

in North Western Nigeria. Asian Journal of Clinical Nutrition 2009 1(1):12-22

29- Saldiva S, Escuder M. Feeding habits of children aged 6 to 12 months and associated maternal factors. J Pediatr Rio J 2007;83(1):53-8

## Sección: Nutrición

# Mejora de la biodisponibilidad nutricional mediante el proceso biotecnológico de germinación en *Vigna unguiculata*.

Autor(es): Yolanda Aguilera<sup>1</sup>, Vanesa Benítez<sup>1</sup>, Tania Jiménez<sup>1</sup>, Sara Calvo<sup>1</sup>, María Felicia Díaz<sup>2</sup>, María Angeles Martín-Cabrejas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) CSIC-UAM. C/ Nicolás Cabrea, Nº9. Campus de la Universidad Autónoma de Madrid, 28049. Madrid, España. [yolanda.aguilera@uam.es](mailto:yolanda.aguilera@uam.es)

<sup>2</sup>Instituto de Ciencia Animal, Carretera Central, Km 47, 1/2, San José de las Lajas, La Habana, Cuba

*Existe gran parte de la población humana y animal que se encuentran en países en vía de desarrollo y sufren malnutrición proteica. La búsqueda de alimentos e ingredientes alternativos tanto para el hombre como para el ganado resulta esencial. El objetivo de este estudio fue evaluar la mejora de la biodisponibilidad nutricional mediante el proceso biotecnológico de germinación en Vigna unguiculata. Los resultados muestran que esta legumbre exhibe importantes niveles de proteínas (>27mg/100g) y minerales (>8mg/100g). Como resultado de la germinación, estos compuestos aumentaron su presencia, mejorando el valor nutricional de Vigna unguiculata. Además, la germinación produjo cambios en los niveles de compuestos antinutricionales, provocando drásticas reducciones de ácido fítico (27%), acompañados de notables disminuciones de inhibidores de proteína ( $\approx$  23%) y taninos (67%). Por lo tanto, las harinas germinadas de Vigna unguiculata muestran mejor biodisponibilidad de proteínas y minerales que las harinas crudas, incrementando su valor nutricional.*

La búsqueda de nuevas fuentes proteicas, para la alimentación animal, a partir de producciones agrícolas, económica y ecológicamente sostenibles, que no compitan con la alimentación humana y que garantice una disponibilidad estable de las mismas, constituye uno de los mayores retos a los que se enfrentan productores y especialistas del sector agropecuario. Una alternativa posible para la solución de este problema consistiría en la producción y utilización de leguminosas temporales. En Cuba, se ha estado trabajando

en la introducción y mejora genética de especies de leguminosas como *Vigna unguiculata*. Los estudios realizados han puesto de manifiesto el importante potencial agronómico y nutricional de este cultivo, como fuente de alimento no convencional para especies monogástricas (Díaz y Padilla, 1997). La presencia en las semillas de leguminosas de compuestos antinutricionales, como inhibidores de proteasas y  $\alpha$ -amilasa, taninos e inositol fosfato, entre otros, ha limitado, en parte, su uso en la alimentación humana y animal

(Messina, 1999). En general, su consumo se ha asociado con una hipertrofia o hiperplasia pancreática, disminución de la digestibilidad y absorción de aminoácidos, así como de la biodisponibilidad de minerales esenciales (Martín - Cabrejas y col., 1995). El efecto de los antinutrientes depende de su concentración en la dieta o alimento, del tipo de animal, edad y estado físico de los mismos, donde los animales y humanos jóvenes resultan los más sensibles. Así, los inhibidores de proteasas y  $\alpha$ -amilasa interfieren en la acción de las enzimas digestivas, afectando al metabolismo cuando son consumidas en altas concentraciones. Igualmente, el consumo de taninos presente en las leguminosas provoca alteraciones nutricionales debido a las interacciones que se establecen con las proteínas y los minerales, reduciendo su absorción (Liener, 1989). El inositol hexafosfato, principal forma de almacenamiento del fosfato en legumbres (1-5% del peso seco de la semilla), es considerado factor antinutricional ya que los seis grupos fosfato de su molécula lo hacen comportarse como un fuerte agente quelante reduciendo la biodisponibilidad principalmente de cationes di- y trivalentes, tales como  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+}/\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ , bajo las condiciones de pH del tracto gastrointestinal de animales y humanos (Belitz y Grosh, 1997). Además, el ácido fítico disminuye la digestibilidad de las proteínas (Reddy y col., 1988), almidón (Yoon y col., 1983), y lípidos (Nyman y Björck, 1989).

