ideales para su aplicación en el desarrollo de alimentos.

7. PERSPECTIVAS

- Se propone realizar estudios de proteómica para purificar, identificar y secuenciar posibles péptidos con diversas funcionalidades biológicas principalmente efecto antioxidante y anti adipogénico.
- Se propone evaluar dichos efectos biológicos en un modelo animal para evaluar la estabilidad y eficacia de los péptidos obtenidos.

8. REFERENCIAS

- Abdel-Fatah, O. M., Erdmann, V. A., Lippmann, C., Ahmed, F. A. R., & Abdel Rahim, E. A. M. (1995). Effect of germination on the ribonucleic acids (RNA) of some legume seeds (*Vicia faba*, *Cicer arietinum* and *Lupinus termis*). *Food chemistry*, 52(4), 427-432.
- Abdelrahman, S. M., El Maki, H. B., Idris, W. H., Hassan, A. B., Babiker, E. E., El Tinay A. H. (2007). "Antinutritional factors content and hydrochloric acid extractability of minerals in pearl millet cultivars as affected by germination Int." *Journal of Food of Science and Nutrition* 1: 6-17.
- Adebowale, K. O., & Lawal, O. S. (2004). Comparative study of the functional properties of bambarra groundnut (*Voandzeia subterranean*), jack bean (*Canavalia ensiformis*) and mucuna bean (*Mucuna pruriens*) flours. *Food Research International*, 37(4), 355-365. 10.1016/j.foodres.2004.01.009
- Adjei-Twum, D. C., Splittstoesser, W. E., & Vandemark, J. S. (1976). *Use of soybeans as sprouts*.
- Aguilera Gutiérrez, Y. (2010). Harinas de leguminosas deshidratadas: caracterización nutricional y valoración de sus propiedades tecnofuncionales.
- Aguilera, Y., Díaz, M. F., Jiménez, T., Benítez, V., Herrera, T., Cuadrado, C., Martín-Cabrejas, M. A. (2013). "Changes in nonnutritional factors and antioxidant activity during germination of nonconventional legumes." *Journal of agricultural and food chemistry* 61: 8120-8125.
- Ahmad, S., & Pathak, D. K. (2000). Nutritional changes in soybean during germination. *Journal of Food Science and Technology (Mysore)*, 37(6), 665-666.

- Ahmed, F. A. R., Abdel-Rahim, E. A. M., Abdel-Fatah, O. M., Erdmann, V. A., & Lippmann, C. (1995). The changes of protein patterns during one week of germination of some legume seeds and roots. *Food chemistry*, 52(4), 433-437.
- 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.
- Alonso, R., Aguirre, A. and 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: 159-165.
- Alonso, R., Orúe, E., and Marzo, F. (1998). "Effects of extrusion and conventional processing methods on protein and antinutritional factor contents in pea seeds." *Food Chemistry* 63: 505-512.
- Anderson, J. W., & Major, A. W. (2002). Pulses and lipaemia, short-and long-term effect: potential in the prevention of cardiovascular disease. *British Journal of Nutrition*, 88(S3), 263-271.
- AOAC (2000). *Official methods of analysis* (16th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemist.
- Atlaw, T. K., Kumar, J. Y., & Satheesh, N. (2018). Effect of Germination on Nutritional Composition and Functional Properties of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* Linn) Seed Flour. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 7(3), 110. 10.11648/j.ijnfs.20180703.15
- Azcón-Bieto, J.; Talón, M. (2008). *Fundamentos de fisiología vegetal*. 2^a Ed. Publicacions i Edicions. Universitat de Barcelona.

- Azeke, M. A., Egielewa, S. J., Eigbogbo, M. U., and Ihimire, I. G. (2011). "Effect of germination on the phytase activity, phytate and total phosphorus contents of rice (*Oryza sativa*), maize (*Zea mays*), millet (*Panicum miliaceum*), sorghum (*Sorghum bicolor*) and wheat (*Triticum aestivum*)." *Journal of Food Science and Technology*, 48, 724-729.
- Bartholomai, G. B., Tosi, E., & González, R. (2000). Caracterización de compuestos nutritivos, no nutritivos y calidad proteica. *Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Editorial Eudeba, Buenos Aires, Argentina*, 65-67.
- Bartolome, B., Estrella, I., & Hernandez, M. T. (2000). Interaction of low molecular weight phenolics with proteins (BSA). *Journal of food science*, 65(4), 617-621.
- Bau, H. M., Villaume, C. H., & Mejean, L. (2000). Effects of soybean (*Glycine max*) germination on biologically active components, nutritional values of seeds, and biological characteristics in rats. *Food/Nahrung*, 44(1), 2-6.
- Bau, H. M., Villaume, C., Nicolas, J. P., & Méjean, L. (1997). Effect of germination on chemical composition, biochemical constituents and antinutritional factors of soya bean (*Glycine max*) seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73(1), 1-9.
- Baumgartner, B., & Chrispeels, M. J. (1976). Partial characterization of a protease inhibitor which inhibits the major endopeptidase present in the cotyledons of mung beans. *Plant Physiology*, 58(1), 1-6.
- Beal, L., Mehta, T. (1985). "Zinc and phytate distribution in peas, influence of heat treatment, germination, pH, substrate, and phosphorus on pea phytate and phytase." *Journal of Food Science* 50: 96-100.
- Belitz, H. D., & Grosch, W. (1997). *Química de los alimentos*. Editorial Acribia. Zaragoza. España, 1087.

- Benítez, V., Cantera, S., Aguilera, Y., Mollá, E., Esteban, R. M., Díaz, M. F., & Martín-Cabrejas, M. A. (2013). Impact of germination on starch, dietary fiber and physicochemical properties in non-conventional legumes. *Food Research International*, 50(1), 64-69. 10.1016/j.foodres.2012.09.044
- Bewley J.D. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*. American Society of Plant Physiologists,
- Bhatty, R. S. (1977). Trypsin inhibitor activity in faba beans (*Vicia faba* var. minor), changes during germination and distribution. *Canadian Journal of Plant Science*, 57(3), 979-982.
- Birk, Y. (1968). Chemistry and nutritional significance of proteinase inhibitors from plant sources. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 146(2), 388-399.
- Botha, F. C., Potgieter, G. P., & Botha, A. M. (1992). Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. *Plant Growth Regulation*, 11(3), 211-224.
- Bowman, D. E. (1946). Differentiation of soy bean antitryptic factors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 63(3), 547-550.
- Brett, C., & Waldron, K. (1990). Physiology and biochemistry of plant cell walls. Topics in Plant Physiol 2. *Unwin Hyman ISBN: 0, 4(581034)*, 6.
- Briarty, L. G., Coult, D. A., & Boulter, D. (1970). Protein bodies of germinating seeds of *Vicia faba*: Changes in fine structure and biochemistry. *Journal of Experimental Botany*, 513-524.
- Brinch-Pedersen, H., Sørensen, L. D., & Holm, P. B. (2002). Engineering crop plants: getting a handle on phosphate. *Trends in plant science*, 7(3), 118-125.
- Burgos-Díaz, C., Piornos, J. A., Wandersleben, T., Ogura, T., Hernández, X., & Rubilar, M. (2016). Emulsifying and foaming properties of different protein fractions obtained

from a novel lupin variety *AluProt*-CGNA® (*Lupinus luteus*). *Journal of Food Science*, 81(7), C1699-C1706. 10.1111/1750-3841.13350

Butt, M. S., & Batool, R. (2010). Nutritional and functional properties of some promising legumes protein isolates. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(4), 373-379. 10.3923/pjn.2010.373.379

Cano-Medina, A., Jiménez-Islas, H., Dendooven, L., Herrera, R. P., González-Alatorre, G., & Escamilla-Silva, E. M. (2011). Emulsifying and foaming capacity and emulsion and foam stability of sesame protein concentrates. *Food Research International*, 44(3), 684-692. 0.1016/j.foodres.2010.12.015

Carbonaro, M., Grant, G., Cappelloni, M., & Pusztai, A. (2000). Perspectives into factors limiting in vivo digestion of legume proteins: antinutritional compounds or storage proteins?. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 48(3), 742-749.

