



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EFECTO DEL PROCESO DE EXTRUSIÓN SOBRE LOS
INHIBIDORES DE TRIPSINA Y ACTIVIDAD UREÁSICA EN
FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.)”

TESIS.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

DUNIA MARIA LÓPEZ BARRERA

DIRIGIDA POR

Dra. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA.

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EFECTO DEL PROCESO DE EXTRUSIÓN SOBRE LOS
INHIBIDORES DE TRIPSINA Y ACTIVIDAD UREÁSICA EN
FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.)”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

DUNIA MARIA LÓPEZ BARRERA.

DIRIGIDA POR

Dra. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA.

SINODALES

Dra. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA _____
DIRECTOR

Dra. MINERVA RAMOS GOMEZ _____
SINODAL

Dra. MA. ESTELA VÁZQUEZ BARRIOS _____
SINODAL

M. en C. BEATRIZ LILIANA ALVAREZ MAYORGA _____
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Generalidades del frijol.	3
II.2 Composición.	4
II.3 Factores antinutricionales.	6
II.3.1 Inhibidores de tripsina.	7
II.4 Actividad ureásica.	9
II.5 Métodos de procesamiento.	12
II.5.1 Extrusión.	12
III. HIPÓTESIS	17
IV. OBJETIVOS	18
IV.1 General.	18
IV.2 Específicos.	18
V. METODOLOGÍA	19
V.1 Materiales.	19
V.1.1 Reactivos.	19
V.1.2 Materia prima.	19
V.2 Métodos.	19
V.2.1 Proceso de cocción tradicional del frijol	19
V.2.2 Proceso de extrusión de las muestras	20
V.2.3 Elaboración de totopos	21
V.2.4 Cuantificación de los inhibidores de tripsina	22
V.2.5 Determinación de la actividad ureásica.	24

V.3 Diseño experimental	25
VI. RESULTADOS.	26
VI.1 Cuantificación de inhibidores de tripsina en frijol, mezclas (maíz/frijol) y totopos.	26
VI.2 Actividad ureásica en frijol, mezclas (maíz/frijol) y totopos.	28
VII. DISCUSIÓN.	31
VII.1 Cuantificación de inhibidores de tripsina en frijol, mezclas (maíz/frijol) y totopos.	31
VII.2 Determinacion de actividad ureásica en frijol, mezclas (maíz/frijol) y totopos.	36
VIII. CONCLUSIONES	41
IX. BIBLIOGRAFÍA	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Indicadores químicos y nutrimentales del frijol común.	5
2	Inhibidores de proteasas presentes en plantas.	6
3	Parámetros típicos del proceso de extrusión.	15
4	Rango de temperaturas utilizadas en los perfiles de extrusión	21
5	Contenido de inhibidores de tripsina (IT) en frijol, mezclas (maíz/frijol) y totopos.	27
6	Actividad ureásica en frijol, mezclas (maíz/frijol) y totopos.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura de la ureasa.	9
2	Esquema de la reacción catalizada por la ureasa.	10
3	Relación entre la actividad ureásica vs actividad antitripsina.	11
4	Componentes comunes de los extrusores húmedos.	16
5	Extrusor prototipo CINVESTAV.	20
6	Microplaca de titulación para determinar inhibidores de tripsina.	23

RESUMEN.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las fuentes principales de proteína, vitaminas del complejo B y minerales en la dieta de los mexicanos. Sin embargo esta leguminosa contiene algunos factores antinutricionales, entre los que destacan los inhibidores de tripsina. Se ha informado que el tratamiento térmico puede inactivar a los mismos. La actividad ureásica a menudo se utiliza como un indicador de la inactivación de los inhibidores de tripsina, ya que éstos presentan un nivel similar de intolerancia al calor que la ureasa. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la extrusión sobre el contenido de inhibidores de tripsina y actividad ureásica en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Bayo Madero. El frijol crudo (FC) presentó un contenido de inhibidores de tripsina (IT) de 16.55 ± 0.521 UIT/mg, por el contrario en el frijol cocido tradicionalmente (FCT) se obtuvieron valores muy bajos de 0.622 ± 0.099 UIT/mg, de los cuatro perfiles de extrusión evaluados el perfil cuatro (P4) fue el más eficaz para destruir los IT con un valor residual de 7.30 ± 0.235 UIT/mg. El proceso de extrusión logro una máxima reducción de IT del 64% en la harina extruida maíz frijol en proporción 80% maíz y 20% frijol (HE 80:20), en los totopos se lograron bajos niveles IT comparables con el FCT. En cuanto a la actividad ureásica se observó la misma tendencia que con los IT, siendo el FC el que presentó mayor actividad residual con 47.6 ± 0.3189 % y el FCT el que presento la actividad más baja, seguida de los totopos en sus diferentes proporciones de maíz:frijol T 60:40, T 70:30 y T 80:20 con valores de 3.2 ± 0.36 , 8.9 ± 0.05 , 6.6 ± 0.38 y 3.2 ± 0.08 % respectivamente. Los resultados sugieren que el proceso de extrusión ayudó a eliminar los factores antinutricionales en altos porcentajes; sin embargo se recomienda combinarlo con otros procesos térmicos para poder reducir aún más dichos factores.

I. INTRODUCCIÓN.

El frijol se considera una de las principales fuentes de proteína para la mayoría de la población en países en desarrollo, esto debido a su alto contenido en proteína que es de dos a tres veces mayor al de los cereales, así como por su bajo costo en comparación con la proteína de origen animal. Sin embargo, es deficiente en aminoácidos azufrados y triptófano, deficiencia que se contrarresta con el consumo de maíz. Así mismo, su consumo impacta positivamente en los niveles de colesterol y glucosa en sangre. También contiene algunos factores antinutricionales tales como: los inhibidores de enzimas, lectinas, oligosacáridos, taninos, ácido fitico, entre otros; dichos factores interfieren con el proceso de digestión y dificultan la utilización de las proteínas.

Los inhibidores de proteasas más conocidos son los que actúan sobre la tripsina, la cual es una enzima del jugo pancreático que hidroliza las proteínas de la dieta produciendo polipéptidos y peptonas.

Los inhibidores de proteasas son termolábiles, por lo que se pueden inactivar, en mayor o menor grado, por la acción de tratamientos térmicos. La estabilidad térmica de estos depende de su peso molecular y de la cantidad de uniones disulfuro presentes en la proteína; ya que estos enlaces estabilizan la conformación activa del inhibidor.

Por otro lado el nivel de factores antinutricionales (como los inhibidores de tripsina) se pueden estimar de manera indirecta mediante la prueba de actividad ureásica. La enzima ureasa se desnaturaliza a la misma velocidad que el inhibidor de tripsina, por lo que existe una relación directa entre la destrucción de la enzima ureasa por calor y una mejora del valor nutricional por inactivación del inhibidor de tripsina.

En la literatura se han reportado métodos alternativos al cocimiento de los alimentos, buscando con ello ventajas tecnológicas que permitan ahorros de energía y reducir los tiempos de procesamiento. Por ello, se han desarrollado tecnologías como la extrusión.

La extrusión es un proceso de cocción, que se lleva a cabo a altas temperaturas (150 °C a 200°C) en tiempos cortos. Al tener este tipo de procesos se protege el sabor y los nutrientes de los alimentos, además que se inactivan de enzimas y microorganismos patógenos, al mismo tiempo que los factores antinutricionales termolábiles son eliminados, razón por la cual es ampliamente utilizado en la industria alimentaria.

Por lo tanto, se busca probar el proceso de extrusión como método de cocción no convencional y al mismo tiempo evaluar el efecto del calentamiento sobre el contenido de inhibidores de tripsina y la actividad ureásica en frijol Bayo Madero.

II. ANTECEDENTES.

II.1 Generalidades del frijol.

Las leguminosas han sido cultivadas por el hombre casi desde que se descubrió la agricultura. Estas plantas se caracterizan por presentar frutos en forma de vainas entre las cuales el frijol, las habas, las lentejas y los garbanzos son los más conocidos (Vázquez, 2006). Existen más de 1300 especies de leguminosas, pero solo unas 20 son parte de la dieta humana (McRae y col., 1993; De Almeida y Col., 2006).

Las legumbres son las semillas secas comestibles de las plantas leguminosas y tienen una especial importancia nutritiva y económica por su presencia en la dieta de millones de personas de todo el mundo. La importancia principal de las legumbres reside en su elevado contenido de proteínas, ya que éstas contienen el doble o triple que la mayoría de los otros cereales; además, contienen una buena cantidad de minerales esenciales, como el calcio y el hierro, y algunas vitaminas de complejo B (García, 2009).

En países de muy bajos ingresos, las leguminosas contribuyen con alrededor del 10% de las proteínas diarias y el 5% del aporte energético de la alimentación de la población (FAO/SMIA, 2001), aunque requieren complementarse con cereales para mejorar el perfil de la proteína dietaria requerida, ya que son deficientes en los aminoácidos azufrados (Sangronis y col., 2004). Dentro del grupo de las especies leguminosas, el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las importantes. El frijol es originario de América y se le conoce con diferentes nombres: poroto, haricot, caroata, judía, alubia y habichuela, entre otros (MAG, 1991; Tapuach, 2004).

En México, el cultivo del frijol, junto con el maíz, representa toda una tradición productiva y de consumo, cumpliendo diversas funciones de carácter alimentario y

socioeconómico que le han permitido trascender hasta la actualidad (SAGARPA, 2000). El frijol es para México uno de sus principales elementos nutricionales con una producción de 8.3% a nivel mundial, encontrándose dentro de los cinco principales productores. Sin embargo, su producción ha disminuido en los últimos años a raíz de problemas climáticos (Ortega y Ochoa, 2003; SAGARPA, 2005).

El cultivo del frijol es uno de los de mayor importancia en el país ya que representa para la economía de los productores una fuente importante de ocupación e ingreso, a la vez que es una garantía de seguridad alimentaria (Hangen y Bennink, 2003). El 68% de su producción se destina en forma directa al consumo humano. Así mismo, su consumo es generalizado entre casi todas las clases sociales de la población de ingresos bajos, medios y hasta superiores. Es por esto que la importancia de este grano en la dieta actual del país sigue siendo fundamental (SAGARPA, 2000; Ortega y Ochoa, 2003).

El consumo de frijol ha cobrado importancia en la dieta de los países desarrollados debido, en parte, a los problemas de salud provocados por el consumo de carne y al descubrimiento de los beneficios de incluir legumbres en la dieta; beneficios relacionados con la protección contra cáncer de colon (Lee y col., 1992; Hangen y Bennink, 2003).

III.2. Composición.

En el Cuadro 1 se presenta la composición química y nutrimental del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), en dicho cuadro se puede observar que el grano de frijol contiene de 14 a 33% de proteína, de 52 a 76% de carbohidratos, de 14 a 19% de fibra, así como de 1.5 a 6.2% de lípidos. En cuanto a su composición mineral el frijol contiene Zn (2.2-4.4 mg/100g), Ca (9-200 mg/100g) y Fe (3.8-7.6 mg/100g) (Paredes y col., 2006).