En los últimos años se han llevado a investigaciones con el fin de reducir el contenido de factores antinutricionales en las legumbres destinadas al consumo humano y animal, y así aumentar la digestión de las proteínas y carbohidratos y la biodisponibilidad de los minerales. Numerosas técnicas de procesamiento, tales como remojo, cocinado, germinación o fermentación, reducen el contenido de estos componentes (Martín-

Cabrejas, 2003). Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es evaluar la mejora de la biodisponibilidad nutricional en *Vigna unguiculata*, con potencial agronómico y nutricional para la alimentación humana y animal en el trópico, así como el efecto del proceso de germinación en compuestos antinutricionales.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material

Semillas de *Vigna unguiculata* fueron suministradas por Instituto de Ciencia Animal (La Habana, Cuba). Las legumbres fueron sembradas en la estación lluviosa y recolectadas a mano cuando la semilla estaba madura. Las semillas se secaron al sol para reducir el contenido de humedad (12-14%) y se almacenaron entre 6-10 °C. Tres muestras representativas de 200 g fueron tomadas al azar para el estudio de los factores antinutricionales.

### Germinación

El proceso de germinación que se llevo a cabo fue el siguiente: se pesaron cuatro porciones de 150g que se mantuvieron en remojo 6 horas a temperatura ambiente, agitando cada 30 minutos. Las semillas fueron molidas y liofilizadas para su posterior análisis. Transcurrido ese tiempo se retiró el agua de remojo y los granos escurridos se dejaron en reposo durante 24 horas. Al cabo de las 24 horas, se obtienen las muestras para el Tratamiento II, los granos en proceso de germinación que conforman los tratamientos restantes se pasan para bandejas plásticas con capacidad para las cuatro repeticiones. La germinación se realizó con intervalos de iluminación, iluminación total, y oscuridad.

### Tratamientos llevados a cabo:

I-Control (grano no procesado)

II- Grano remojado durante 6 horas + 1 día de germinación

III- Grano remojado durante 6 horas + 2 días de germinación

IV- Grano remojado durante 6 horas + 3 días de germinación

V- Grano remojado durante 6 horas + 4 días de germinación

### **Determinación de proteína**

La determinación inicial de proteínas presente en cada muestra, se realizó mediante el método AOAC (1990). Se basa en una mineralización Kjeldahl, seguida de una determinación colorimétrica de nitrógeno. La digestión Kjeldahl consiste en una mineralización de la muestra con ácido sulfúrico concentrado, empleando una mezcla de selenio y sulfato potásico como catalizador.

### **Determinación de minerales**

La concentración de minerales se analizó por ICP-masas con una digestión previa en vaso abierto (Elan 6000 PE Sciex).

### **Determinación de Inositol Fosfato**

La determinación del inositol fosfato se llevó a cabo mediante el análisis pormenorizado de cada uno de las fracciones (IP3-IP6), basándose en el método Burbano y col. (1995). El análisis se realizó mediante HPLC (Beckman System Gold), con separación de par-iónico, utilizando un detector de índice de refracción.

### **Determinación de Inhibidores Enzimáticos**

Se realizaron extractos de cada una de las legumbres objeto de estudio con un tampón PBS de fosfato sódico 0.02 M a pH 7.0, utilizando una proporción harina: tampón de 1:10 (p/v), 1 °C durante 16 horas. Transcurrido ese tiempo se centrifugó (20.000 rpm, 25

minutos), descartando el residuo y conservando el sobrenadante a 20 °C.

La determinación del contenido de inhibidores de proteasa se desarrolló según el método de Grant y col. (1986).

El contenido del inhibidor de  $\alpha$ -amilasa en los extractos de harinas se determina según el método de almidón-iodo, de Piergiovanni (1992).