Carrouee, B., Ellis, N., Jensen, E. S., & Schneider, A. (2002). The benefits of grain legumes for an environment-friendly and sustainable European agriculture. *Grain legumes*, (36), 21-23.

Cecconi, O., Nelson, R. M., Roberts, W. G., Hanasaki, K., Mannori, G., Schultz, C., ... & Bevilacqua, M. P. (1994). Inositol polyanions. Noncarbohydrate inhibitors of L- and P-selectin that block inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 269(21), 15060-15066.

Champ, M. M. J. (2002). Non-nutrient bioactive substances of pulses. *British Journal of Nutrition*, 88(S3), 307-319.

Chang, K. C., & Harrold, R. L. (1988). Changes in selected biochemical components, in vitro protein digestibility and amino acids in two bean cultivars during

germination. *Journal of Food Science*, 53(3), 783-787. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb08955.x>

Chaparro-Rojas, D. C., Portilla, P., Elizalde-Correa, A., Vivas-Quila, N. J., & Erazo-Caizedo, C. A. (2010). Efecto de la germinación sobre el contenido y digestibilidad de proteína en semillas de amaranto, quinua, soya y guandul. *Bioteología en el sector agropecuario y agroindustrial*.

Chau, C. F., & Cheung, P. K. (1997). Effect of various processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch of two Chinese indigenous legume seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), 4773-4776.

Chau, C. F., Cheung, P. C., & Wong, Y. S. (1997). Functional properties of protein concentrates from three Chinese indigenous legume seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2500-2503. <https://doi.org/10.1021/jf970047c>

Chinma, C. E., Adewuyi, O., & Abu, J. O. (2009). Effect of germination on the chemical, functional and pasting properties of flour from brown and yellow varieties of tigernut (*Cyperus esculentus*). *Food Research International*, 42(8), 1004-1009. [10.1016/j.foodres.2009.04.024](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.04.024)

Chitra, U., Singh, U., Rao P. V. (1996). "Phytic acid, in vitro protein digestibility, dietary fiber, and minerals of pulses as influenced by processing methods." *Plant Foods for Human Nutrition* 49: 307-316.

Clemente, A., MacKenzie, D. A., Johnson, I. T., & Domoney, C. (2004). Investigation of legume seed protease inhibitors as potential anti-carcinogenic proteins. *Publication-European Association for Animal Production*, 110, 137-142.

Cosgrove, D. J., & Irving, G. C. J. (1980). *Inositol phosphates: their chemistry, biochemistry, and physiology* (Vol. 4). Elsevier Science & Technology.

- Coulibaly, A., Kouakou, B., Chen, J. (2011). Phytic acid in cereal grains: Healthy or harmful ways to reduce phytic acid in cereal grains and their effects on nutritional quality. *Am J plant Nutr Fert Technol*, 1, 1-22.
- Crans, D. C., Mikuš, M., & Frieauf, R. B. (1995). Phytate Metabolism in Bean Seedlings during Post-Germinative Growth. *Journal of plant physiology*, 145(1-2), 101-107.
- Cubero, J.I.; Moreno, M.T. (1983). Leguminosas de grano. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España, 31-47
- Datta, K., Usha, R., Dutta, S. K., & Singh, M. (2001). A comparative study of the winged bean protease inhibitors and their interaction with proteases. *Plant physiology and biochemistry*, 39(11), 949-959.
- de la Rosa-Millán, J., Heredia-Olea, E., Pérez-Carrillo, E., Guajardo-Flores, D., & Serna-Saldívar, S. R. O. (2019). Effect of decortication, germination and extrusion on physicochemical and in vitro protein and starch digestion characteristics of black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *LWT-Food Science and Technology*, 102, 330-337. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.039>
- Deshpande, S. S., & DAMODARAN, S. (1989). Structure-digestibility relationship of legume 7S proteins. *Journal of Food Science*, 54(1), 108-113.
- Dierking, E. C., & Bilyeu, K. D. (2009). Raffinose and stachyose metabolism are not required for efficient soybean seed germination. *Journal of Plant Physiology*, 166(12), 1329-1335.
- Domoney C. (1999). Inhibitors of legume seeds. En: Seed Proteins. Shewry P.R. y Casey (Eds.). Netherlands: Kluwer Academic Publishers., 697-719.
- Dueñas, M., Hernández, T., Estrella, I., & Fernández, D. (2009). Germination as a process to increase the polyphenol content and antioxidant activity of lupin seeds (*Lupinus angustifolius* L.). *Food chemistry*, 117(4), 599-607.

- Duranti, M. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77(2), 67-82.
- Duranti, M., & Morazzoni, P. (2011). Nutraceutical properties of lupin seed proteins. *A great potential still waiting for full exploitation. AgroFood Ind. Hi-Tech*, 22, 20.
- Duranti, M., Consonni, A., Magni, C., Sessa, F., & Scarafoni, A. (2008). The major proteins of lupin seed: characterization and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 19(12), 624-633. 10.1016/j.tifs.2008.07.002
- Duranti, M., Scarafoni, A., Di Cataldo, A., & Sessa, F. (2001). Interaction of metal ions with lupin seed conglutin γ . *Phytochemistry*, 56(6), 529-533.
- Echendu, C. A., Obizoba, I. C., & Anyika, J. U. (2009). Effects of germination on chemical composition of groundbean (*Kerstingiella geocarpa* harm) seeds. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(12), 1849-1854. 10.3923/pjn.2009.1849.1854
- Egli, I., Davidsson, L., Juillerat, M. A., Barclay, D., & Hurrell, R. F. (2002). The influence of soaking and germination on the phytase activity and phytic acid content of grains and seeds potentially useful for complementary feedin. *Journal of food science*, 67(9), 3484-3488.
- Elbaloula, M. F., Yang, R., Guo, Q., & Gu, Z. (2014). Major nutrient compositions and functional properties of sorghum flour at 0–3 days of grain germination. *International journal of food sciences and nutrition*, 65(1), 48-52. 10.3109/09637486.2013.836736
- Elkhalifa, A. E. O., & Bernhardt, R. (2010). Influence of grain germination on functional properties of sorghum flour. *Food Chemistry*, 121(2), 387-392. 10.1016/j.foodchem.2009.12.041

- El-Mahdy, A. R., Moharram, Y. G., Abou-Samaha O. R. (1985). "Influence of germination on the nutritional quality of lentil seeds." *Z. Lebensm Unters Forsch* 181: 318-320.
- Erbaş, M., Certel, M., & Uslu, M. K. (2005). Some chemical properties of white lupin seeds (*Lupinus albus* L.). *Food chemistry*, 89(3), 341-345.
- Evans, W. J., & Martin, C. J. (1988). Heat of complex formation of Al (III) and Cd (II) with phytic acid. IX. *Journal of inorganic biochemistry*, 34(1), 11-18.
- Evans, W. J., & Pierce Jr, A. G. (1982). Interaction of phytic acid with the metal ions, copper (II), cobalt (II), iron (III), magnesium (II), and manganese (II). *Journal of Food Science*, 47(3), 1014-1015.
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2010). El estado mundial de la agricultura y la alimentación – Las mujeres en la agricultura. Cerrar la brecha de género en áreas de desarrollo. In: <http://www.fao.org/publications/sofa/es/>
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2005). Legumbres: tendencias registradas en el pasado y perspectivas para el futuro. Perspectivas alimentarias – sistema mundial de información y alerta sobre la agricultura y alimentación (SMIA). N° 4. In: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/008/j6801s/j6801s00.pdf>
- Fernandes, A. O., & Banerji, A. P. (1995). Inhibition of benzopyrene-induced forestomach tumors by field bean protease inhibitor (s). *Carcinogenesis*, 16(8), 1843-1846.
- Fernández, M., Aranda, P., López-Jurado, M., García-Fuentes, M. A., & Urbano, G. (1997). Bioavailability of phytic acid phosphorus in processed *Vicia faba* L. var. Major. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(11), 4367-4371.