Cuadro 1. Indicadores químicos y nutrimentales del frijol común

INDICADORES	CONTENIDO	REQUERIMIENTOS MINÍMOS DÍA (ADULTO)
COMPOSICIÓN QUÍMICA (%)		
Proteínas	14 - 33	
Lípidos	1.5 - 6.2	
Fibra total	14 - 19	
Insoluble	10.1 - 13.4	
Soluble	3.1 - 7.6	
Cenizas	2.9 - 4.5	
Carbohidratos	52 - 76	
CALIDAD DE PROTEÍNA		
Digestibilidad (%)	52 - 75	
Relación de eficiencia proteínica	0.7 - 1.5	
AMINOÁCIDOS ESENCIALES (g/100g proteína)		
Fenilalanina + Tirosina	5.3 - 8.2	6.3
Isoleucina	2.8 - 5.8	2.8
Leucina	4.9 - 9.9	6.6
Lisina	6.4 - 7.6	5.8
Metionina + Cisteína	1.2 - 1.5	2.5
Treonina	4.4 - 7.0	3.4
Triptófano	-	1.1
Valina	4.5 - 6.7	3.5
VITAMINAS (mg/100g)		
Tiamina (B1)	0.86 - 1.14	1.5
Riboflavina (B2)	0.14 - 0.27	2.2
Niacina (B3)	1.16 - 2.68	0.019
Piridoxina (B6)	0.34 - 0.64	2.0
Ácido fólico	0.17 - 0.58	0.5
MINERALES (mg/100g)		
Calcio	9 - 200	800 - 1000
Cobre	0.7 - 1.2	
Fósforo	460	800 - 1000
Hierro	3.8 - 7.6	15
Magnesio	200	300 - 400
Zinc	2.2 - 4.4	15
OTROS COMPONENTES		
Taninos (mgeq.cat./g) ^a	9.6 - 131.4	
Inhibidores de tripsina (UIT/mg) ^b	13 - 29	
Ácido fítico (%)	0.6 - 2.7	

^aMiligramos de equivalentes de catequina por gramo.

^bUnidades de inhibición de tripsina por miligramo.

(Paredes y col., 2006)

II. 3. Factores antinutricionales.

Las leguminosas contienen diversos factores antinutricionales como los inhibidores de tripsina, lectinas, ácido fítico, compuestos fenólicos y saponinas, entre otros, los cuales pueden limitar su consumo y la utilización de su contenido de proteína (Boniglia y col., 2003; García, 2009).

El termino “factores antinutricionales” incluye aquellos compuestos que reducen la utilización de nutrientes, así como la actividad biológica de diversos compuestos químicos o metabolitos en animales (Van Der Poel, 1990; Rocha y col., 2006).

Gran parte de los alimentos de origen vegetal presentan inhibidores de proteasas, en donde la mayor proporción se encuentra en la semilla. Los inhibidores de tripsina pueden coexistir en la misma planta con otros inhibidores proteolíticos, como se puede observar en el Cuadro 2 (Whitaker y col., 1979; Weder, 1981; Savelkoul y col., 1992).

Cuadro 2. Inhibidores de proteasas presentes en plantas.

INHIBIDORES DE PROTEASAS EN PLANTAS COMESTIBLES MAS COMUNES			
NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN	PARTE DE LA PLANTA	ENZIMA INHIBIDA
<i>Araquis hipogea</i>	Cacahuete, maní	nuez o semilla	T, Q, PL
<i>Avena sativa</i>	Avena	endospermo	T
<i>Beta vùlgaris</i>	Remolacha roja	tubérculo	T
<i>Brassica rapa</i>	Colza o nabo	semilla	T
<i>Cicer arietinum</i>	Garbanzo	semilla	T
<i>Glicine max</i>	Soya	semilla	T, Q, E, PL
<i>Oryza sativa</i>	Arroz	semilla	T, S
<i>Phaseolus coccineus</i>	Frijol francés, ayocote	semilla	T, Q
<i>Phaseolus lunatus</i>	Frijol de lima	semilla	T, Q
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Frijol común	semilla	T, Q, E
<i>Pisum sativum</i>	Chícharo, guisante	semilla	T, PL
<i>Solanum tuberosum</i>	Papa	tubérculo	T, Q, E, PL
<i>Vacia faba</i>	Haba	semilla	T, Q, PL
<i>Zea mays</i>	Maíz	semilla	T

T= Tripsina / Q= Quimiotripsina / E= Elastasa / PL= Plasmina

(Valle y Lucas, 2000).

Los inhibidores de proteasas más estudiados son los que actúan sobre la tripsina, ya que es una enzima digestiva de gran importancia en la digestión de los animales monogástricos como el hombre (Valle y Lucas, 2000).

II.3.1 Inhibidores de tripsina.

La presencia de factores antinutricionales en los alimentos como el inhibidor de tripsina de frijol de soya, ha sido reportada desde 1946. La mayoría de los inhibidores nutricionales son de origen vegetal, sin embargo se han reportado en algunos alimentos de origen animal. Estos son compuestos de naturaleza no fibrosa que afectan el crecimiento y la salud de los animales, pero los factores antinutricionales cumplen funciones de protección a la planta, contra el ataque de hongos, bacterias, pájaros e insectos (Gómez y Quesada, 1998; Gómez y col., 1998; Martínez y col., 2002; Villalobos y Espinoza, 2007).

Los inhibidores de proteasas son los factores antinutricionales más conocidos; encontrados principalmente en semillas crudas de leguminosas. Sin embargo, también se encuentran en otros alimentos como: el huevo, la leche, los productos lácteos y las papas. La presencia de este factor se ha estudiado principalmente en el ovomucoide de los huevos de aves, en el amaranto, en la soya y en el frijol (Duffus y Slaughter, 1985; Belmar, 2001; Muzquiz, 2006; Elizalde y col., 2009).

Estas enzimas contienen relativamente grandes cantidades de aminoácidos azufrados, incluyendo la metionina. De esta forma, puesto que la metionina es el aminoácido limitante en algunas leguminosas como la soya, el efecto del inhibidor es incrementado por la pérdida de aminoácidos esenciales endógenos, ya que se encuentran en poca cantidad (Duffus y Slaughter, 1985; Oloyo, 2004; Kuo, 2004, Elizalde y col., 2009).

Los inhibidores de proteasas son moléculas proteicas que tienen la capacidad de formar complejos proteína-proteína con las proteínas digestivas inhibiendo de forma competitiva su actividad catalítica (Valencia, 2009).

En la literatura se ha demostrado que los inhibidores de proteasas inhiben la actividad *in vitro* de las enzimas digestivas tripsina y quimiotripsina humana, afectando la digestibilidad proteica de las semillas y su calidad. Además pueden ser causantes de retardo en el crecimiento de animales y humanos, también se les atribuye ser los responsables de hipertrofia e hiperplasia pancreática (Keshun, 1999; Valencia, 2009).

El inhibidor de tripsina que se encuentra en la secreción pancreática, es una proteína pequeña de 6KDa, que se une fuertemente al centro activo de la tripsina, dada su analogía con el sustrato, formándose un complejo muy estable (Teijón y col., 2006).

Se ha informado que los inhibidores de tripsina se encuentran en el cotiledón del frijol común y su actividad inhibitoria es alrededor de 26.8 unidades inhibitorias/mg (González de Mejía y col., 2003).

Hay dos tipos principales de inhibidores de proteasas: Kunitz y Bowman-Birk. El primero es una proteína cuyo peso molecular es de 20100 Da, tiene algunos puentes disulfuro e inhibe principalmente a la tripsina y muy poco a la quimiotripsina. El inhibidor Bowman-Birk es una proteína cuyo peso molecular es de 8000Da, tiene algunos puentes disulfuro e inhibe tanto a la tripsina como a la quimiotripsina en dos sitios diferentes (Di Pietro y Liener, 1989; García, 2009). Aunque hay discrepancia sobre la estabilidad de los dos tipos principales de inhibidores de tripsina, Bilbao (2000) reportó que los inhibidores de tripsina se eliminan completamente del grano cuando son sometidos a cocción con previo remojo debido a que este último procedimiento puede facilitar una mayor

transferencia de calor al interior del grano y por tanto la total desnaturalización de estos compuestos.

Por otro lado, también se ha demostrado que estos inhibidores se destruyen sometiéndolos a la acción del vapor al igual que si se ponen en agua durante la noche y se hierven (Linder, 1995; Shimelis y Rakshit, 2007). Estos tratamientos térmicos desnaturalizan las proteínas mejorando su digestibilidad. Sin embargo, un tratamiento por calor excesivo puede resultar en proteínas dañadas, disminución de los aminoácidos disponibles y una digestibilidad más baja de la proteína, lo que representa pérdida de calidad y riesgo en productos comerciales procesados (Belmar, 2001; Muzquiz, 2006).

Sin embargo, se ha demostrado, que la efectividad de los tratamientos por calor dependen del pH, la temperatura, el tiempo de calentamiento, las condiciones de humedad, el tamaño de partícula y el tipo de semillas; por tanto, es recomendable aplicar métodos combinados para minimizar el daño en la calidad nutricional del alimento y promover una mayor inactivación; por ejemplo, es recomendable después de germinar las semillas escaldarlas con agua hirviendo por tres minutos para inactivar el 90% de inhibidor (Belmar, 2001; Muzquiz, 2006).

II.4. Actividad ureásica.

La ureasa cuyo nombre sistemático es amidohidrolasa de urea, tiene un peso molecular de 483 KDa. La ureasa consta de seis subunidades estructurales iguales (Figura 1).

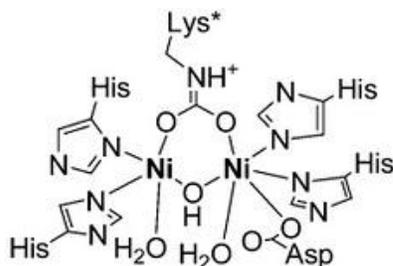


Figura 1. Estructura de la ureasa (Teijón y col., 2006).

La ureasa se utiliza como agente catalítico para la medición cuantitativa de urea (Figura 2). El hidróxido de amonio que se forma puede titularse y puede relacionarse estequiométricamente con la cantidad de urea presente en una muestra. Aunque la ureasa no es muy común en la naturaleza, esta enzima ha tenido más importancia en el desarrollo de la enzimología moderna que ninguna otra (Herrera y col., 2003).

Las investigaciones sobre la ureasa han permitido deducir un principio importante en las reacciones enzimáticas; la función de los grupos -SH (sulfhídrido) en la catálisis. La ureasa posee tres o cuatro grupos activos, es una representante de un gran número de enzimas cuya actividad depende de la existencia de grupos -SH intactos, procedentes de cisteínas que forman parte de la cadena polipeptídica de la enzima (Herrera y col., 2003).

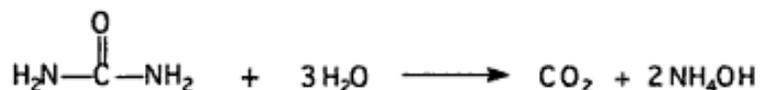


Figura 2. Esquema de la reacción catalizada por la ureasa (Herrera y col., 2003).

Además de que esta enzima se encuentra en las semillas de los vegetales, también se puede encontrar en algunos microorganismos e invertebrados. En las plantas, la ureasa es un hexámero (Figura 1), consiste en seis cadenas idénticas, y se encuentra en el citoplasma. En bacterias, está formada por dos o tres subunidades diferentes (Lorenc, 2008).

La ureasa no es perjudicial, sin embargo, los granos de soya en crudo contienen otros compuestos que impactan sobre el estado nutricional, como los inhibidores de tripsina. La presencia de estos compuestos no es fácil de detectar, pero afortunadamente, tiene un nivel similar de intolerancia al calor que la ureasa, ambos son inactivados por el calor. Por lo que se ha sugerido medir la actividad

ureásica presente en los frijoles de soya crudos, como indicativo de cocción, pues su actividad disminuye.

La industria de alimentos utiliza esta prueba como una rutina rápida y sencilla, ya que sirve como un indicador muy confiable de la presencia o no de factores antinutricionales (Lorenc, 2008).

La disminución de la actividad ureásica está correlacionada con la reducción de la actividad antitripsina, esto se comprueba con los resultados obtenidos por Araba y Dale (1990) (Figura 3).