### **Determinación de Taninos**

El análisis de taninos condensados o proantocianidinas se basa en la transformación de las proantocianidinas en antocianidinas por calentamiento en medio ácido en presencia de  $\text{Fe}^{+2}$  (Ribéreau-Gayon y Stonestreet, 1965).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Desde el punto de vista bromatológico las transformaciones que se producen cuando el proceso de germinación tiene lugar en condiciones de intervalos de iluminación son superiores a las encontradas en oscuridad total e iluminación total, principalmente por el gran incremento proteico. En los procesos de germinación llevados a cabo (intervalos de iluminación, iluminación total y oscuridad total) se produjo un incremento del contenido proteico de los granos durante el proceso de germinación (Figura 1), mientras que en los minerales (Figura 2), si bien en el Ca no se observaron cambios importantes con el avance del proceso germinativo, en el K siempre se produjo un incremento importante. Los contenidos de P y de Mg durante los intervalos de iluminación, se incrementaron significativamente, mientras que en iluminación total no se observaron diferencias entre el control y las 96 horas de germinación, para la oscuridad total se produjo una disminución de sus valores con el avance del proceso germinativo.

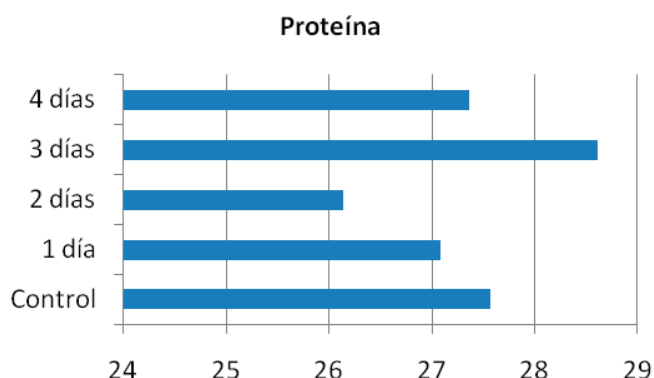


Figura 1. Efecto del proceso de germinación en el contenido proteico (Intervalos de iluminación) (%)

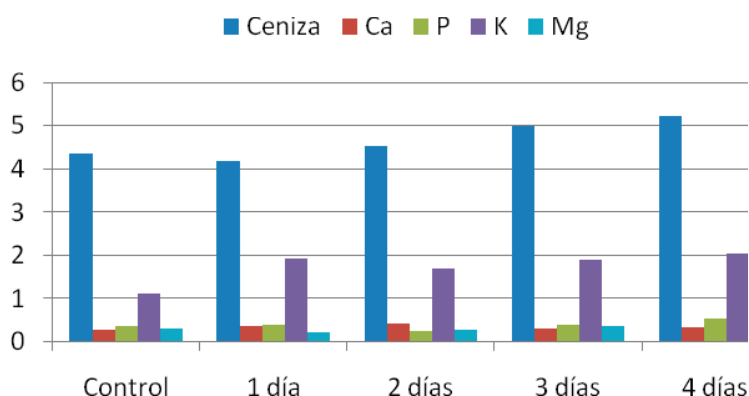


Figura 2. Efecto del proceso de germinación en el contenido mineral (Intervalos de iluminación) (%)

Una vez obtenidos los resultados de la disponibilidad de minerales y de proteína, se seleccionó el tratamiento más eficaz para desarrollar la determinación de los compuestos antinutricionales. El tratamiento elegido fue el proceso de germinación llevado a cabo en intervalos de iluminación.

Los contenidos totales de inositol fosfato, así como de los compuestos individuales aparecen reflejados en la Figura 3. El contenido total de inositol fosfato, determinado mediante HPLC, fue importante en la legumbre estudiada (10.5

mg/g). Estos resultados fueron superiores a los encontrados previamente en otras legumbres (Muzquiz y col., 1999). Las condiciones climáticas, el tipo de suelo y la variedad afectan al contenido de inositol fosfato (Burbano y col., 1995). Además, algunos de los valores obtenidos en la literatura (Bhatty, 1995) fueron obtenidos por métodos colorimétricos que son menos exactos y precisos que el HPLC (Burbano y col., 1995).