- Fernandez-Orozco, R., Frias, J., Zielinski, H., Piskula, M. K., Kozłowska, H., & Vidal-Valverde, C. (2008). Kinetic study of the antioxidant compounds and antioxidant capacity during germination of *Vigna radiata* cv. emerald, *Glycine max* cv. jutro and *Glycine max* cv. merit. *Food Chemistry*, 111(3), 622-630.
- Fernandez-Orozco, R., Piskula, M. K., Zielinski, H., Kozłowska, H., Frias, J., & Vidal-Valverde, C. (2006). Germination as a process to improve the antioxidant capacity of *Lupinus angustifolius* L. var. Zapaton. *European Food Research and Technology*, 223(4), 495. 10.1007/s00217-00502291
- Fernandez-Orozco, R., Zieliński, H., & Piskula, M. K. (2003). Contribution of low-molecular-weight antioxidants to the antioxidant capacity of raw and processed lentil seeds. *Food/Nahrung*, 47(5), 291-299.
- Fouad A. A., & Rehab F. M. A. (2015). Effect of germination time on proximate analysis, bioactive compounds and antioxidant activity of lentil (*Lens culinaris* Medik.) sprouts. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 14 (3), 233-246. 10.17306/J.AFS.2015.3.25
- Frias, J., Diaz-Pollan, C., Hedley, C. L., & Vidal-Valverde, C. (1995). Evolution of trypsin inhibitor activity during germination of lentils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(8), 2231-2234. 10.1021/jf00056a049
- Frias, J., Fernandez-Orozco, R., Zielinski, H., Piskula, M., Kozłowska, H., & Vidal-Valverde, C. (2002). Effect of germination on the content of vitamins C and E of lentils. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 11(SPEC; ISS 1), 76-78.
- Friedman, M., & Brandon, D. L. (2001). Nutritional and health benefits of soy proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1069-1086.
- Fukui, K., Tachibana, N., Wanezaki, S., Tsuzaki, S., Takamatsu, K., Yamamoto, T., ... & Shimoda, T. (2002). Isoflavone-free soy protein prepared by column

chromatography reduces plasma cholesterol in rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(20), 5717-5721.

Gabard, K. A., & Jones, R. L. (1986). Localization of phytase and acid phosphatase isoenzymes in aleurone layers of barley. *Physiologia plantarum*, 67(2), 182-192.

García-Agustín P., Primo-Millo, E. (1993). Germinación de las semillas. En: Fisiología y Bioquímica Vegetal, Azcon-Bieto J., Talon M. (Eds), España, McGraw Hill Interamericana, 419-433.

Ghavidel, R. A., & Prakash, J. (2006). Effect of germination and dehulling on functional properties of legume flours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(8), 1189-1195. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2460>

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.

Ghorpade V.M., Kadam S.S. (1989). Germination. En: Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilitation. Vol. III. Salunkhe D.K., Kadam S.S., (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU, 165-176.

Ghumman, A., Kaur, A., & Singh, N. (2016). Impact of germination on flour, protein and starch characteristics of lentil (*Lens culinari*) and horsegram (*Macrotyloma uniflorum* L.) lines. *LWT- Food Science and Technology*, 65, 137-144. [10.1016/j.lwt.2015.07.075](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.075)

Gibson, D. M., & Ullah, A. B. J. (1990). Phytases and their action on phytic acid. *Plant biology (USA)*.

- Giri, A. P., Harsulkar, A. M., Deshpande, V. V., Sainani, M. N., Gupta, V. S., & Ranjekar, P. K. (1998). Chickpea defensive proteinase inhibitors can be inactivated by podborer gut proteinases. *Plant Physiology*, 116(1), 393-401.
- Graf, E., Empson, K. L., & Eaton, J. W. (1987). Phytic acid. A natural antioxidant. *Journal of Biological Chemistry*, 262(24), 11647-11650.
- Grant, G. (1989). Anti-nutritional effects of soyabean: a review. *Progress in food & nutrition science*, 13(3-4), 317.
- Greenwood, J. S., & Bewley, J. D. (1984). Subcellular distribution of phytin in the endosperm of developing castor bean: a possibility for its synthesis in the cytoplasm prior to deposition within protein bodies. *Planta*, 160(2), 113-120.
- Greiner, R. A. L. F., & Konietzny, U. R. S. U. L. A. (2010). Phytases: biochemistry, enzymology and characteristics relevant to animal feed use. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*, 96-128. 10.1079/9781845936747.0096
- Greiner, R., & Konietzny, U. (2006). Phytase for Food Application Phytase for Food Application. *Food Technology Biotechnolohy*, 44, 125-140.
- Greiner, R., Muzquiz, M., Burbano, C., Cuadrado, C., Pedrosa, M. M., & Goyoaga, C. (2001). Purification and characterization of a phytate-degrading enzyme from germinated faba beans (*Vicia faba* var. Alameda). *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(5), 2234-2240.
- Griffiths, D. W., & Ramsay, G. (1996). The distribution of pyrimidinone glucosides in developing seedlings of *Vicia faba* and *Vicia narbonensis*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72(4), 469-475.
- Griffiths, D. W., & Thomas, T. A. (1981). Phytate and total phosphorus content of field beans (*Vicia faba* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 32(2), 187-192.

- Gulewicz, P., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., Ciesiołka, D., Gulewicz, K., & Vidal-Valverde, C. (2008). Effect of germination on the protein fraction composition of different lupin seeds. *Food Chemistry*, 107(2), 830-844. [10.1016/j.foodchem.2007.08.087](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.087)
- Gupta, P., Dhawan, K., Malhotra, S. P., & Singh, R. (2000). Purification and characterization of trypsin inhibitor from seeds of faba bean (*Vicia faba* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 22(4), 433-438.
- Gupta, R. K., & Gangoliya, S. S. (2015). Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains, 52(February), 676-684.
- Gutiérrez-Osnaya, L. J., Hernández-Uribe, J. P., Castro-Rosas, J., Román-Gutiérrez, A. D., Camacho-Díaz, B. H., Palma-Rodríguez, H. M., ... & Guzmán-Ortiz, F. A. (2020). Influence of germination time on the morphological, morphometric, structural, and physicochemical characteristics of Esmeralda and Perla barley starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, 262270. [10.1016/j.ijbiomac.2020.01.245](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.245)
- Guzmán-Ortiz, F. A., Castro-Rosas, J., Gómez-Aldapa, C. A., Mora-Escobedo, R., Rojas-León, A., Rodríguez-Marín, M. L., ... & Román-Gutiérrez, A. D. (2019). Enzyme activity during germination of different cereals: A review. *Food Reviews International*, 35(3), 177-200. [10.1080/87559129.2018.1514623](https://doi.org/10.1080/87559129.2018.1514623).
- Guzmán-Ortiz, F. A., San Martín-Martínez, E., Valverde, M. E., Rodríguez-Aza, Y., Berríos, J. D. J., & Mora-Escobedo, R. (2017). Profile analysis and correlation across phenolic compounds, isoflavones and antioxidant capacity during germination of soybeans (*Glycine max* L.). *CyTA-Journal of Food*, 15(4), 516-524. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1302995>