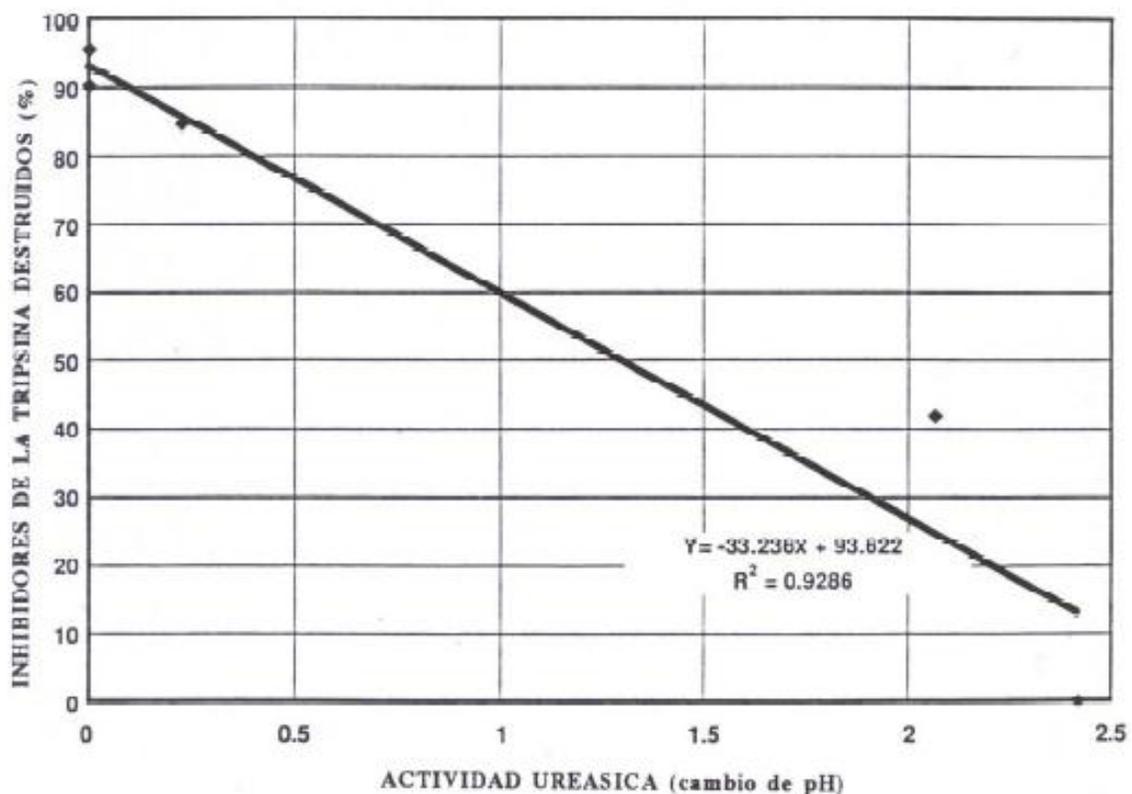


Figura 3. Relación entre la actividad ureásica vs actividad antitripsina (Araba y Dale, 1990)

II.5. Métodos de Procesamiento.

En África y en Latinoamérica, el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa más consumida, generalmente como granos enteros cocidos (Sangronis y col, 2004). Pese a ello, continuamente se definen nuevas condiciones de proceso con el objetivo de reducir o eliminar los factores antinutricionales y mejorar la calidad proteica.

Diferentes métodos de procesado como el hervido (Jood y col., 1985; Shimelis and Rakshit, 2007), remojo y germinación (Matella y col., 2005) se han usado para incrementar la utilización del frijol común. El remojo previo del grano reduce los tiempos de cocción, debido a que se produce un acondicionamiento de la cáscara que propicia que la matriz amilácea absorba agua, facilitándose el proceso de gelatinización del almidón (Sangronis y col., 2002).

Adicionalmente a estos métodos se ha propuesto la utilización de métodos no tradicionales como la extrusión con el objetivo de incrementar el uso de los frijoles debido a que con este proceso se desactivan los antinutrientes termolábiles (Abd El-Hady y Habuba, 2003; Rocha y col., 2006).

Hoy en día se aplican estas nuevas tecnologías o se combinan varias de ellas para obtener ingredientes con excelente calidad, de igual o mejor valor nutricional y en lo posible, con diferentes propiedades funcionales para el desarrollo de productos para la industria alimentaria (Sangronis y col., 2004).

II.5.1 Extrusión.

La tecnología de la extrusión se destaca en la industria de alimentos como un proceso eficiente, utilizándose en el procesamiento de cereales y proteínas, empleados para alimentación humana y animal.

Inicialmente esta tecnología se desarrolló para el formado de materiales, tales como masas para galletas, almidones para producir a partir de ellos diversos tipos de pasta, alimentos infantiles, y mas recientemente para la producción de los llamados alimentos listos para consumir. Actualmente se dispone de diseños muy sofisticados de extrusores desarrollados en las últimas décadas. Una característica importante del proceso de extrusión es que es continuo y que opera en un estado de equilibrio dinámico estacionario, donde las variables de entrada están equilibradas con las de salidas (Kokini y col., 1992, Cuggino, 2008).

La extrusión puede definirse como un proceso que involucra el transporte de un material, bajo ciertas condiciones controladas, forzándolo a pasar por una boquilla de una dada geometría y con un caudal masivo pre-establecido, durante este transporte se produce la cocción parcial o total de los componentes de la mezcla (González y col., 2002).

El cocido por extrusión de los alimentos es un proceso tecnológico mixto, por el cual diversos biopolímeros (proteínas, almidones) o ingredientes alimenticios son mezclados, transportados y termoformados en un sistema de baja humedad (por lo general inferior al 18%), a temperaturas elevadas (140-190 °C) y a presiones altas (10-20 Megapascuales), durante un tiempo corto (15-60 segundos), utilizando fuerzas de cizallamiento muy elevadas originadas por un tornillo sin fin. El cocido por extrusión esta evolucionando rápidamente y ha pasado de ser un arte a una ciencia por el cual se texturizan proteínas de plantas como la soya, se gelatinizan almidones, se preparan alimentos infantiles, se produce queso fundido esterilizado, se elaboran multitud de aperitivos, entre otras (Gil, 2010).

La aplicación del proceso de extrusión modifica la estructura del almidón incrementando la bio-disponibilidad del polímero, cambiando la textura y propiedades funcionales del producto. La proteína, como segundo componente principal en los extrudidos, puede sufrir desnaturalización y aumentar su digestibilidad (Harper y Mercier, 1989).

Dicho proceso también presenta varias ventajas sobre otros procesos debido a que es un proceso continuo con altos rendimientos y alta eficiencia energética. Su gran versatilidad es debida a que al usar diferentes tipos de ingredientes mejoran su textura y sabor, se pueden efectuar diferentes operaciones como cocción, formación, texturización y deshidratación, además de que brinda un absoluto control de la temperatura y textura (Harper y Mercier, 1989).

La cocción por extrusión es una forma única especializada en el procesado de materiales amiláceos debido a que se trata de un tipo de cocción a relativamente bajos niveles de humedad, comparado con el horneado convencional o la cocción de masas y pastas.

Los niveles de humedad utilizados están en el intervalo de 10-40%, y a pesar de estos bajos valores de humedad el material se transforma en un fluido dentro del extrusor. Bajo estas condiciones las características físicas de las materias primas, tales como el tamaño de partícula, la dureza y el grado de plastificación alcanzado durante el proceso de extrusión llegan a ser determinantes para la transformación final del material. Otra característica de la cocción por extrusión, como ya se dijo, es que resulta ser un proceso a altas temperaturas en tiempos cortos, pero además, debido a los esfuerzos de corte que se desarrollan durante el transporte del material a través del tornillo del extrusor, la temperatura se eleva rápidamente (conversión de energía mecánica en calor por flujo viscoso) y así la estructura del material sufre transformaciones profundas en pocos segundos. La masa de partículas (harina de cereales y/o legumbres) más o menos hidratada, es convertida en un fluido de muy alta viscosidad. A medida que ese fluido es transportado, los elevados esfuerzos de corte en combinación con la alta temperatura, transforman a los elementos estructurales del material, es decir a los gránulos de almidón y a las estructuras proteicas (Gil, 2010).

Los extrusores tienen elementos comunes en diseño y función pero no todos son iguales, y por tanto se puede tener un producto final con las características deseadas. Los extrusores pueden ser clasificados como húmedos o secos y como simples o de doble hélice. La extrusión seca emplea niveles de humedad por debajo del 20%. La extrusión seca no incluye preacondicionamiento y, por tanto, su capacidad para procesar un amplio rango de ingredientes está limitada (Cuadro 3) (Rokey, 1995).

Cuadro 3. Parámetros típicos del proceso de extrusión.

PROCESO	TEMPERATURA (°C)	PRESIÓN MÁXIMA (BBL)	HUMEDAD (%)	GRASA MÁXIMA (%)	COCCIÓN* (%)
Prensa granular	60-100	-	12-18	12	15-30
Expander/granular	90-130	35-40	12-18	12	20-55
Extrusión seca	110-140	40-65	12-18	12**	60-90
Extrusión Húmeda					
Hélice simple	80-140	15-30	15-35	22	80-100
Hélice doble	60-160	15-40	10-45	27	80-100

* Gelatinización del almidón medida enzimáticamente.

** La extrusión seca procesa eficazmente la soya integral (18-20% de grasa) y otros ingredientes, cuando la durabilidad final del producto no es un problema (Rokey, 1995).

Los componentes físicos de los extrusores húmedos se muestran en la Figura 4, el funcionamiento general de este tipo de extrusores se detallará a continuación: la masa del alimento entra por un canal que atraviesa un preacondicionador de vapor, alcanzando posteriormente la cubeta de extrusión. El preacondicionador hidrata la masa hasta un 18-25% de humedad, y simultáneamente la calienta hasta los 80-95° C en un plazo de tiempo de hasta 2,5 minutos. Esta fase, unida a hélices de conducción-positiva en la extrusión, permite procesar alimentos con hasta un 27% de grasa (Cuadro 2). El tambor de extrusión aloja una serie de hélices segmentadas y de cierres en cizalla que conducen y extrusionan el material a través de los orificios de la matriz, que controlan el tamaño y la forma del gránulo final. El vapor se inyecta en el tambor de extrusión para alcanzar las condiciones de procesamiento descritas en el cuadro 2. El tiempo de retención en el tambor de extrusión puede ser

tan bajo como 12 segundos. Este principio de combinar altas temperaturas con cortos tiempo de procesado ha hecho de la extrusión un método efectivo de tratamiento de ingredientes individuales y dietas completas (Rokey, 1995).

Los extrusores de doble hélice son los más utilizados cuando se dan alguna de las siguientes condiciones:

- Niveles de grasa en las muestras por encima del 17%
- Harinas de carne húmedas u otros ingredientes húmedos por encima del 35%
- Diámetro final del gránulo por debajo de 1,5 mm (Rokey, 1995).

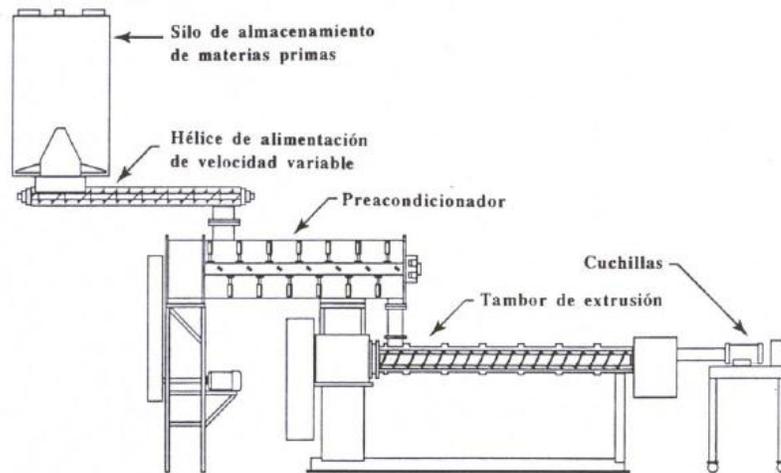


Figura 4. Componentes comunes de los extrusores húmedos (de tornillo simple o doble) (Rokey, 1995).

III. HIPÓTESIS.

El proceso de extrusión es un método eficiente para inactivar los inhibidores de tripsina y reducir la actividad ureásica en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

IV. OBJETIVOS.

IV.1 General.