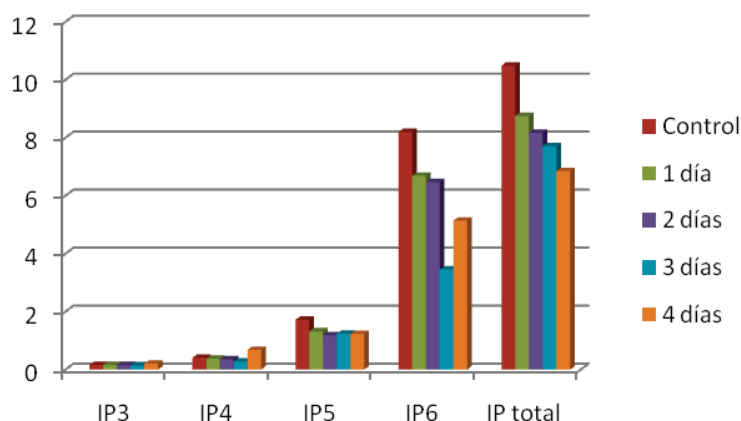


Figura 3. Contenidos de las distintas fracciones de Inositol Fosfato durante el proceso de germinación (Intervalos de iluminación) (mg/g materia seca)

en garbanzos y lentejas y Greiner y col. (1998) en otras legumbres.

El porcentaje con respecto al total de inositol fosfato de la suma de IP6 e IP5 representa más del 70 % en las legumbres estudiadas, siendo el contenido de IP6 siempre superior al de IP5. Por lo tanto, los resultados muestran claramente un contenido importante de inositol fosfato, así como un amplio rango de variación en su composición. Gracias al proceso de germinación el contenido de inositol fosfato se ve reducido un 16% cuando la legumbre ha sido germinada durante 1 día, un 22% tras 2 días de germinación, un 26% tras 3 días de germinación y un 35% tras 4 días de germinación. La reducción que se produce en este antinutriente es directamente proporcional al número de días de germinación. La disminución experimentada durante la germinación se debe probablemente a un incremento de la actividad de la fitasa lo que conlleva al descenso de la fracción IP6 e IP5 (37% en ambas fracciones tras 96h de germinación) y al consiguiente aumento de las fracciones IP3 e IP4 (31% y 66%, respectivamente). Estos datos coinciden con los encontrados por Ghavidel y Prakash (2007) in legumbres convencionales, Egli y col. (2002)

A la vista de los resultados obtenidos en el análisis del antinutriente inositol fosfato, se seleccionó el tratamiento de germinación que provocó mayores reducciones (3 días en intervalos de luz) para determinar los niveles de inhibidores de proteasas y de taninos.

Los niveles de inhibidores de tripsina y quimotripsina se muestran en el Figura 4. *Vigna unguiculata* muestra un contenido de inhibidores de tripsina nutricionalmente significativos. (28.7 mg/g) y similar al encontrado en *Phaseolus vulgaris* (Martín-Cabrejas y col., 1995). Hasta el momento no se conoce el origen de los altos niveles de este inhibidor en las legumbres, ni tampoco el papel fisiológico que desempeña en la planta. Respecto al inhibidor de quimotripsina, la legumbre objeto de estudio presenta niveles superiores a los obtenidos en el análisis de los inhibidores de tripsina (31.1 mg/g) y similares a los publicados por Sridhar y Seena (2006). El tratamiento biotecnológico de germinación provoca reducciones significativas en el contenido de dichos inhibidores (28% en el

caso del inhibidor de tripsina y 19% en el caso del inhibidor de quimotripsina).

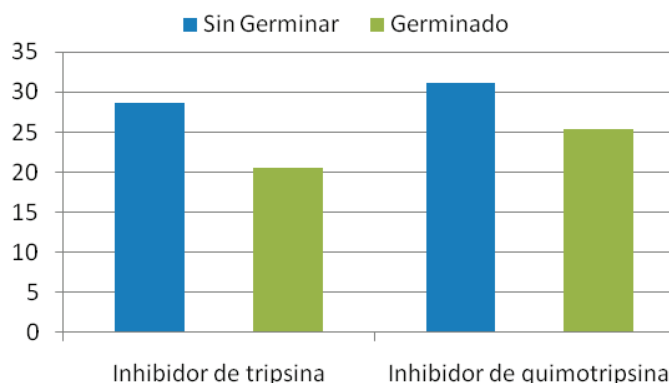


Figura 4. Contenido de Inhibidores de Proteasa durante el proceso de germinación (3 días, Intervalos de iluminación) (mg/g materia seca).