- Hajos, G., Gelencsér, E., Grant, G., Bardocz, S., Sakhri, M., Duguid, T. J., ... & Pusztai, A. (1996). Effect of proteolytic modification and methionine enrichment on the nutritional value of soya albumins for rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(9), 481-487.
- Hedemann, M. S., Welham, T., Boisen, S., Canibe, N., Bilham, L., & Domoney, C. (1999). Studies on the biological responses of rats to seed trypsin inhibitors using near-isogenic lines of *Pisum sativum* L (pea). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(12), 1647-1653.
- Hegazy, M. I., & Marquardt, R. R. (1983). Development of a simple procedure for the complete extraction of vicine and convicine from fababeans (*Vicia faba*? L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34(1), 100-108.
- Hobday, S. M., Thurman, D. A., Barber D. J. (1973). "Proteolytic and trypsin inhibitory activities in extracts of germinating *Pisum sativum* seeds." *Phytochemic* 12: 1041-1046
- Honke, J., Kozłowska, H., Vidal-Valverde, C., Frias, J., & Górecki, R. (1998). Changes in quantities of inositol phosphates during maturation and germination of legume seeds. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 206(4), 279-283.
- Hsu, D. L., DL, H., & MM, M. (1982). Effect of germination on electrophoretic, functional, and bread-baking properties of yellow pea, lentil, and faba bean protein isolates. *Cereal Chemistry*, 59(5), 344-350.
- Jamalian, J. (1999). Removal of favism-inducing factors vicine and convicine and the associated effects on the protein content and digestibility of fababeans (*Vicia faba* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(13), 1909-1914.
- Jan, R., Saxena, D. C., and Singh, S. (2017). "Analyzing the effect of optimization conditions of germination on the antioxidant activity, total phenolics, and antinutri-tional

factors of *Chenopodium* (*Chenopodium album*).” *Journal of Food Measurement and Characterization* 11: 256-264.

Janzen, D. H., Ryan, C. A., Liener, I. E., & Pearce, G. (1986). Potentially defensive proteins in mature seeds of 59 species of tropical Leguminosae. *Journal of chemical ecology*, 12(6), 1469-1480.

Kakade, M. L., Simons, N. R. & Liener, I. E., (1970). The molecular weight of the Bowman-Birk soybean protease inhibitor. *Biochimicaet Biophysica Acta*, 200:168-169. 10.1016/0005-2795(70)90055-3

Kamalakaran, V., Sathyamoorthy, A. V., Motlag, D. B. (1981). “Studies on black gram (*Vigna mungo*) trypsin inhibitor.” *Journal of Science and Food Agriculture* 32: 1172-1176.

Kasprowicz-Potocka, M., Chilomer, K., Zaworska, A., Nowak, W., & Frankiewicz, A. (2013). The effect of feeding raw and germinated *Lupinus luteus* and *Lupinus angustifolius* seeds on the growth performance of young pigs. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 22(2), 112-121. <https://doi.org/10.22358/jafs/66001/2013>

Kaur, M., Sandhu, K. S., Ahlawat, R., & Sharma, S. (2015). In vitro starch digestibility, pasting and textural properties of mung bean: effect of different processing methods. *Journal of food science and technology*, 52(3), 1642-1648.

Kaushal, P., Kumar, V., & Sharma, H. K. (2012). Comparative study of physicochemical, functional, antinutritional and pasting properties of taro (*Colocasia esculenta*), rice (*Oryza sativa*) flour, pigeonpea (*Cajanus cajan*) flour and their blends. *LWT-Food Science and Technology*, 48(1), 59-68.

Kennedy, A. R. (1998). The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *The American journal of clinical nutrition*, 68(6), 1406S-1412S.

- Khalil, A. H., & Mansour, E. H. (1995). The effect of cooking, autoclaving and germination on the nutritional quality of faba beans. *Food Chemistry*, 54(2), 177-182.
- Khan, M. K., Karnpanit, W., Nasar-Abbas, S. M., Huma, Z. E., & Jayasena, V. (2015). Phytochemical composition and bioactivities of lupin: a review. *International journal of food science & technology*, 50(9), 2004-2012.
- Khatab, R. Y., and Arntfield, S. D. (2009). "Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments 2. Antinutritional factors." *LWT- Food Science and Technology* 42: 1113-1118.
- Khetarpaul, N. and Chauhan, B. M. (1990). "Effect of germination and pure culture fermentation by yeasts and lactobacilli on phytic acid and polyphenols content of pearl millet." *Journal of Food Science* 55: 1180-1182.
- Khokhar, S., & Chauhan, B. M. (1986). Antinutritional factors in moth bean (*Vigna aconitifolia*): varietal differences and effects of methods of domestic processing and cooking. *Journal of Food Science*, 51(3), 591-594.
- Kinsella, J. E., & Melachouris, N. (1976). Functional properties of proteins in foods: a survey. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 7(3), 219-280.
- Knuckles, B. E., & Betschart, A. A. (1987). Effect of phytate and other myo-inositol phosphate esters on α -amylase digestion of starch. *Journal of Food Science*, 52(3), 719-721.
- Konietzny, U., & Greiner, R. (2002). *Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases)*, 791-812.
- Kumar, V., Rani, A., Pandey, V., & Chauhan, G. S. (2006). Changes in lipoxygenase isozymes and trypsin inhibitor activity in soybean during germination at different temperatures. *Food Chemistry*, 99(3), 563-568. 10.1016/j.foodchem.2005.08.024

- Kunitz, M. (1945). Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science*, 101(2635), 668-669.
- Kute, L. S., Kadam, S. S., & Salunkhe, D. K. (1984). Changes in sugars, starch and trypsin inhibitor activity in winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* L. DC) during seed development. *Journal of Food Science*, 49(1), 314-315.
- Laemmli, U. K. (1970). SDS-page Laemmli method. *Nature*, 227, 680-5. 10.21769/BioProtoc.80.
- Lallès, J. P., & Peltre, G. (1996). Lead Review Article Biochemical Features of Grain Legume Allergens in Humans and Animals. *Nutrition reviews*, 54(4), 101-107.
- Lam, J. M., Pwee, K. H., Sun, W. Q., Chua, Y. L., & Wang, X. J. (1999). Enzyme-stabilizing activity of seed trypsin inhibitors during desiccation. *Plant Science*, 142(2), 209-218.
- Latta, M., & Eskin, M. (1980). A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(6), 1313-1315. <https://doi.org/10.1021/jf60232a049>
- Lawal, O. S. (2004). Functionality of African locust bean (*Parkia biglobossa*) protein isolate: effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. *Food Chemistry*, 86(3), 345-355. 10.1016/j.foodchem.2003.09.036
- Li, C., Oh, S. G., Lee, D. H., Baik, H. W., & Chung, H. J. (2017). Effect of germination on the structures and physicochemical properties of starches from brown rice, oat, sorghum, and millet. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 931-939. 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.123
- Liener I.E., Kakade M.L. (1980). Protease inhibitors. En: Toxic Constituents of plant foodstuffs. Liener I.E. (Ed.). Academic Press, N Y, EEUU, 7-57.