Evaluar el efecto del proceso de extrusión sobre el contenido de los inhibidores de tripsina y la actividad ureásica en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

IV.2 Específicos.

Comparar el contenido de inhibidores de tripsina (IT) en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) por cocción tradicional con el sometido a diferentes condiciones de extrusión.

Comparar el contenido de actividad ureásica en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) por cocción tradicional con el sometido a diferentes condiciones del proceso de extrusión.

V. METODOLOGÍA.

V.1 Materiales.

V.1.1 Reactivos.

Tripsina, benzoil L-arginina 4-nitroaloinina (BAPA) y Tris (hidroximetilamino metano), fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. El Kit para determinación de urea se adquirió de la marca RANDOX. Sulfóxido de dimetilo (DMSO) se adquirido de Mallinckrodt. Los reactivos no especificados fueron adquiridos de J. T. Baker.

V.1.2 Materia prima.

El Frijol Bayo Madero fue donado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Campus Experimental Bajío.

Maíz (*Zea maíz* L.) se adquirido en una comercializadora de granos del estado de Querétaro.

V.2 Métodos.

V.2.1 Proceso de cocción tradicional del frijol.

Para llevar a cabo este proceso se siguió la metodología propuesta por Aparicio-Fernández (2005), primero se pesó en un recipiente de aluminio 50 g de frijol Bayo Madero limpio, a los cuales se les añadió 250 mL de agua HPLC, se tapó el recipiente con papel aluminio y se coció a 90°C por un periodo de aproximadamente 2.5 horas, pasado este tiempo el frijol se sometió a un proceso de secado a 60°C durante toda la noche y una vez secos los granos fueron trituraron en un molino para café marca KRUPS GX4100.

V.2.2 Proceso de extrusión de las muestras.

La extrusión de las diferentes muestras se llevó a cabo en un extrusor de laboratorio de tornillo simple (prototipo CINVESTAV) (Figura 5), el cual tiene las siguientes características: diámetro de 19 mm, relación longitud:diámetro de 20:1, relación de compresión 1:1, dado de salida de 4.0 mm y una velocidad de tornillo de 12 rpm. El barril se encuentra dividido en dos zonas (alimentación y central) calentadas independientemente mediante resistencias eléctricas y enfriadas con aire. Una tercera zona, la cabeza del portadado, también es calentada por una resistencia eléctrica (Pineda, 2009). En donde se mantuvieron constantes los parámetros de humedad y velocidad de tornillo con valores de 28% y 12 Hertz, respectivamente. Lo que se varió fueron las temperaturas en las cuatro diferentes zonas del extrusor.



Figura 5. Extrusor prototipo CINVESTAV.

Se probaron cuatro perfiles de extrusión en muestras únicamente de frijol, en los que se fue aumentando gradualmente la temperatura (Cuadro 4), los cuales fueron denominados como P1, P2, P3 y P4. Esto se hizo con la finalidad de encontrar las

condiciones óptimas de pre-cocción, las cuales permitieran inactivar la mayor cantidad de IT y por consiguiente de factores antinutricionales.

Cuadro 4. Rango de temperaturas utilizadas en los perfiles de extrusión.

PERFIL	T1 (°C)	T2 (°C)	T3 (°C)	T4 (°C)
P1	40	60	100	135
P2	40	60	100	150
P3	40	60	110	150
P4	40	60	120	150

Una vez probados los diferentes perfiles, se escogieron las condiciones de extrusión empleadas en el P4 (40/60/120/150 °C), para extruir mezclas maíz:frijol en diferentes proporciones las cuales fueron: 60:40, 70:30 y 80:20. Esto debido a que el frijol extruido con dichas condiciones de temperatura presentó la mayor inactivación de IT.

Las mezclas de maíz:frijol se dividieron en dos grupos: las harinas extruidas denominadas HE, en donde tanto frijol como maíz estaban extruidos; y un segundo grupo las harinas crudas denominado HC donde solo el frijol estaba extruido y el maíz estaba crudo. Estos dos grupos se hicieron en las tres proporciones nombradas anteriormente, dando origen a 6 muestras las cuales son: HE 60:40, HE 70:30, HE 80:20, HC 60:40, HC 70:30 y HC 80:20.

V.2.3 Preparación de los totopos.

Los totopos (T) se elaboraron a partir de las harinas extruidas (HE) en sus diferentes proporciones (60:40, 70:30 y 80:20), las tres muestras resultantes fueron denominadas T 60:40, T 70:30 y T 80:20. Como primer paso se hidrataron las

diferentes harinas hasta formar una masa, la cual posteriormente se troqueló en forma de tortilla y finalmente estas fueron sometidas a un tratamiento térmico extra, dicho tratamiento consistió en calentar la tortilla a 250°C durante 10 segundos por cada lado, pasado este tiempo se dejó secar la tortilla a temperatura ambiente y se cortó en forma de cuadritos.

V.2.4 Cuantificación de los inhibidores de tripsina.

El método para determinar los inhibidores de tripsina se llevó a cabo de acuerdo al método propuesto por Oppert y col. (1997), adaptado a microplaca. Brevemente, las muestra de frijol, las mezclas maíz/ frijol extruidas y sin extruir en sus diferentes proporciones (60:40, 70:30 y 80:20) y los totopos también en sus diferentes proporciones (60:40, 70:30 y 80:20) se molieron y pasarón por una malla No.60. A un gramo de cada muestra se le adicionaron 10 mL de NaOH 0.01N y se mantuvieron en agitación por tres horas a temperatura ambiente. Al finalizar la agitación la muestra se centrifugó a 10,000 g durante 20 minutos y se ajustó el pH a 8.2 con HCl 0.1N, el sobrenadante se conservó a 4°C hasta su medición.

Se colocaron 100 µL de la solución del extracto en los cuatro pozos superiores de una microplaca de 96 pozos (hilera A). En los cuatro pozos restantes, de las hileras B a H, se colocaron 50 µL de la solución amortiguadora de Tris/CaCl₂ 0.05M pH 8.2 [se preparó disolviendo 0.605 g de Tris (hidroximetilamino metano) y 0.294 g de CaCl₂, en 80 mL de agua, se ajustó el pH a 8.2 con HCl 1N y se aforó a 100 mL], con la ayuda de una micropipeta múltiple, se tomaron 50 µL de la hilera A y se pasaron a la B, se mezclaron y tomaron de nuevo 50 µL, los cuales se transfirieron a la hilera C y así sucesivamente hasta la G, para hacer diluciones.

La hilera H quedó sin extracto y se usó como control positivo. Posteriormente se añadieron 50 µL de solución de tripsina [se preparó disolviendo 2.5 mg de la

enzima en 50 mL de la solución amortiguadora de Tris/CaCl₂ 0.05M], a cada pozo de tres columnas, desde A hasta H. A la cuarta columna se le añadió solamente 50 µL de la solución amortiguadora de Tris/CaCl₂ 0.05M por pozo (como blanco).

La microplaca se mezcló en una plancha de agitación durante 20 min. Al finalizar la reacción se añadieron a cada pozo 50 µL del sustrato benzoil L-arginina 4-nitroaliniina (BAPNA) [se preparó disolviendo 15 mg de BAPNA en 0.5 mL de sulfóxido de dimetilo (DMSO) y se aforó a 50 mL con la solución amortiguadora de tris/CaCl₂ 0.05M]. Se mezcló de nuevo en placa de agitación durante 5 min. Se midió la absorbancia de las muestras a 405 nm en el lector de ELISA, registrándose la lectura a los 10 minutos de haber comenzado la reacción (Figura 6).

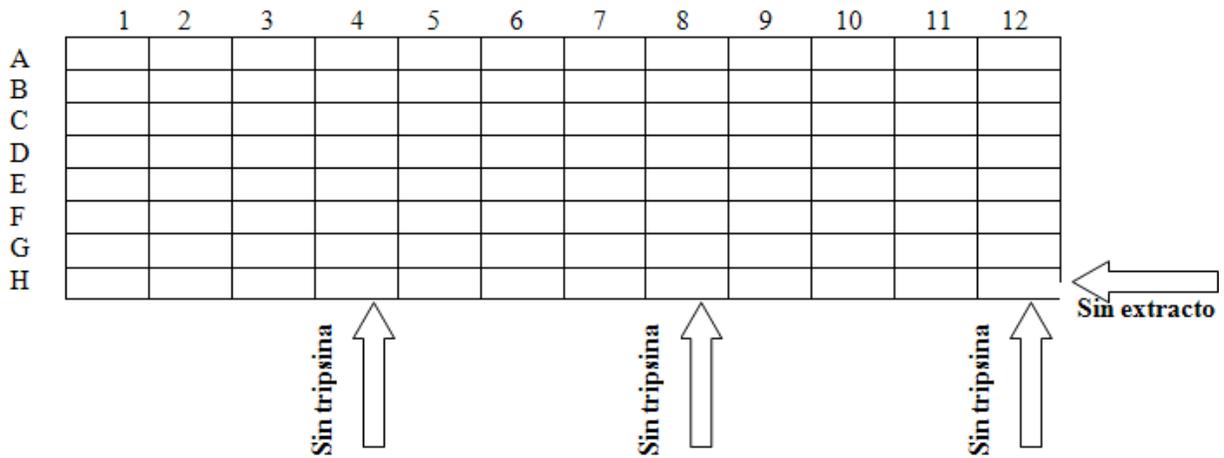


Figura 6. Microplaca de titulación para determinar inhibidores de tripsina.

Los resultados se expresaron como UIT/mg, donde una unidad inhibidora de tripsina (UIT) se define como la cantidad del inhibidor que inhibe 1 µg de tripsina pura (González de Mejía y col, 2005)

V.2.5 Determinación de la actividad ureásica

El método para determinar la actividad ureásica se llevó a cabo de acuerdo al método propuesto por Olgún y col. (2001) con algunas modificaciones.

Cada una de las muestra de frijol, las mezclas maíz/ frijol extruidas y sin extruir en sus diferentes proporciones (60:40, 70:30 y 80:20) y los totopos también en sus diferentes proporciones (60:40, 70:30 y 80:20) se molieron y se pasaron por una malla No.60. Se prepararon extractos según la metodología descrita por Liener y Hill (1953) para la determinación de la actividad hemaglutinante de productos de soya. Brevemente, se incubaron 5 g de muestra con 25 mL de NaCl 0.9% estéril durante 1 hora a una temperatura de 4-8°C. Al final de la incubación se centrifugaron durante 15 minutos a 3500 rpm. El sobrenadante se mantuvo a 4°C hasta su análisis y se denominó reactivo enzimático.

Se empleó el kit de la marca RANDOX^{MR} para determinar urea, el cual contenía los siguientes reactivos: R1a. Ureasa \geq 5000 U/L; R1b. Tampón fosfato 120 mmol/L pH 7 (conteniendo: salicilato sódico 64.4 mmol/L, nitroprusiato sódico 5.00 mmol/L y EDTA 18 mmol/L); R2. Hipoclorito 18 mmol/L e hidróxido sódico 750 mmol/L y CAL. el cual contenía urea de un lote específico.

A 20 μ L del extracto considerado como reactivo enzimático se incubó con 20 μ L de la solución CAL del kit durante 5 minutos a 37 °C. Posteriormente se agregaron 0.5 mL del reactivo R1b y 0,5 mL del reactivo R2 y se incubó nuevamente durante 5 minutos a 37 °C, se leyeron las absorbancias a 600 nm en un espectrofotómetro (UV-visible, Perkin-Elmer Lambda 40, Software UV Win Lab v. 2. 85. 04, 2000).

En el caso del control en lugar de agregar los 20 μ L del extracto se agregaron 20 μ L de la solución R1a del kit y se siguió el mismo procedimiento mencionado anteriormente para cada una de las muestras.

Los valores de la lectura se corrigieron teniendo en cuenta la cantidad de muestra que representa el volumen de extracto y refiriéndola a 200 mg, cantidad de muestra empleada en el método de referencia.