En cuanto a los niveles de inhibidor de  $\alpha$ -amilasa (0.1 mg/g) y de taninos condensados (0.2 mg/g), fueron significativamente más bajos que los inhibidores de tripsina y quimotripsina. Estos resultados coinciden con lo publicado en otros trabajos en legumbres no convencionales (Sidduraju y Becker, 2005; Sridhar y Seena, 2006). Al igual que ocurría con el resto de compuestos antinutricionales estudiados, el proceso de germinación conlleva destacadas reducciones de estos factores, siendo más acusadas en los inhibidores de  $\alpha$ -amilasa, puesto que no fueron detectados después del tratamiento. Los taninos sufrieron reducciones de 67%.

## CONCLUSIÓN

Las legumbres no convencionales que se cultivan de forma sostenible bajo condiciones de clima tropical muestran niveles de factores antinutricionales (inhibidores de proteasa, taninos e inositol fosfato) relevantes por lo que es preciso su procesamiento. En este sentido, la germinación parece ser un proceso económicamente viable que produce una drástica reducción de los inhibidores de

proteasa e importantes descensos de inositol fosfato. Por lo tanto después de la aplicación de un proceso biotecnológico de germinación, la legumbre *Vigna unguiculata* muestra una mejora de la calidad nutricional debido un aumento de la biodisponibilidad y digestibilidad de la fracción proteica y mineral.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación ha sido financiado por el Programa de Cooperación Interuniversitaria e Investigación Científica de la AECID (A/030613/10).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Belitz, H. D., Grosh, W. (1997) *Química de los alimentos*. 2ª ed. Ed. Acribia.
- Benítez, V., Mollá, E., Martín-Cabrejas, M.A., Aguilera, Y., López-Andréu, F.J., Cools, K., Terry, L.A., Esteban, R.M.. *Plant Food Hum Nutr.* In Press.
- Bhatti, R. S. (1995) *J. Sci. Food Agric.*, 68, 489-496.
- Burbano, C., Muzquiz, M., Osagie, A., Ayet, G., Cuadrado, C. (1995) *Food Chem.*, 52, 321-325.

- Díaz, M.F., Padilla, C. (1997) IV Encuentro sobre Nutrición de Animales Monogástricos. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba.
- Egli, I., Davidsson, I., Juillerat, M. A., Barclay, D., Hurrell, R. F. (2002). *J. Food Sci.*, 67(9), 3484–3488.
- Ghavidel, R. A., Prakash, J. (2007). *LWT*, 40, 1292-199.
- Grant G., McKenzie N.H., Watt W., Stewart J.C., Dorward P.M., Pusztai A. (1986). *J. Sci. Food Agric.*, 37, 1001-1010.
- Greiner, R., Pedrosa, M.M., Muzquiz, M., Ayet, G., Cuadrado, C., Burbano, C. Wageningen: EAAP, 1998; pp 82-83.
- Liener (1989). In *Food Uses of Whole Oil and Protein seeds* pp 344-371 (E W Lusas, D R Erickson and W Nip eds) Illinois: American Oil Chemistry Society.
- M Angeles 2003
- Martín-Cabrejas, M.A., Ariza, N., Esteban, R.M, Mollá, E., Waldron, K.W., López-Andreu, F.J. (2003). *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1254-159.
- Martín-Cabrejas, M.A., Esteban, R.M, Waldron, K.W., Maina, G., Grant, G., Bardocz, S., Pusztai, A. (1995). *J. Sci. Food Agric.*, 69, 429-435.
- Messina, M. J. (1999). *American J. Clinic of Nutr.*, 70, 439-450
- Muzquiz, M., Burbano, C., Ayet, G., Pedrosa, M., Cuadrado, C. (1999). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 3 (4), 210-216.
- Nyman, M. E., Bjorck, I. M. (1989) *J. Food Sci.* 54, 1332-1335.
- Piergiovanni, A. R. (1992). *LWT*, 25, 321-324.
- Reddy, N. R., Sathe, S. K., Pierson, M. D. (1988) *J. Food Sci.*, 53, 107–110.
- Ribéreau-Gayón, P., Stonestreet, E. (1965) *Chem. Anal.*, 48, 188-196.
- Siddhuraju, P., K. Becker. (2005). *Food Chem.* 91(2): 275-286.
- Sridhar, K. R., Seena, S. (2006). *Food Chem.*, 99, 267-288.
- Yoon, J. H., Thompson, L. U., Jenkins, D.J.A (1983). *Am. J. Clin. Nutr.*, 38, 835-842..