- Liener, I. E. (1989). Antinutritional Factors. Legumes: Chemistry, Technology Human Nutrition. Ed. RH Matthews.
- Lin, P. Y., & Lai, H. M. (2006). Bioactive compounds in legumes and their germinated products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(11), 3807-3814.
- Linnemann, A. R., & Dijkstra, D. S. (2002). Toward sustainable production of protein-rich foods: appraisal of eight crops for Western Europe. Part I. Analysis of the primary links of the production chain. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(4), 377-401.
- Loewus, F. A., & Murthy, P. P. (2000). myo-Inositol metabolism in plants. *Plant science*, 150(1), 1-19.
- Lönnerdal, B. O., Sandberg, A. S., Sandström, B., & Kunz, C. (1989). Inhibitory effects of phytic acid and other inositol phosphates on zinc and calcium absorption in suckling rats. *The Journal of nutrition*, 119(2), 211-214.
- López Amorós, M. L. (2000). Estudio de compuestos fenólicos en legumbres. Influencia de la variedad y del proceso de germinación.
- Lott, J. N. A., & Buttrose, M. S. (1978). Globoids in protein bodies of legume seed cotyledons. *Functional Plant Biology*, 5(1), 89-111.
- Mahadevamma, S., & Tharanathan, R. N. (2004). Processing of legumes: resistant starch and dietary fiber contents. *Journal of Food Quality*, 27(4), 289-303.
- Makokha AO, Oniango RK, Njoroge SM, Kamar OK (2002). Effect of traditional fermentation and malting on phytic acid and mineral availability from sorghum (*Sorghum bicolor*) and finger millet (*Eleusine caracana*) grain varieties grown in Kenya. *Food Nutr Bull* 23:241-245.

- Mandal, N. C., Burman, S., Biswas, B. B. (1972). "Isolation, purification and characterization of phytase from germinating mung beans." *Phytochemistry* 11: 495-502.
- Martín-Cabrejas, M. A., Díaz, M. F., Aguilera, Y., Benítez, V., Mollá, E., & Esteban, R. M. (2008). Influence of germination on the soluble carbohydrates and dietary fibre fractions in non-conventional legumes. *Food Chemistry*, 107(3), 1045-1052.
- Martinez, M., Cambra, I., Carrillo, L., Diaz-Mendoza, M., & Diaz, I. (2009). Characterization of the entire cystatin gene family in barley and their target cathepsin L-like cysteine-proteases, partners in the hordein mobilization during seed germination. *Plant Physiology*, 151(3), 1531-1545. 10.1104/pp.109.146019
- Martínez-Villaluenga, C., Kuo, Y. H., Lambein, F., Frías, J., & Vidal-Valverde, C. (2006). Kinetics of free protein amino acids, free non-protein amino acids and trigonelline in soybean (*Glycine max* L.) and lupin (*Lupinus angustifolius* L.) sprouts. *European Food Research and Technology*, 224(2), 177-186.
- Masood, T., Shah, H. U., & Zeb, A. (2014). Effect of sprouting time on proximate composition and ascorbic acid level of mung bean (*Vigna radiate* L.) and chickpea (*Cicer Arietinum* L.) seeds. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 24(3), 850-859.
- Mazur, W. M., Duke, J. A., Wähälä, K., Rasku, S., & Adlercreutz, H. (1998). Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 9(4), 193-200.
- McCance, R. A., & Widdowson, E. M. (2014). *McCance and Widdowson's the Composition of Foods*. Royal Society of Chemistry.
- McGuinness, E. E., Morgan, R. G. H., Levison, D. A., Frape, D. L., Hopwood, D., & Wormsley, K. G. (1980). The effects of long-term feeding of soya flour on the rat pancreas. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 15(4), 497-502.

- MCWATTERS, K. H., & CHERRY, J. P. (1977). Emulsification, foaming and protein solubility properties of defatted soybean, peanut, field pea and pecan flours. *Journal of Food Science*, 42(6), 1444-1447.
- Megat Rusydi, M. R., Noraliza, C. W., Azrina, A., & Zulhairi, A. (2011). Nutritional changes in germinated legumes and rice varieties. *International Food Research Journal*, 18(2).
- Mendoza-Sánchez, M., Guevara-González, R. G., Castaño-Tostado, E., Mercado-Silva, E. M., Acosta-Gallegos, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., Reynoso-Camacho, R. (2016). "Effect of chemical stress on germination of cv Dalia bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as an alternative to increase antioxidant and nutraceutical compounds in sprouts." *Food chemistry* 212: 128-137
- Mensa-Wilmot, Y., Phillips, R.D., Hargrove, J.L., (2001). Protein quality evaluation of cowpea-based extrusion cooked cereal/legume weaning mixtures. *Nutrition Research* 21, 849–857. 10.1016/S0271-5317(01)00302-5
- Moreno, M. T. (1983). Las leguminosas de grano: una visión de conjunto. *Leguminosas de grano*. CUBERO, J.; MORENO, MT (Ed.). Madrid: Mundi-Prensa, 15-34.
- Mubarak, A. E. (2005). "Nutritional composition and antinutritional factors of mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional process." *Food Chemistry* 89: 489-495.
- Muranyi, I. S., Otto, C., Pickardt, C., Osen, R., Koehler, P., & Schweiggert-Weisz, U. (2016). Influence of the Isolation Method on the Technofunctional Properties of Protein Isolates from *Lupinus angustifolius* L. *Journal of Food Science*, 81(11), C2656-C2663. doi: 10.1111/1750-3841.13515
- Muri, M. A.; Luffs, J. B.; Lo-Sometz, H. (2004). Patent 2004/CN1498659.

- Muzquiz, M., & Wood, J. A. (2007). Antinutritional factors. *Chickpea breeding and management*, 143-166.
- Ndzondzi-Bokouango, G., Bau, H. M., Giannangeli, F., Debry, G. (1989). "Chemical composition and nutritive value of faba bean." *Sciences des Aliments* 9: 785-797.
- Nolan, K. B., Duffin, P. A., & McWeeny, D. J. (1987). Effects of phytate on mineral bioavailability. In vitro studies on Mg²⁺, Ca²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ (also Cd²⁺) solubilities in the presence of phytate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 40(1), 79-85.
- Norioka, N., Hara, S., Ikenaka, T., & Abe, J. (1988). Distribution of the Kunitz and the Bowman-Birk family proteinase inhibitors in leguminous seeds. *Agricultural and biological chemistry*, 52(5), 1245-1252.
- NORTON, G. (1991). Proteinase inhibitors. In *Toxic substances in crop plants* (pp. 68-106). Woodhead Publishing.
- O'Dell, B. L., & De Boland, A. (1976). Complexation of phytate with proteins and cations in corn germ and oil seed meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24(4), 804-808.
- Olalekan, A. J., & Bosede, B. F. (2010). Comparative study on chemical composition and functional properties of three Nigerian legumes (jack beans, pigeon pea and cowpea). *Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences*, 1(1), 89-95.
- Oneda, H., Lee, S., & Inouye, K. (2004). Inhibitory effect of 0.19 α -amylase inhibitor from wheat kernel on the activity of porcine pancreas α -amylase and its thermal stability. *The journal of biochemistry*, 135(3), 421-427.