La actividad ureásica de las diferentes muestras se expresó como porcentaje respecto de la actividad de la ureasa comercial sin diluir a la que se le atribuyó 100% de actividad.

V.3 Diseño experimental.

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado, se realizó un análisis de varianza ($p < 0.05$), haciendo una comparación de medias por Tukey. Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar.

VI. RESULTADOS

VI.1. Cuantificación de inhibidores de tripsina en frijol, mezclas (maíz/frijol) y totopos.

Los resultados del contenido de inhibidores de tripsina para frijol sometido a diferentes procesos térmicos, mezclas de harinas maíz/frijol y totopos generados a partir de las mezclas extrudidas se muestran en el Cuadro 5.

Se puede observar que el proceso de cocción tradicional (FCT) fue el que redujo en mayor cantidad a los inhibidores de tripsina teniendo un porcentaje de reducción del 96%, con respecto al frijol crudo (FC), el cual presentó el mayor contenido de inhibidores con 16.55 ± 0.52 UIT/mg.

En cuanto a los cuatro perfiles de extrusión evaluados, el P4 obtuvo el mayor porcentaje de reducción de IT alcanzando un 56%, mientras que el menor porcentaje de reducción lo obtuvo el P1 con un 26%, observándose diferencia estadística entre estos dos perfiles. Por lo que las mezclas extruidas maíz/frijol (HE) en las proporciones 60:40, 70:30 y 80:20 fueron extruidas con las mismas condiciones de temperatura empleadas en el P4 (40°C/60°C/120°C/150°C), al igual que el frijol empleado en las mezclas maíz/frijol (HC) en las mismas proporciones.

En las harinas crudas (HC), donde sólo el frijol recibió un pre-tratamiento térmico y el maíz estaba crudo, se encontraron niveles de inhibidores de 12.28 ± 0.13 , 11.75 ± 0.17 y 9.13 ± 0.24 UIT/mg para las HC 60:40, HC 70:30 y HC 80:20, respectivamente, mostrando diferencia estadística significativa en comparación con el frijol crudo y cocido.

Cuadro 5. Contenido de inhibidores de tripsina (IT) en frijol, mezclas (maíz/frijol) y totopos.

MUESTRAS	INHIBIDORES DE TRIPSINA (UIT/mg)	REDUCCION DE IT (%)
FC	16.55 ± 0.52 ^a	0
FCT	0.62 ± 0.01 ^h	96
P1	12.02 ± 0.30 ^{bc}	27
P2	11.12 ± 0.34 ^{cd}	33
P3	9.75 ± 0.47 ^{de}	41
P4	7.30 ± 0.24 ^f	56
HC 60:40	12.28 ± 0.13 ^b	26
HC 70:30	11.75 ± 0.17 ^c	29
HC 80:20	9.13 ± 0.24 ^e	45
HE 60:40	7.18 ± 0.20 ^f	57
HE 70:30	6.77 ± 0.22 ^f	59
HE 80:20	5.98 ± 0.13 ^f	64
T 60:40	2.29 ± 0.32 ^g	86
T 70:30	1.67 ± 0.04 ^{g^h}	90
T 80:20	1.18 ± 0.40 ^{g^h}	93

IT= inhibidores de tripsina, UIT= unidad inhibidora de tripsina, FC= frijol crudo, FCT= frijol cocido tradicionalmente, P1=frijol extrudido a 40°C/60°C/100°C/135°C, P2= frijol extrudido a 40°C/60°C/100°C/150°C, P3= frijol extrudido a 40°C/60°C/110°C/150°C, P4= frijol extrudido a 40°C/60°C/120°C/150°C, HC 60/40= mezcla de 60% maíz crudo/ 40% P4, HC 70/30= mezcla de 70% maíz crudo/ 30% P4, HC 80/20= mezcla de 80% maíz crudo/ 20% P4, HE 60/40= mezcla de 60% maíz/ 40% frijol ambos extruidos con condiciones P4, HE 70/30= mezcla de 70% maíz/ 30% frijol ambos extruidos con condiciones P4, HE 80/20= mezcla de 80% maíz / 20% frijol ambos extruidos con condiciones P4, T60/40= totopo generado a partir de la mezcla HE 60/40 , T70/30= totopo generado a partir de la mezcla HE 70/30, T80/20= totopo generado a partir de la mezcla HE 80/20.

Cada valor representa el promedio de tres experimentos ± ES. Letras diferentes por columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$) prueba de Tukey.

En las harinas extruidas (HE), donde frijol y maíz fueron extruidos, se alcanzaron los mayores porcentajes de inhibición debido al proceso de extrusión, los cuales fueron de 57, 59 y 64% para HE 60:40, HE 70:30 y HE 80:20 respectivamente, no encontrándose diferencia significativa entre estas harinas con el P4.

Los totopos mostraron bajos valores de IT que iban desde 2.29 ± 0.32 , 1.67 ± 0.04 y 1.18 ± 0.40 UIT/mg, para T 60:40, T 70:30 y T 80:20, respectivamente, alcanzándose altos niveles de reducción (86 a 93%), similares a los FCT en el cual se obtuvo un porcentaje de reducción del 96%. Los totopos T 70:30 y T 80:20 no mostraron diferencia estadística significativa en comparación con el FCT.

VI.2 Actividad ureásica de muestras de frijol, mezclas (maíz/frijol) y totopos.

En el Cuadro 6 se muestran los resultados de la actividad ureásica residual obtenidos en las diferentes muestras de frijol, mezclas de maíz frijol y totopos elaborados a partir de dichas mezclas, sometidos a diferentes tratamientos térmicos.

Los resultados obtenidos de actividad ureásica residual mostrarán una tendencia similar a la de los inhibidores de tripsina en los diferentes tratamientos. Al control de muestra (CTR) se le asignó el 100% de actividad y a partir de esta se compararon los demás tratamientos.

El frijol crudo (FC) presentó un alto porcentaje de actividad ureásica residual el cual fue de 47.6 ± 0.32 %, mientras que el frijol cocido tradicionalmente (FCT) obtuvo el porcentaje más bajo con un valor de 3.2 ± 0.36 %. Cabe destacar que todos los tratamientos mostraron diferencia estadística significativa en comparación con el CTR.

Cuadro 6. Actividad ureásica en muestras de frijol y mezclas (maíz/frijol) y totopos.

Muestra	Actividad Ureásica (%)
CTR	100 ± 1.51 ^a
FC	47.6 ± 0.32 ^b
FCT	3.2 ± 0.36 ^k
P1	40.2 ± 0.39 ^c
P2	38.9 ± 0.22 ^c
P3	30.6 ± 1.60 ^d
P4	23.5 ± 0.16 ^{fg}
HC 60:40	28.1 ± 0.07 ^{de}
HC 70:30	26.3 ± 0.07 ^{ef}
HC 80:20	24.2 ± 0.05 ^{fg}
HE 60:40	21.8 ± 0.07 ^{gh}
HE 70:30	18.9 ± 0.24 ^h
HE 80:20	14.3 ± 0.52 ⁱ
T 60:40	8.9 ± 0.051 ^j
T 70:30	6.6 ± 0.38 ^j
T 80:20	3.2 ± 0.08 ^k

CTR= control(ureasa pura), FC= frijol crudo, FCT= frijol cocido tradicionalmente, P1= frijol extrudido a 40°C/60°C/100°C/135°C, P2= frijol extrudido a 40°C/60°C/100°C/150°C, P3= frijol extrudido a 40°C/60°C/110°C/150°C, P4= frijol extrudido a 40°C/60°C/120°C/150°C, HC 60/40= mezcla de 60% maíz crudo/ 40% P4, HC 70/30= mezcla de 70% maíz crudo/ 30% P4, HC 80/20= mezcla de 80% maíz crudo/ 20% P4, HE 60/40= mezcla de 60% maíz/ 40% frijol ambos extruidos con condiciones P4, HE 70/30= mezcla de 70% maíz/ 30% frijol ambos extruidos con condiciones P4, HE 80/20= mezcla de 80% maíz / 20% frijol ambos extruidos con condiciones P4, T60/40= totopo generado a partir de la mezcla HE 60/40 , T70/30= totopo generado a partir de la mezcla HE 70/30, T80/20= totopo generado a partir de la mezcla HE 80/20.

Cada valor representa el promedio de tres experimentos ± ES. Letras diferentes por columna indican diferencia significativa (p< 0.05) para la prueba de Tukey.

En el caso de los cuatro perfiles de extrusión se obtuvieron porcentajes de ureasa residual de 23.5 ± 0.16 a 40.2 ± 0.39 , en donde el P4 registró el menor porcentaje, presentando además diferencia estadística significativa con los otros tres perfiles. Lo anterior indica que el perfil de extrusión número cuatro (P4) fue el más eficaz, dentro de los cuatro perfiles de extrusión que se probaron, para inactivar los factores antinutricionales presentes en el frijol.

En las HC se obtuvieron porcentajes de actividad ureásica residual muy parecidos entre sí, los cuales fueron de 28.1, 26.3 y 24. 2% para las harinas crudas (HC) en sus diferentes proporciones 60:40, 70:30 y 80:20, respectivamente, donde dichos porcentajes presentaron diferencia estadística significativa en comparación con el FC, mostrando que el pretratamiento térmico en el frijol tuvo un efecto positivo.

En cuanto a las HE, éstas presentaron bajos porcentajes de actividad ureásica residual, donde la HE 80:20 presentó el menor porcentaje (14.3 ± 0.52 %), debido al proceso de extrusión, siendo estadísticamente diferente a las otras dos HE 60:40 y 70:30, las cuales obtuvieron porcentajes de actividad ureásica residual de 21.8 ± 0.07 y 18.9 ± 0.24 %, respectivamente.

En los totopos se obtuvieron porcentajes de actividad ureásica similares a los del frijol cocido tradicionalmente (FCT), dichos porcentajes son 8.9 ± 0.05 , 6.6 ± 0.38 y 3.2 ± 0.08 % para los totopos (T) en sus diferentes proporciones 60:40, 70:30 y 80:20 respectivamente, donde el T 80:20 no presentó diferencia estadística significativa en comparación con el FCT.

VII. DISCUSIÓN

VII.1. Cuantificación de inhibidores de tripsina en frijol, mezclas (maíz/frijol) y totopos.

El frijol crudo (FC) presentó un alto contenido de IT de 16.55 ± 0.52 UIT/mg. Esto se esperaba ya que el FC no recibió ningún tratamiento térmico que inactivara dichos inhibidores. Este resultado difiere con lo reportado por Guzmán y col. (2002) estudiaron el contenido de IT en frijol sembrado en cinco localidades del Altiplano de México; reportando para Bayo Victoria un promedio de 8.3 UIT/mg. Por otro lado, también, Iniestra y col. (2005) quienes estudiaron el contenido de inhibidores de tripsina en 16 variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) de diferentes colores de granos: negro, pinto, bayo, azufrado, flor de mayo y blanco, encontrando que el contenido de inhibidores de tripsina osciló entre 4.78 y 12.22 UIT/mg, reportando para frijol bayo 9.24 ± 0.36 UIT/mg.

Parte de la variación se explica por las diferencias observadas entre cultivares, así como las diferentes condiciones ambientales a las que éstos fueron expuestos y el tipo de cosecha al cual fueron sometidos. Howard y col. (1996) sugieren una influencia de las precipitaciones pluviales en la expresión de IT y un efecto de la sequía durante el desarrollo de la semilla, de la calidad y el valor nutritivo de varias especies de leguminosas. A su vez, Piergiovanni y Pignone (2003) sugieren que la sequía y el estrés térmico durante el crecimiento vegetativo puede favorecer el aumento de expresión de IT. Por otro lado, Pisulewska y Pisulewski (2000) evaluaron el efecto de dos técnicas de cosecha; una directa y otra en dos fases, en cinco plantas leguminosas (frijoles, chícharo, arveja, lentejas y habas de soya), en la composición química proximal y la actividad del IT durante un período de 3 años. Ellos reportaron que los IT de las semillas fueron significativamente alterados ($p < 0,05$) por las técnicas de cosecha, siendo la técnica de dos fases la más eficaz para reducir los IT.