- 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*.
- Pallauf, J., & Rimbach, G. (1997). Nutritional significance of phytic acid and phytase. *Archives of Animal Nutrition*, 50(4), 301-319.
- Pastor-Cavada, E., Juan, R., Pastor, J. E., Alaiz, M., & Vioque, J. (2009). Fatty acid distribution in the seed flour of wild Vicia species from Southern Spain. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(10), 977-983.
- Perez-Hidalgo, M. A., Guerra-Hernández, E., & García-Villanova, B. (1997). Dietary fiber in three raw legumes and processing effect on chick peas by an enzymatic-gravimetric method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10(1), 66-72.
- Persson, H., Türk, M., Nyman, M., & Sandberg, A. S. (1998). Binding of Cu²⁺, Zn²⁺, and Cd²⁺ to inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(8), 3194-3200.
- Pusztai, A. (1972). Metabolism of trypsin-inhibitory proteins in the germinating seeds of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Planta*, 107(2), 121-129.
- Pusztai, A., Bardocz, S., & Martín-Cabrejas, M. A. (2004). The mode of action of ANFs on the gastrointestinal tract and its microflora. *PUBLICATION-EUROPEAN ASSOCIATION FOR ANIMAL PRODUCTION*, 110, 87-100.
- Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C., & Job, D. (2012). Seed germination and vigor. *Annual review of plant biology*, 63, 507-533.
- Rangel, A., Domont, G. B., Pedrosa, C., & Ferreira, S. T. (2003). Functional properties of purified vicilins from cowpea (*Vigna unguiculata*) and pea (*Pisum sativum*) and

cowpea protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(19), 5792-5797. 10.1021/jf0340052

Rangel, A., Domont, G. B., Pedrosa, C., & Ferreira, S. T. (2003). Functional properties of purified vicilins from cowpea (*Vigna unguiculata*) and pea (*Pisum sativum*) and cowpea protein isolate. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(19), 5792-5797.

Rani, N., & Hira, K. C. (1993). Effect of various treatments on nutritional quality of faba beans (*Vicia faba*). *Journal of Food Science and Technology (India)*.

Rao, P. U., & Deosthale, Y. G. (1987). Polyphenoloxidase activity in germinated legume seeds. *Journal of Food Science*, 52(6), 1549-1551.

Ravindran, V. B. W. K. E., Bryden, W. L., & Kornegay, E. T. (1995). Phytates: occurrence, bioavailability and implications in poultry nutrition. *Poultry and Avian Biology Reviews*, 6(2), 125-143.

Rege, D. V. (1981). Nutritional aspects of legumes: Some research needs. In *Grain legumes: agronomy and crop improvement, processing and storage, marketing, and nutrition, proceedings of the workshop, New Delhi, January 1981/ed. and comp. AS Aiyar, KR Iyer*. Bombay, India: Protein Foods and Nutrition Development Association of India, 1981.

Rickard, S. E., & Thompson, L. U. (1997). Interactions and biological effects of phytic acid.

Robertson, J. A., de Monredon, F. D., Dysseler, P., Guillon, F., Amado, R., & Thibault, J. F. (2000). Hydration properties of dietary fibre and resistant starch: A European collaborative study. *LWT- Food Science and Technology*, 33(2), 72-79. 10.1006/fstl.1999.0595

Rodríguez García, R. (2004). Proteínas de defensa vegetal. *Cisteró Bahima A, Enrique Miranda E, editores. Reactividad cruzada en alergia a alimentos. Barcelona: MRA*, 93-104.

- Rosental, L., Nonogaki, H., & Fait, A. (2014). Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. *Seed science research*, 24(1), 1.
- Rubio, L. A., Rodríguez, J., Fernández, C., & Crespo, J. F. (2004). Storage proteins: physiological and antigenic effects. *PUBLICATION-EUROPEAN ASSOCIATION FOR ANIMAL PRODUCTION*, 110, 159-176.
- Rumiyati, R., James, A. P., & Jayasena, V. (2012). Effect of germination on the nutritional and protein profile of Australian sweet lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Food and Nutrition Sciences*, 621- 626. 10.13140/2.1.4437.4726
- Ryan, C. A. (1983). Wound-regulated synthesis and compartmentation of proteinase inhibitors in plant leaves. In *Structure and function of plant genomes* (pp. 337-346). Springer, Boston, MA.
- Saharan, K., Khetarpaul, N., Bishnoi, S. (2002). "Antinutrients and protein digestibility of fababean and ricebean as affected by soaking, dehulling and germination." *Journal of Food Science and Technology Mysore* 39: 418-422.
- Sandberg, A. S. (2002). Bioavailability of minerals in legumes. *British Journal of Nutrition*, 88(S3), 281-285.
- Sandberg, A. S., Brune, M., Carlsson, N. G., Hallberg, L., Skoglund, E., & Rossander-Hulthén, L. (1999). Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 70(2), 240-246.
- Sandström, B., & Sandberg, A. S. (1992). Inhibitory effects of isolated inositol phosphates on zinc absorption in humans. *Journal of Trace Elements and electrolytes in Health and Disease*, 6(2), 99-103.

- Sangronis, E., & Machado, C. J. (2007). Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. *LWT-Food Science and Technology*, 40(1), 116-120. 10.1016/j.lwt.2005.08.003
- Sartirana, M. L., Bianchetti, R. (1967). "The effects of phosphate on the development of phytase in the wheat embryo." *Physiology Plant* 20: 1066-1075.
- Sastry, M. S., & Murray, D. R. (1987). The contribution of trypsin inhibitors to the nutritional value of chick pea seed protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 40(3), 253-261.
- Savage, G. P., Thompson, D. R. (1993). Effect of processing on the trypsin inhibitor content and nutritive value of chickpeas (*Cicer arietinum*). En: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds: Proceedings of the 2th International Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds*, EAAP publication, Wageningen, The Netherlands, 435-440.
- Savelkoul, F. H. M. G., Van der Poel, A. F. B., & Tamminga, S. (1992). The presence and inactivation of trypsin inhibitors, tannins, lectins and amylase inhibitors in legume seeds during germination. A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 42(1), 71-85.
- Seenaa, S., & Sridhar, K. R. (2005). Physicochemical, functional and cooking properties of under explored legumes, *Canavalia* of the southwest coast of India. *Food Research International*, 38(7), 803- 814. 10.1016/j.foodres.2005.02.007
- Setia, R., Dai, Z., Nickerson, M. T., Sopiwnyk, E., Malcolmson, L., & Ai, Y. (2019). Impacts of short-term germination on the chemical compositions, technological characteristics and nutritional quality of yellow pea and faba bean flours. *Food Research International*, 122, 263-272.10.1016/j.foodres.2019.04.021

- Sgarbieri, V. C. (1998). Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 32(1), 105-126.
- Shamsuddin, A. M. (2002). Anti-cancer function of phytic acid. *International journal of food science & technology*, 37(7), 769-782.
- Sharma, S., Saxena, D. C., and Riar, C. S. (2015). "Antioxidant activity, total phenolics, flavonoids and antinutritional characteristics of germinated foxtail millet (*Setaria italica*)." *Cogent Food & Agriculture* 1: 1081728.
- Shi, L., Arntfield, S. D., and Nickerson, M. (2018). "Changes in levels of phytic acid, lectins and oxalates during soaking and cooking of Canadian pulses." *Food Research International* 107: 660-668.
- 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. 10.1016/j.foodchem.2006.08.005
- Singh, A. K., Rehal, J., Kaur, A., & Jyot, G. (2015). Enhancement of attributes of cereals by germination and fermentation: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(11), 1575-1589. 10.1080/10408398.2012.706661
- Singh, A., & Sharma, S. (2017). Bioactive components and functional properties of biologically activated cereal grains: A bibliographic review. *Critical Reviews in Food science and Nutrition*, 57(14), 3051-3071. 10.1080/10408398.2015.1085828
- Singh, A., Sharma, S., & Singh, B. (2017). Effect of germination time and temperature on the functionality and protein solubility of sorghum flour. *Journal of Cereal Science*, 76, 131-139. 10.1016/j.jcs.2017.06.003
- Skoglund, E., Carlsson, N. G., & Sandberg, A. S. (1997). Determination of isomers of inositol mono- to hexaphosphates in selected foods and intestinal contents using high-

performance ion chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(2), 431-436.