En el FCT se obtuvieron valores residuales de inhibidores de tripsina muy bajos de 0.62 ± 0.01 UIT/mg. Esto se debe a que el calor provocó la desnaturalización de las proteínas y debido a esto el inhibidor perdió su conformación original y por consiguiente su actividad inhibitoria. Esta actividad residual se puede explicar ya que estudios en diferentes leguminosas muestran que por medio de la cocción, se puede reducir significativamente la actividad de los inhibidores, pero persiste una actividad residual de los inhibidores de proteasas atribuidos a la presencia de factores termoestables los cuales parecen aumentar con el tratamiento térmico (Gómez, 1990). Este valor cae dentro de lo reportado por Pérez y col. (2002) quienes estudiaron 49 genotipos de *P. vulgaris* cocidos, los resultados se ubicaron en el intervalo de 0.50 a 1.97 UIT/mg, con un coeficiente de variación intermedio (24.9%). Por otro lado Jacinto y col. (2002) reportaron valores de 2.19 y 2.50 UIT/mg para frijol Bayo Mecentrenal y Bayo Victoria, respectivamente; valores que se encuentran por arriba de los obtenidos en este trabajo; las diferencias se pueden deber a factores como el tiempo y temperatura de cocción. Por ejemplo, Jacinto y Campos (2003) reportaron que una baja actividad del inhibidor de tripsina en el frijol cocido está más correlacionada con un mayor tiempo de cocción y un menor tamaño de grano que con el contenido del mismo inhibidor en el frijol crudo; además, observaron que en la mayoría de los casos la actividad del inhibidor de tripsina tendió a disminuir mientras más prolongado fue el tiempo de cocción.

En el caso de los cuatro perfiles de temperatura de extrusión se observa una clara tendencia de disminución del contenido de inhibidores de tripsina conforme se va aumentando la temperatura de salida del extrusor la cual fue aumentando de 100 a 150°C (Cuadro 5), alcanzando una máxima reducción del 56% en el P4 con una temperatura de salida del extrusor de 150°C. A pesar de que sí se obtuvo una reducción significativa de IT se detectó todavía una cantidad residual de estos compuestos después del proceso de extrusión. Esto se puede deber a la presencia del inhibidor de Bowman Birk, ya que como se sabe hay dos tipos principales de inhibidores de tripsina Kunitz y Bowman-Birk. Sin embargo, diversos estudios han

informado que el inhibidor de Kunitz purificado se desnaturaliza de forma reversible por calentamiento corto a 80°C e irreversiblemente por calentamiento a 90°C, mientras que el inhibidor Bowman-Birk es más resistente a la desnaturalización que el de Kunitz, debido a la cantidad de enlaces disulfuro presentes en su estructura, ya que dichos enlaces estabilizan la forma activa del inhibidor. El inhibidor de Kunitz contiene 2 puentes disulfuro mientras que el Bowman-Birk posee 7, es por ello que cuando este inhibidor purificado se calienta en ambiente seco a 105°C o en solución acuosa al 0.02% durante 10 minutos a 100 °C no se produce pérdida de actividad. Fenneman (2001) reportó que se requiere someter la leguminosa a un proceso en autoclave durante 20 minutos a la presión de 1 Kg/cm² para inactivar totalmente el inhibidor Bowman-Birk. A demás, se ha encontrado actividad residual del inhibidor de tripsina aún en alimentos preparados a partir de frijoles procesados (Wang y Chang, 1988).

Por otro lado Martín y col. (1999) evaluaron el efecto del proceso de extrusión en las propiedades nutrimentales y fisicoquímicas de *Phaseolus vulgaris* L., usaron diferentes temperaturas y humedades de extrusión, obteniendo un contenido de IT 2.4 UIT/mg, en frijol tratado con 30% de humedad y 140°C, logrando una destrucción del 100% con un 30 % de humedad y a una temperatura de 180°C. A demás evaluaron otros factores antinutricionales como inhibidores de α -amilasa y lectinas y encontraron que los inhibidores de tripsina fueron los más termorresistentes. Estos resultados difieren con los obtenidos en este estudio ya que el P4 obtuvo la máxima reducción con un contenido de IT de 7.30 ± 0.235 UIT/mg con una temperatura de 150°C y una humedad del 28%.

Estas diferencias pueden deberse a las condiciones de temperatura, tiempo, humedad y tipo de extrusor empleados en ambos trabajos, ya que se ha demostrado que la efectividad de los tratamientos por calor dependen del pH, la temperatura, el tiempo de calentamiento, las condiciones de humedad, el tamaño de partícula y el tipo de semillas (Belmar, 2001; Muzquiz., 2006). Con temperaturas altas, calentamientos prolongados, tamaño reducido de partícula y altos contenidos

de humedad se produce la mayor destrucción de los inhibidores de tripsina. Sin embargo, el calentamiento excesivo tiene efectos perjudiciales sobre la calidad nutritiva de la proteína, por lo que debe llegarse a un equilibrio con el fin de optimizar el tratamiento (Belmar, 2001; Muzquiz., 2006). Por lo anteriormente mencionado no se probaron temperaturas de extrusión más elevadas, ya que con temperaturas mayores habría una notoria disminución en la calidad nutritiva de la proteína.

En las harinas crudas (HC) se obtuvo un incremento estadísticamente significativo en el contenido de IT con respecto al P4 (Cuadro 4). Esto no se esperaba ya que el frijol empleado en las diferentes HC (60:40, 70:30 y 80:20) se había extruido con las condiciones de extrusión del P4. Este incremento se puede explicar debido a que el maíz estaba crudo. Al principio se sugirió que el maíz no contenía IT; sin embargo, por los resultados obtenidos se procedió a determinar el contenido de inhibidores de tripsina en el maíz crudo teniendo un resultado de 3.28 ± 0.26 UIT/mg, con lo cual se explica dicho incremento. Además, la FAO (1995) reporta que el maíz (*Zea mays*) contienen factores antinutricionales como inhibidores de proteasas, ácido fítico, factores estrógenos e inhibidor de invertasa. También Valle y Lucas (2000) presentaron que el maíz (*Zea mays*) contiene IT (Cuadro 2).

En el caso de las mezclas extruidas HE se obtuvieron porcentajes de reducción de IT mayores al 50% (Cuadro 4), reduciendo a un nivel seguro el contenido de IT en las diferentes HE. Se reportan diversos niveles de seguridad en el contenido de IT en leguminosas, sobre todo en lo que respecta a la alimentación animal, ya que los animales comen los granos crudos por lo que son más susceptibles a los problemas que trae consigo el consumo de factores antinutricionales, estos valores van de 5 a 10 UIT/mg. Por ejemplo, Zarkadas y Wiseman (2000) sometieron a extrusión granos de soya a temperaturas entre 70 y 150 °C y las suministraron a lechones de 10 a 27 kg, observando que los mejores resultados productivos se obtienen con niveles de IT en soya inferiores a 5 UIT/mg. Estos valores sólo se consiguieron con temperaturas en el extrusor superiores a los 110°C. Mientras que

Rueda (2006) reporta que un tratamiento térmico óptimo se debe obtener un producto con menos de 10 UIT/mg de materia seca.

Los resultados obtenidos en este estudio difieren con lo reportado por Anton y col. (2009) quienes produjeron botanas extruidas de harina de maíz enriquecidas con frijol Rojo y Navy en proporciones el 15, 30 y 45%, logrando una reducción de los IT del 100% en todas las muestras. Dicha diferencia se puede deber a las diferentes condiciones usadas en el proceso de extrusión, como ya se discutió anteriormente en el caso de los perfiles, además de la diferencia entre variedades de frijol, así como el tipo de cosecha y condiciones climáticas a las que fueron expuestos.

El menor contenido de IT se encontró en los totopos (Cuadro 5) y este resultado era de esperarse debido a que los totopos se sometieron a un proceso térmico adicional a la extrusión, el cual permitió reducir aún más el contenido de los mismos. Sin embargo, aún después de someterlos a tan altas temperaturas se encontraron valores residuales. Esto se puede explicar ya que los procesos térmicos desnaturalizan su carácter proteico y, por consiguiente, su efecto inhibitor, por lo que en condiciones normales no suelen producir efecto alguno. No obstante, suele quedar un valor residual del inhibidor del 5 al 20%, cuya significancia toxicológica es aún desconocida (Gil, 2010). También hay que recordar que desde la extrusión de las harinas se tenían niveles seguros de IT. La reducción de estos factores es importante ya que interfieren en la proteólisis digestiva, impiden la absorción de aminoácidos, por lo que el efecto a largo plazo se traduce en una disminución del crecimiento. Numerosos estudios han puesto de manifiesto que estos inhibidores de la proteólisis pueden ocasionar una hipertrofia pancreática, con aumento de su actividad proteolítica pero con actividades de amilasa y lipasa inalteradas. Esta hipertrofia pancreática varía de unas especies animales a otras, siendo el hombre una especie poco susceptible (Gil, 2010).

Por otro lado, varios autores han demostrado que es recomendable aplicar métodos combinados para minimizar el daño en la calidad nutricional del alimento y promover

una mayor inactivación de los IT. Por ejemplo, es recomendable después de germinar las semillas escaldarlas con agua hirviendo por tres minutos para inactivar el 90% del inhibidor (Belmar, 2001; Muzquiz 2006; Elizalde y col. 2009).

VII.2 Determinación de actividad ureásica en muestras de frijol, mezclas (maíz/frijol) y totopos.

Todos los reportes existentes en los que se mide la actividad ureásica se enfocan única y exclusivamente para la soya y sus derivados, debido a que la soya contiene un alto porcentaje de IT. Se ha reportado que el inhibidor de Kunitz representa un promedio de 1.4 % del total de proteína de la soya, mientras que el Bowman-Birk se encuentra en promedio en un 0.6% (Ortiz, 2009), por lo tanto, también tiene una buena proporción de la enzima ureasa (esto en el grano crudo). Sin embargo dichos reportes utilizan una técnica diferente para medir la actividad ureásica, cuyo fundamento se basa en determinar la actividad de la ureasa como una función del incremento de pH al actuar la enzima sobre un sustrato (urea) por la liberación de amoníaco (NMX-Y-117-SCFI-2004). Sin embargo, al tratar de aplicar esta técnica a muestras de frijol no obtuvimos resultados favorables, ya que el pH no manifestaba ningún cambio y se vio que esta técnica no era aplicable al frijol, por lo que se tuvo que buscar un método alternativo.

El método alternativo empleado se basó en medir la actividad ureásica por su acción hidrolítica de urea y posterior alcalinización del amonio producido mediante la reacción de Berthelot. Para obtener el porcentaje de actividad ureásica residual en cada una de las muestras se comparó con un control de ureasa pura (CTR), al que se le asignó el 100% de actividad (Cuadro 6).

Los resultados obtenidos en este estudio nos sirvieron para corroborar los obtenidos en la cuantificación de IT, ya que estos resultados siguieron la misma tendencia que

los de IT. Con lo que se comprueba una vez más que la enzima ureasa tiene un nivel de intolerancia al calor muy parecido al de los IT. Esto se puede deber a que la enzima ureasa posee tres o cuatro grupos activos y es la representante de un gran número de enzimas cuya actividad depende de la existencia de grupos sulfhidrilo intactos procedentes de cisteínas que forman parte de la cadena polipeptídica de la enzima (Herrera y col., 2003). Además, como ya se discutió los grupos sulfhidrilo presentes en los IT son los que le dan la estabilidad a la conformación activa del inhibidor y, dependiendo de la cantidad de los grupos sulfhidrilo en la estructura del IT éstos son más o menos termolábiles.