Sokrab, A. M., Ahmed, I. A. M., & Babiker, E. E. (2012). Effect of germination on antinutritional factors, total, and extractable minerals of high and low phytate corn (*Zea mays* L.) genotypes. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 11(2), 123-128. 10.1016/j.jssas.2012.02.002

Steer, T. E., & Gibson, G. R. (2002). The microbiology of phytic acid metabolism by gut bacteria and relevance for bowel cancer. *International journal of food science & technology*, 37(7), 783-790.

Subba Rau, B. H., & Srinivasan, K. S. (1988). Enzymatic modification of groundnut flour (by papain/protease) and its effect on functional properties. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 21(3), 126-130. <http://ir.cftri.com/id/eprint/1893>

Sujak, A., Kotlarz, A., & Strobel, W. (2006). Compositional and nutritional evaluation of several lupin seeds. *Food chemistry*, 98(4), 711-719.

Suzuki, H.; Sakane, I.; Hosoyama, H.; Sugimoto, A.; Nagata, K.; Tsunoda, T. (2003). Patent: 2003/JP2003095941.

Swieca, M., Baraniak, B., and Gawlik-Dziki, U. (2013). "In vitro digestibility and starch content, predicted glycemic index and potential in vitro antidiabetic effect of lentil sprouts obtained by different germination techniques." *Food Chemistry* 138, 1414-1420.

Tabekhia, M. M., & Luh, B. S. (1980). Effect of germination, cooking, and canning on phosphorus and phytate retention in dry beans. *Journal of Food Science*, 45(2), 406-408.

- Tamir, S., Bell, J., Finlay, T. H., Sakal, E., Smirnoff, P., Gaur, S., & Birk, Y. (1996). Isolation, characterization, and properties of a trypsin-chymotrypsin inhibitor from amaranth seeds. *Journal of protein chemistry*, 15(2), 219-229.
- Thompson, L. U. (1993). Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. *Food Research International*, 26(2), 131-149.
- THOMPSON, L. U., & YOON, J. H. (1984). Starch digestibility as affected by polyphenols and phytic acid. *Journal of food science*, 49(4), 1228-1229.
- Tinus, T., Damour, M., Van Riel, V., & Sopade, P. A. (2012). Particle size-starch-protein digestibility relationships in cowpea (*Vigna unguiculata*). *Journal of Food Engineering*, 113(2), 254-264. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.05.041>
- Toriya, M. E., & Díez, C. (1999). Legumbres. *Tratado de nutrición*, Hernández M., Sastre A.(Ed.), Ediciones Díaz de Santos, Madrid, España, 425-429.
- Troll, W., Frenkel, K., & Wiesner, R. (1987). Protease inhibitors: possible preventive agents of various types of cancer and their mechanisms of action. *Progress in clinical and biological research*, 239, 297.
- Trugo, L. C., Ramos, L. A., Trugo, N. M. F., Souza, M. C. P. (1990). "Oligosaccharide composition and trypsin inhibitor activity of *P. vulgaris* and the effect of germination on the α -galactoside composition and fermentation in the human colon." *Food Chemistry* 36: 53-61.
- Urbano, G., Lopez-Jurado, M., Aranda, P., Vidal-Valverde, C., Tenorio, E., & Porres, J. (2000). The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function?. *Journal of physiology and biochemistry*, 56(3), 283-294.

- Urbano, G., Lopez-Jurado, M., Hernandez, J., Fernandez, M., Moreu, M. C., Frias, J., ... & Vidal-Valverde, C. (1995). Nutritional assessment of raw, heated, and germinated lentils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(7), 1871-1877.
- Urbano, G., López-Jurado, M., Ławomir Frejnagel, S., Gómez-Villalva, E., Porres, J. M., Frías, J., ... & Aranda, P. (2005). Nutritional assessment of raw and germinated pea (*Pisum sativum* L.) protein and carbohydrate by in vitro and in vivo techniques. *Nutrition*, 21(2), 230-239.
- Vadivel, V., Stuetz, W., Scherbaum, V., and Biesalski, H. K. (2011). Total free phenolic content and health relevant functionality of Indian wild legume grains: Effect of indigenous processing methods. *Journal of Food Composition and Analysis* 24: 935-943.
- Vaintraub, I. A., & Lapteva, N. A. (1988). Colorimetric determination of phytate in unpurified extracts of seeds and the products of their processing. *Analytical Biochemistry*, 175(1), 227-230. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90382-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90382-X)
- Vallejo, M., Jackson, T., Lightman, S., & Hanley, M. R. (1987). Occurrence and extracellular actions of inositol pentakis- and hexakisphosphate in mammalian brain. *Nature*, 330(6149), 656-658.
- Vats, P., & Banerjee, U. C. (2004). *Production studies and catalytic properties of phytases an overview*, 35, 3-14.
- Vidal-Valverde, C., Frias, J., Estrella, I., Gorospe, M. J., Ruiz, R., & Bacon, J. (1994). Effect of processing on some antinutritional factors of lentils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(10), 2291-2295. <https://doi.org/10.1021/jf00046a039>
- Vidal-Valverde, C., Frías, J., Sierra, I., Blázquez, I., Lambein, F., & Kuo, Y.-H. (2002). New functional legume foods by germination: Effect on the nutritive value of beans,

lentils and peas. *European Food Research and Technology*, 215, 472–477.
10.1007/s00217-002-0602-2

Waldia, R. S., Singh, V. P., Sood, D. R., Sardana, P. K., & Mehla, I. S. (1996). Association and variation among cooking quality traits in kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Food Science and Technology (Mysore)*, 33(5), 397-402. 10.1007/s10681-010-0174-3

Wang, W., & De Mejia, E. G. (2005). A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 4(4), 63-78.

Warsy, A. S., Norton, G., & Stein, M. (1974). Protease inhibitors from broad bean isolation and purification. *Phytochemistry*, 13(11), 2481-2486.

Weder, J. K., & Kahleyß, R. (1998). Isolation and characterisation of four trypsin-chymotrypsin inhibitors from lentil seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 78(3), 429-434.

Welham T. & Domoney C. (2000). Temporal and spatial activity of a promoter from a pea enzyme inhibitor gene and its exploitation for seed quality improvement. *Plant Science*, 159:289-299. 10.1016/s0168-9452(00)00358-7

Welham, T., O'Neill, M., Johnson, S., Wang, T. L., & Domoney, C. (1998). Expression patterns of genes encoding seed trypsin inhibitors in *Pisum sativum*. *Plant Science*, 131(1), 13-24.

Williams, S. G. (1970). The role of phytic acid in the wheat grain. *Plant physiology*, 45(4), 376-381.

Wilson, K. A. (1980). "The release of proteinase inhibitors from legume seeds during germination." *Phytochemistry* 19: 2517-2519.