En el caso del FC se obtuvo el mayor nivel de actividad ureásica (Cuadro 6); sin embargo, este resultado es significativamente diferente al CTR, resultado que se esperaba ya que el frijol contiene un bajo contenido de enzima ureasa en comparación con la soya. Olgún y col. (2001) reportaron una actividad urásica residual en soya cruda del 57.5 ± 0.825 %. Cabe destacar que este estudio de Olgún y col. (2001) es el único artículo encontrado que utiliza el mismo método usado en este trabajo y en el cual nos basamos, solo lo aplican a productos de soya.

Para los perfiles de extrusión se vio la misma tendencia de disminución del contenido de actividad ureásica conforme aumentaba la temperatura (Cuadro 6), comprobando que P4 fue el más eficaz, disminución que se atribuye a que la temperatura provoca la desnaturalización de la enzima ureasa. La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama temperatura óptima. Por encima de esta temperatura, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica, y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse (Fenneman, 2001). Por su parte, Rackis y col. (1986) informaron que se precisa absorber un mínimo de 1.200 joules (J) de energía por gramo para inactivar la enzima ureasa y 1.670 J para destruir el 95% de los inhibidores de la tripsina presentes en el grano de soya.

También se sabe que al recibir un tratamiento de temperatura excesiva, algunos aminoácidos libres, en especial la lisina por poseer un grupo amino-épsilon libre, y otros como cistina, histidina y ácido aspártico, reaccionan con azúcares reductores o acídicos para formar enlaces inter e intramoleculares resistentes al ataque enzimático o bien forman compuestos indisponibles como la lisoalanina, reduciéndose así la solubilidad y la digestibilidad de la proteína. Además, un tratamiento inadecuado reduce la estabilidad oxidativa de la grasa contenida en la semilla de soya (Ramos y col., 2006).

En el caso de las harinas crudas (HC) se obtuvieron valores residuales de actividad ureásica ligeramente mayores que para las harinas extruidas (HE), concordando con los resultados obtenidos para IT. Esto a pesar de que no se ha reportado en la literatura la presencia de la enzima ureasa en el maíz; sin embargo, recordemos que el frijol contenido en estas harinas sólo recibió un pretratamiento térmico con las condiciones de extrusión empleadas en el perfil cuatro (P4) y si se observa el contenido residual de actividad ureásica en las diferentes HC (60:40, 70:30 y 80:20) se tiene resultados muy parecidos a los encontrados en el P4 (Cuadro 6).

En las HE se obtuvieron valores bajos de actividad ureásica residual (Cuadro 6); sin embargo, no se han reportado estudios que indiquen estándares óptimos de actividad ureásica, por lo que no se puede decir que los valores aquí obtenidos sean seguros o que no lo sean. En este estudio se midieron los IT y se vio que se llegó a niveles seguros de los mismos, se puede decir que los valores de actividad ureásica aquí reportados también indican niveles de seguridad en cuanto al contenido de factores antinutricionales y el buen cocimiento de las harinas extruidas (HE). Esto se logró debido a que en el proceso de extrusión de un cereal con una leguminosa, la desnaturalización de los almidones y la gelificación y desnaturalización de las proteínas, se produce a temperaturas similares. Cabe destacar que los almidones comienzan a gelatinizarse alrededor de los 65 °C y la gelatinización completa se produce entre los 80 y 90 °C (Herrera y col., 2003). Las proteínas comienzan a volverse insolubles aproximadamente a los 75 °C y a

desnaturalizarse irreversiblemente entre los 100 y 120 °C. Por lo tanto, el proceso de extrusión da lugar a una mejor digestibilidad de ambos nutrientes (Herrera y col., 2003).

Otro parámetro de extrusión que también fue de suma importancia fue el contenido de humedad, ya que si la humedad es excesiva, la mezcla de cereal-leguminosa pasará rápidamente por el extrusor, bajará la temperatura de cocción y se obtendrá un producto con factores antinutricionales activos y con un contenido de humedad potencialmente inestable (Herrera y col., 2003). También debe tomarse en cuenta la temperatura de procesamiento ya que tanto una deficiencia como un exceso de temperatura perjudican la disponibilidad de la fracción proteica. En el primer caso, parte de los factores antinutricionales no se destruyen lo que reducirá la utilización de los aminoácidos. En caso de exceso, se producen reacciones entre los grupos aminos de ciertos aminoácidos y los azúcares libres presentes en los granos (reacciones de Maillard) reduciéndose así la utilización de la fracción proteica (De Luna, 2006).

Anteriormente se había mencionado un método para medir actividad ureásica que era exclusivo de la soya basado en diferencias de pH. Esta técnica sí incluye valores óptimos de actividad ureásica en el grano de soya y ésta debe oscilar dentro del intervalo de 0.05 a 0.2 unidades de pH, valores por arriba de 0.2 indican que el grano de soya está crudo y, por lo tanto, contiene IT; valores menores a 0.05 indican que hubo un sobrecocimiento en el grano (Pérez, 2009).

En el caso del FCT y de los totopos se obtuvieron los niveles más bajos de actividad ureásica residual. Esto se debe a la aplicación de tratamientos térmicos combinados, en el caso de los totopos, y de tiempos más prolongados en el caso del FCT. Olgún y col. (2001) reportaron una relación inversa entre temperatura, humedad y tiempo de tratamiento con los niveles de actividad ureásica residual. Éstos mismos autores encontraron una actividad ureásica residual de 8.2 ± 0.40 % para granos de soya hervidos durante 10 min a 37 °C; también reportan una

actividad ureásica residual para granos de soya sometidos a autoclave a 1 atmósfera de presión por 10 minutos de 2.3 ± 0.173 %. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio, a pesar de que son diferentes tratamientos térmicos y de que la soya contiene un porcentaje mayor de actividad ureásica que el frijol.

VIII. CONCLUSIONES.

El proceso de extrusión para las diferentes muestras resultó ser eficaz para destruir los IT a niveles seguros para la salud, además también logró reducir la actividad ureásica presente en las diferentes muestras.

Los resultados obtenidos para IT siguen la misma tendencia que los obtenidos para actividad ureásica en las diferentes muestras, ya que conforme se fue aumentando la temperatura tanto los valores de IT como de actividad ureásica disminuyeron, en todas las muestras.

El proceso de cocción tradicional fue el tratamiento más eficaz para disminuir los niveles de IT e inactivar la enzima ureasa.

Para que el proceso de extrusión destruya a niveles aún más bajos los IT es recomendable combinar diferentes tratamientos térmicos y con esto también se logra un menor daño al valor biológico de la proteína. Además, debe tenerse en cuenta que el objetivo del proceso de extrusión no es destruir los factores antinutricionales por completo, sino llegar a un compromiso entre la presencia residual de los mismos y el mantenimiento de la calidad de la proteína, especialmente con respecto a la disponibilidad de la lisina.

IX. BIBLIOGRAFÍA.

Abd El-Hady, E. and Habuba, R. 2003. Effect of soaking and extrusion conditions on antinutrients and protein digestibility of legume seeds. *Food Science and Technology*. 36: 285-293.

Anton, A.; Fulcher, G. and Arntfield, S. 2009. Physical and nutritional impact of fortification of corn starch-based extruded snacks with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour: Effects of bean addition and extrusion cooking. *Food Chemistry* 113: 989–996.

Araba, M. and Dale, N. 1990. Evaluation of protein solubility as an indicator of overprocessing of soybean meal. *Poultry Sci.*, 69: 76-83.

Aparicio-Fernández, Manzo-Bonilla, Loarca-Piña. (2005). Comparison of antimutagenic activity of phenolic compounds in newly harvested and stored common beans *Phaseolus vulgaris* against aflatoxin B1. *J. Food Sci.* 70:73-78.

Belmar, R. 2001. Importancia de los factores antinutricionales en la alimentación de animales no rumiantes. En: Congreso de veterinaria. Memorias del X congreso de veterinaria. Yucatán. Pp. 34-54.

Bilbao, T. 2000. Evaluación de la calidad de dos leguminosas durante su almacenamiento comercial. Editorial Universitaria. Universidad de La Habana, Cuba. pp 23-25.

Boniglia, C.; Fedele, E. and Manzini, E. 2003. Measurement by ELISA of active lectin in dietary supplements containing kidney bean protein. *Journal of Food Science*. 68 (4): 1283-1286.

Cabrejas, M.; Sanfiz, B.; Vidal, A.; Moallà, E.; Esteban, R. and López, F. 2004. Effect of fermentation and autoclaving on dietary fiber fractions and antinutritional factors of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52(1): 261-266.

Cuggino, M. 2008. Desarrollo de Alimentos Precocidos por extrusión a base de maíz-leguminosa. Santa Fe, Argentina. Universidad Nacional del Litoral. Para obtener el título de Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Pp 45-49

- De Almeida, G.;** Da Silva, K.; Pissini, S. and Costa de Oliveira, A. **(2006)**. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common vean, chickpea and lentil legumes. *Food Chemistry*. 94: 327-330.
- De Luna. 2006.** Valor nutritivo de la soya. *Investigación y Ciencia*. Vol. 14, No.36. Pp. 29-34.
- Derache, R. 1990.** Toxicología y seguridad de los alimentos. Editorial Omega. Primera Edición. España. Pp 77-82
- DiPietro, C. and Liener, I. 1989.** Heat inactivation of the Kunitz and Bowman-Birk soybean protease inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 37: 39-44.
- Duffus, C. and Slaughter, C. 1985.** Las semillas y sus usos. México: A.G.T. Pp.10-11, 18-21, 32-35, 102-107, 122.
- Elizalde, A.;** Porrilla, Y.; Chaparro, D. **2009.** Factores antinutricionales en semillas. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. Vol 7. No. 1. Pp 45-54.
- FAO. 1995.** Ictiopatología nutricional - Signos morfológicos de la carencia y toxicidad de los nutrientes en los peces cultivados. *FAO Documento Técnico de Pesca* – 330.
- FAO/SMIA. 2001.** Legumbres. *Perspectivas Alimentaria*. <http://www.fao.org/docrep/005/y6027s/y6027s06.htm>.
- Feneman, Owen R. 2001.** Introducción a la ciencia de los alimentos. Segunda Edición. Editorial Acribia. Barcelona España. Pp 479-481.
- Gallardo, M. 2008.** Soya: Harinas de Extracción para la Alimentación del Ganado. Un análisis de las cualidades nutricionales de los diferentes tipos, de acuerdo al método de extracción utilizado. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación experimental Rafaela. Rafaela, Argentina. http://www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/art_divulgacion/ad_0015.htm.
- García, L. 2009.** Contenido total de taninos condensados en las variedades Pinto Zapta, Azufrado Higuera, Negro 8025 y Bayo Madero de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cocidas por calentamiento óhmico. Santiago de Querétaro, Qro. Instituto Politécnico Nacional. Tesis para obtener el título de Maestro en Tecnología Avanzada. 4-13.

- Gil, H. 2010.** Tratado de Nutrición. Tomo II: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos. Editorial Médica Panamericana. Segunda Edición. Madrid España. Pp 536.
- Gómez, A. 1990.** Efectos de tratamientos físicos y químicos sobre factores antinutricionales presentes en las semillas de *Canavalia ensiformis*. Digestibilidad *in vivo* e *in vitro*. Tesis de Postgrado en Botánica. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas. Pp 163.
- Gómez, G. y Quesada, S. 1998.** Factores antinutricionales en los alimentos: inhibidores de tripsina y lectinas. Ing. Cienc. Quím. 18(2): 70-75.
- Gómez, G.; Quesada, S. y Nanne, C. 1998.** Efecto de factores antinutricionales en el pejibaye (*Bactris gasipaes*) sobre el metabolismo de ratas jóvenes. Agronomía Costarricense 22(2): 191-198.
- González, R.; Torres, R. y De Greef, D. 2002.** Extrusión-Cocción de Cereales. Boletín de la Sociedad Brasileña de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 36(2): 104-115.
- González de Mejía, E.; Guzmán, S.; Acosta, J.; Reynoso, R.; Ramírez, E.; Pons, J.; González, M.; Castellanos, J. and Nayeli, J. 2003.** Effect of cultivar and growing location on the trypsin inhibitors, tannins and lectins of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grow in semiarid highlands of México. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51: 5962-5966.
- González de Mejía, E.; Valadez, M.; Reynoso, R. and Loarca, G. 2005.** Tannins, Trypsin Inhibitors and Lectin Cytotoxicity in Tepary (*Phaseolus acutifolius*) and Common (*Phaseolus vulgaris*) Beans. Plant Foods for Human Nutrition 60: 137–145.
- Guzmán, S.; Acosta, J.; Álvarez, M.; García, S. y Loarca, G. 2002.** Calidad alimentaria y potencial nutraceutico del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Agricultura Técnica en México. Vol. 20, No. 002. Pp 159-173.
- Hangen, L. and Bennink, M. 2003.** Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats. Nutrition and Cancer. 44: 60-65.