- Wolf, W. (1972). Soybean ultrastructure and its relationship to processing. In *Symposium: seed proteins*. AVI Pub. Co., Westport (pp. 231-241).
- World Health Organization. (2003). Food and Agriculture Organization (FAO). (2003). *Diet nutrition and the prevention of chronic diseases*. WHO, Geneva, 4-101.
- Wrobel, R., & Jones, B. L. (1992). Appearance of endoproteolytic enzymes during the germination of barley. *Plant Physiology*, 100(3), 1508-1516. 10.1104/pp.100.3.1508
- Zeid, I. M. (2004). "Response of bean (*Phaseolus vulgaris*) to exogenous putrescine treatment under salinity stress." *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7, 219-225.
- Zhou, J. R., & Erdman Jr, J. W. (1995). Phytic acid in health and disease. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 35(6), 495-508.
- Zieliński, H., Frias, J., Piskula, M. K., Kozłowska, H., & Vidal-Valverde, C. (2006). The effect of germination process on the superoxide dismutase-like activity and thiamine, riboflavin and mineral contents of rapeseeds. *Food chemistry*, 99(3), 516-520.
- Zulet, M. A., & Martínez, J. A. (2001). Dieta mediterránea: legumbres y colesterolemia. *Rev. Chil. Nutr*, 28, 312-320.

9. ANEXOS

Parte de los resultados de este trabajo fueron aceptados para presentarse en el XLI Encuentro Nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. (AMIDIQ) en la modalidad de cartel.



XLI
Encuentro
Nacional

21 de febrero de 2020

Estimado(a) CIRO BARUCHS MUÑOZ LLANDES

Agradecemos sinceramente el interés por participar en el XLI Encuentro Nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. (AMIDIQ) y por este conducto nos complace informarle que su trabajo:

520. EFECTO DE LA GERMINACIÓN SOBRE LA PROTEÍNA Y PROPIEDADES TECNOLÓGICAS, PERFIL PROTEICO Y DIGESTIBILIDAD DE LA PROTEÍNA DE HARINAS DE LUPINUS ANGUSTIFOLIUS

Cuyos autores son:

Ciro Baruchs Muñoz Llandes, Fabiola Araceli Guzmán Ortiz, Karina Alarcón Domínguez, Alma Delia Román Gutiérrez, Heidi María Palma Rodríguez, Apolonio Vargas Torres, Humberto Hernández Sánchez

Ha sido aceptado para su presentación en la sesión de **INGENIERÍA DE ALIMENTOS** en la modalidad **CARTEL**. Para ser acreedor de la constancia de participación requiere que al menos uno de los autores esté inscrito, y que el trabajo haya sido efectivamente presentado. Para que el trabajo sea publicado en las memorias del congreso, es necesario cumplir con los criterios anteriores y haber enviado su trabajo en extenso.

A partir del 18 de marzo de 2020 consulte el programa completo en nuestra página web www.amidiq.com para conocer el día y hora precisa de su presentación. Recuerde que tiene hasta el viernes 20 de marzo de 2020 para sustituir el resumen de dos páginas por su trabajo en extenso en la plataforma OpenConf.

A nombre de la AMIDIQ le agradecemos su participación y esperamos tener la oportunidad de saludarlo personalmente en Ixtapa Zihuatanejo, Gro.

Atentamente
COMITÉ TÉCNICO AMIDIQ 2020

Este proyecto fue seleccionado para presentarse de manera oral en el XXII
Biochemical Engineering National Congress
XI Biochemical Engineering International Congress
XVIII Biomedicine and Molecular Biotechnology Scientific Meetings



**XXII Biochemical Engineering National Congress
XI Biochemical Engineering International Congress
XVIII Biomedicine and Molecular Biotechnology Scientific Meetings**
Huatulco, Oaxaca, México, April 1-3, 2020

March 2020.

Dear *Ciro Baruchs Muñoz Llandes*,

It is a great pleasure to inform you that your paper has been **SELECTED FOR ORAL PRESENTATION** at the XI Biochemical Engineering International Congress, XXII Biochemical Engineering National Congress, XVIII Biomedicine and Molecular Biotechnology Scientific Meetings, to be held in Huatulco, Oaxaca, México, on April 1-3, 2020.

Code: FSC236CIR20200131

Title: Evaluation of protein content and digestibility in flours of sprouted *Lupinus angustifolius*.

Authors: *Ciro Baruchs Muñoz Llandes*, *Fabiola Araceli Guzmán Ortiz*, *Apolonio Vargas Torres*, *Heldi María Palma Rodríguez*, *Humberto Hernández Sánchez*, *Karina Alarcón Domínguez*, *Alma Della Román Gutiérrez*,

Session/Topic: FOOD SCIENCE

Day/Hour/Place: Wednesday, April 1, 2020/13:30 hrs/ CHAHUE conference room

The speakers will give a 15-minute presentation, questions and answers included; in free format, therefore we request your presence at day and place indicated above at least 10 minutes before your conference beginning.

Please note that an accepted presenter should be registered at the conference. Full registration fee payment per accepted paper is required. The payment of an author can be used to register two papers as maximum.

Your paper was evaluated by a scientific committee comprised of expert professors and selected based on specific criteria.

I hope to see you soon in Huatulco, México.

Best regards,

Delfilia Ahuatzi Chacón
Chair Scientific Committee

Mar del Norte No. 5, Col. San Álvaro Azcapotzalco C. P. 02090, México, D. F.
Tel. y Fax: 5623 3088 email: colegioibq@hotmail.com, colegioibq@yahoo.com.mx

Durante este periodo de investigación se publicó un capítulo de libro titulado
“EFFECT OF GERMINATION ON ANTINUTRITIONAL COMPOUNDS OF
GRAINS AND SEEDS”

Chapter 5

EFFECT OF GERMINATION ON ANTINUTRITIONAL COMPOUNDS OF GRAINS AND SEEDS

*Ciro Baruch*s Muñoz-Llandes¹,
Fabiola Araceli Guzmán-Ortiz^{2*}, PhD,
*Alma Delia Román-Gutiérrez*¹, PhD,
*Patricia López-Perea*³, PhD, *Javier Castro-Rosas*¹, PhD
and *Apolonio Vargas-Torres*⁴, PhD

¹Área Académica de Química (AAQ), Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo,
Ciudad del Conocimiento, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México

²CONACYT—Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Ciudad del Conocimiento,
Mineral de la Reforma, Hidalgo, México

³Área de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Politécnica de Francisco I. Madero,
Tepatepec, Francisco I. Madero, Hidalgo, México

⁴Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo,
Rancho Universitario Tulancingo de Bravo Hidalgo, México

ABSTRACT

Germination is a biochemical process in which grains and seeds undergo physical, chemical, biological, and nutritional changes to survive and become plants. In such a process, the main factors involved are respiration and the mobilization of nutrient reserves. It has been proven that antinutritional compounds as lectins, phytic acid, tannins, and protease inhibitors, among others, are eliminated during germination; a longer germination promotes the gradual reduction of these compounds. However, it has been reported that the concentration of antinutritional compounds as saponins is higher in the first days of germination. When the grain is subjected to a soaking process before germination, the reduction percentage is enhanced due to a leaching by the concentration gradient of the antinutritional compound content in the grain or seed. Simultaneously, the addition of eliciting compounds as chitosan, salicylic acid, and hydrogen peroxide

* Corresponding Author's E-mail: fabiguzman01@yahoo.com.mx

Complimentary Contributor Copy