- Harper, J. and Mercier, C. 1989.** "Extrusion Cooking", Linko P., Editorial American Association of Cereal Chemists, Minnesota, USA, pp. 1-17, 235-247, 339, 465.
- Herrera, C.; Bolaños, N. y Lutz, C. 2003.** Química de Alimentos: Manual de Laboratorio. 1ª Edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. pp. 46-49.
- Howard, T.; Morton, J.; Savage, G. and Russel, A. 1996.** Trypsin inhibitors in New Zealand pea cultivars: quantification and isoforms. Proceedings Nutrition Society of New Zealand, 21,120–124.
- Iniestra, J.; Ibarra F.; Gallegos, J.; Rocha, N. y González, R. 2005.** Factores antinutricios y actividad antioxidante en variedades mejoradas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Agrociencia. Vol. 39, No. 006, Pp. 603-610.
- Jacinto, C. y Campos, A. 2003.** Efecto de la cocción sobre algunas características nutricionales del frijol. Agronomía Mesoamericana 4: 42-47.
- Jacinto, C.; Hernández, H.; Azpiroz, S.; Acosta J. y Bernal I. 2002.** Caracterización de una población de líneas endogámicas de frijol común por su calidad de cocción y algunos de sus componentes nutrimentales. Agrociencia. Vol. 36, No. 004. Pp. 451-459.
- Jood, S.; Mehta, U.; Shingh, R. and Bhat, C. 1985.** Effect of processing on flatus-producing factors in legumes. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 33: 268-271.
- Keshun, L. 1999.** Soybeans Chemistry Technology and Utilization. Meryland, USA. pp 104-110.
- Kokini, J.; Lih-Shiuh, L. and Cheidd, L. 1992.** Effect of starch structure on starch rheological properties. Food Technology. 46(6): 124-139.
- Kuo, Y. 2004.** Effects of different germination conditions on the contents of free protein and nonprotein amino acids of commercial legumes. Food Chemistry Vol. 86. Pp.537 - 545.
- Lee, S.; Prosky, L. y DeVries, J. 1992.** Determination of total, soluble and insoluble dietary fibre in foods- enzymatic-gravimetric method. *MES-TRIS* buffer. Collaborative study. Journal of AOAC International. 75: 395-416.

- Liener, I. and Hill, E. 1953.** The effect of heat treatment on the nutritive value and hemagglutinating activity of soybean oil meal. *J. Nutr.* 99: 609-620.
- Linder, E. 1995.** Toxicología de los alimentos. Segunda Edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pp. 424-429
- Lorenc, A. 2008.** La investigación de la acción de la ureasa. <http://www.scienceinschool.org/2008/issue9/urease/spanish>.
- MAG CR** (Ministerio de Agricultura y Ganadería, Costa Rica). **1991.** Aspectos Técnicos Sobre Cuarenta y Cinco Cultivos Agrícolas de Costa Rica. http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/tec-pepino.pdf
- Martín, M.; Jaime, L.; Karanja, C.; Downie, A.; Parker, M.; López, F.; Maina, R.; Esteban, R.; Smith, A. and Waldron, K. 1999.** Modifications to physicochemical and nutritional properties of hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by extrusion cooking. *Agric Food Chem.* 47: 1174-1182.
- Martínez, D.; Ibáñez, M. y Rincón L. 2002.** Ácido fítico: aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* 52(3): 219-231.
- Matella, N.; Dolan, K.; Stoeckle, W.; Bennink, M.; Lee, Y. and Uebersax, M. 2005.** Use of hydration, germination, and α -galactosidase treatments to reduce oligosaccharides in dry beans. *Journal of Food Science.* 70(3): C203-C207.
- McRae, R.; Robinson, R. and Sadler, M. 1993.** Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. First Edition. Academic Press. San Diego, California, USA. Pp. 2718-2730.
- Míguez, R. 2000.** Caracterización morfoagronómica y bioquímica de germoplasma de judía común (*Phaseolus vulgaris* L.) de España. Tesis de doctorado. Universidad de Santiago de Compostela.
- NMX-Y-117-SCFI-2004.** Alimentos para animales - determinación de actividad ureásica en soya y sus derivados- método de prueba. 30 agosto 2001
- Muzquiz, M. 2006.** Factores no-nutritivos en fuentes proteicas de origen vegetal: Su implicación en nutrición y salud. *Brazilian Journal of Food Technology.* III JIPCA, Janeiro. pp 94-96

Olguín, M.; Zingale, M.; Revelant, G.; Vignale, M. 2001. Actividad ureásica en productos de soja. Propuesta de un nuevo método. Archivos Latinoamericanos de Nutricion. 51 (3): 284-287.

Oloyo, A. 2004. Chemical and nutritional quality changes in germinating seeds of *Cajanus cajan* L. Food Chemistry. Vol. 85. No. 4. Pp. 497 - 502.

Oppert, B.; Kramer, K. and McGaughey W. 1997. Rapid Microplate Assay for Substrates and Inhibitors of Proteinase Mixtures. BioTechniques 23:70-72.

Ortega, C. y Ochoa, R. 2003. El frijol mexicano y el nuevo siglo. Claridaes Agropecuarias. Diciembre 2003. 6-15.

Ortiz, A. 2009. Implicaciones de la utilización de altos niveles de soja en avicultura. XLVI Simposium Científico de Avicultura. Zaragoza, España. 29,9: 81-94.

Paredes, O.; Guevara, F.; Bello, A. 2006. Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas. Primera Edición. Editorial Fondo de cultura económica. México. pp 72-73.

Pérez, P.; Esquivel G. y Rosales R. 2002. Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México. ALAN, jun. 2002, Vol.52, No.2. Pp.172-180.

Pérez, A. 2009. Determinación de las condiciones técnicas para la elaboración de un snack de maíz enriquecido con soya a escala industrial. Quito, Ecuador. Escuela Politécnica Nacional. Tesis para obtener el título de Ingeniería Agroindustrial. Pp. 7-10.

Piergiovanni, A. and Pignone, D. 2003. Effect of year-to-year variation and genotype on trypsin inhibitor level in common bean (*Phaseolus vulgaris* L) seeds. Journal of the Science of Food and Agriculture, 83,473–476.

Pisulewska, E., and Pisulewski, P. 2000. Trypsin inhibitor activity of legume seeds (peas, chickling vetch, lentils, and soya beans) as affected by the technique of harvest. Animal Feed Science and Technology. 86 (3): 261-265.

Pineda, S. 2009. Elaboración, evaluación nutrimental y Natraceutica de mezclas de harinas extruidas maíz/frijol, trigo/frijol y tostadas. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Pp 29-30.

- Rackis, J.;** Wolf, W. and Baker, E. **1986.** Protease inhibitors in plant foods: content and inactivation. En: Friedman, M. (ed). Nutritional and Toxicological significance of enzyme inhibitors in food. Plenum Publishing. Nueva York, USA, pp: 216-220.
- Ramos, N.;** Lúquez, J. y Eyherabide, G. **2006.** Calidad de la harina de soja sometida a distintos tratamientos térmicos para inactivar los factores antinutricionales. http://www.acsoja.org.ar/mercosoja2006/trabajos_pdf/T_188.
- Rocha, N.;** Gallegos, J.; González, R.; Castillo, P.; Delgado, E. and Ibarra, F. **2006.** Functional properties of three common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars stored under accelerated conditions followed by extrusion. LWT. 39: 6-10.
- Rokey, G. 1995.** Tecnología de la extrusión e implicaciones nutricionales. XI Curso de Especialización FEDNA. Wenger Manufacturing Inc. Barcelona, España. 7 y 8, 11: 1-15.
- Rueda, V. 2006.** Sustancias indeseables contenidas en los alimentos. Ganadería. No. 39. Pp. 49-51.
- SAGARPA. 2000.** Situación actual y perspectiva de la producción de frijol en México1990-2000. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/Publicaciones/Archivos/Frijol90-00.pdf>. 25 de julio, 2011.
- SAGARPA. 2005.** Situación actual y perspectiva de la producción de frijol en México2000-2005. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/Publicaciones/Archivos/Frijol00-05.pdf>. 25 de julio del 2011.
- Sangronis, E.;** Ibarz, A.; Barbosa, G. y Sawnsen, B. **2002.** Efecto de la alta presión hidrostática (APH) en la imbibición de agua, tiempos de cocción y microestructura del *Phaseolus vulgaris*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 52 (3): 301-306.
- Sangronis, E.,** Machado, C. y Cava, R. **2004.** Propiedades funcionales de harinas de leguminosas (*Phaseolus vulgaris* y *Caján cajan*). Interciencia. 29(2):80-85.
- Savelkoul, F.;** Van der Pool, A. and Tamminga, S. **1992.** The presence and inactivation of trypsin-inhibitors, tannins, lectins, and amylase-inhibitors in legume seeds during germination. A review. Plant Foods Hum. Nutr. 42: 71-85.

- Shimelis, E. and Rakshit, S. 2007.** Effect of processing on antinutrients and in vitro protein digestibility of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) varieties grown in East Africa. Food Chemistry. 103: 161-172.
- Tapuach, A. 2004.** Una leguminosa muy mexicana. Panorama Agropecuario, Vol. 3, No. 78. Pp 123-127.
- Teijón, R.; Garrido, P.; Blanca, G.; Villaverde, G.; Mendoza, O.; Ramírez, R. 2006.** Fundamentos de Bioquímica metabólica. Editorial Tèbar. Segunda Edición, Madrid España. pp 163.
- Valle, P.; Lucas, B. 2000.** Toxicología de Alimentos. Instituto Nacional de Salud Pública. México, D.F. pp 72-74.
- Valencia, B., 2009.** Evaluación técnica financiera de la industrialización del garbanzo (*Cicer Arietinum*) Usando un Proceso Extrusión. Quito. Escuela Politécnica Nacional. Tesis para obtener el título de Ingeniero Agroindustrial. Pp.10-18.
- Van Der Poel, F. 1990.** Effect of processing on nutritional factors and protein nutritional value of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). A review. Animal Feed Science and Technology. 29 (3-4): 179-208A.
- Vázquez, L. 2006.** Leguminosas del desierto. Hypitia. No.19. http://hypatia.morelos.gob.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=103&Itemid=77.
- Villalobos, M. y Espinoza, M. 2007.** Factores antinutricionales presentes en el arroz pilado crudo. Rev. Costarric. Salud Pública. Vol. 16 No. 31. Pp. 8-12.
- Wang, C. and Chang, S. 1988.** Effect of selected canning methods on trypsin inhibitor activity sterilization valve and firmness of canned navy beans. J. Agri. Food. Chem. 36: 1015.
- Weder, J. 1981.** Protease inhibitors in the *Leguminosae*. In: Advances in legume systematics. Polhill, R. and Raven, P. (Eds.) Royal Botanic Garden Kew, England. Pp. 533-560.
- Whitaker, T.; Dickens, J. and Monroe, R. 1979.** Variability associated with testing corn for aflatoxin. J. Amer. Oil Chem. Soc. 56(9): 789.

Zarkadas, L. and Wiseman, J. 2000. Inclusion of full-fat soybean in piglet diets. Proceedings of the British Society Animal Science Occasional Meeting: The weaner pig. Pp. 45-46