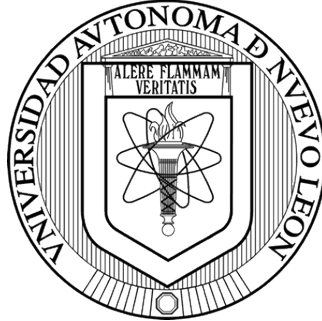


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



**CALIDAD NUTRICIONAL *IN VITRO* DE LA FRACCIÓN PROTEICA  
DE HABA (*VICIA FABAE*)**

**POR:**

**VICTOR ANDRÉS AYALA RODRÍGUEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

**MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO**

**NOVIEMBRE, 2021**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**



**CALIDAD NUTRICIONAL *IN VITRO* DE LA FRACCIÓN PROTEICA  
DE HABA (*VICIA FABAE*)**

**POR**

**VICTOR ANDRÉS AYALA RODRÍGUEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. EN C. JESÚS ALBERTO VÁZQUEZ RODRIGUEZ**

**MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO**

**NOVIEMBRE, 2021**

**DRA. EN C. BLANCA EDELIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ**  
**SUBDIRECTORA DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y POSGRADO**  
**FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN, UANL**

**P R E S E N T E :**

Por este conducto le comunicamos que hemos concluido la dirección de la tesis titulada: "Calidad nutricional *in vitro* de la fracción proteica de haba (*Vicia faba*)", presentada por el LN Victor Andrés Ayala Rodríguez con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

Atentamente

*"Alere Flamma Veritatis"*

Monterrey, Nuevo León a noviembre de 2021

---

Dr. Jesús Alberto Vázquez Rodríguez

Director

## COMITÉ DE EVALUACIÓN DE TESIS

El comité de Evaluación de Tesis APROBÓ la tesis titulada: “Calidad nutricional *in vitro* de la fracción proteica de haba (*Vicia faba*)”, presentada por LN Víctor Andrés Ayala Rodríguez con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Monterrey, Nuevo León a noviembre de 2021

---

Dr. Jesús Alberto Vázquez Rodríguez

Presidente

---

Dra. en C. Blanca Edelia González Martínez

---

Dr. en C. Carlos Abel Amaya Guerra

## **Agradecimientos**

A Dios.

*...Sea bendito el nombre de Dios desde la eternidad hasta la eternidad; porque suya es la sabiduría y el poder. Y Él cambia los tiempos y las sazones; quita reyes, y pone reyes; da la sabiduría a los sabios, y la ciencia a los entendidos.*

Dn 2:20 - 21

# Tabla de contenido

Resumen.....	1
Abstract.....	2
I. Introducción .....	3
II. Antecedentes.....	4
2. Leguminosas.....	4
2.1 Haba ( <i>Vicia faba</i> ) .....	5
2.1.1 Antecedentes históricos.....	5
2.1.2 Cultivo y cosecha.....	5
2.1.3 Producción .....	6
2.1.4 Beneficios del haba al medio ambiente.....	6
2.1.5 Composición nutricional.....	7
2.1.6 Características de la fracción proteica del haba .....	7
2.2 Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos de haba .....	10
2.3 Importancia nutricional de la proteína vegetal .....	11
2.4 Digestión gastrointestinal de las proteínas .....	12
2.4.1 Digestión <i>in vitro</i> y bioaccesibilidad de las proteínas.....	16
2.5 Péptidos bioactivos de proteínas vegetales.....	17
2.5.1 Péptidos bioactivos y la importancia de sus efectos biológicos .....	18
III Hipótesis .....	22
IV. Objetivos .....	22
4.1 Objetivo general.....	22
4.2 Objetivos específicos.....	22
V Metodología.....	23
5.1 Diseño de estudio .....	23
5.2 Estrategia general de diseño experimental.....	23
5.2.1 Material, equipo y reactivos .....	24

5.3 Preparación de la muestra .....	25
5.3.1 Obtención de la harina de haba cocida.....	25
5.3.2 Obtención de la harina de haba cruda .....	25
5.3.3 Obtención de concentrados proteicos de harina de haba .....	26
5.4 Análisis proximal de harinas y concentrados proteicos .....	26
5.4.1. Determinación de humedad (AOAC 14.003).....	27
5.4.2 Determinación de cenizas (AOAC 14.006) .....	27
5.4.3 Determinación de proteínas (AOAC 992.23).....	27
5.4.4 Determinación de extracto etéreo (AOAC 7.056) .....	28
5.4.5 Determinación de fibra cruda (AOAC 962.09) .....	28
5.4.6 Calculo extracto libre de nitrógeno por diferencia .....	29
5.5 Digestión <i>in vitro</i> .....	29
5.5.1 Cuantificación de proteína de las muestras digeridas .....	31
5.5.2 Determinación de digestibilidad proteica <i>in vitro</i> .....	32
5.5.3 Bioaccesibilidad de las proteínas digeridas .....	32
5.5.4 Cinética de liberación proteica de las muestras digeridas.....	33
5.6 Electroforesis (SDS-PAGE).....	33
5.7 Evaluación de parámetros nutricionales: .....	34
5.7.1 Determinación cromatográfica líquida de alto rendimiento de aminoácidos libres de las muestras.....	34
5.7.2 Aminoácido esencial limitante, Puntuación de aminoácidos esenciales, Puntuación de aminoácidos corregida por la digestibilidad de las proteínas <i>in vitro</i> e Índice de eficiencia proteica estimado.....	35
5.8 Análisis estadístico .....	36
VI. Resultados .....	37
6.1 Rendimiento de la extracción proteica de harina cruda.....	37
6.2 Análisis proximal de harinas y aislado proteico .....	37
6.3 Determinación de digestibilidad proteica <i>in vitro</i> .....	38

6.4 Bioaccesibilidad de la proteína de las muestras digeridas .....	39
6.6 Cinética de liberación proteica de las muestras sometidas a la digestión <i>in vitro</i> ....	39
6.7 Electroforesis (SDS-PAGE).....	43
6.8 Evaluación de parámetros nutricionales: .....	50
6.8.1 Determinación cromatográfica líquida de alto rendimiento de aminoácidos libres de las muestras, Aminoácido esencial limitante, Puntuación de aminoácidos esenciales, Puntuación de aminoácidos corregida por la digestibilidad de las proteínas <i>in vitro</i> e Índice de eficiencia proteica calculado .....	50
VII Discusión.....	52
7.1 Rendimiento de la extracción proteica de harina cruda.....	52
7.2 Análisis proximal de harinas y aislado proteico .....	54
7.3 Determinación de digestibilidad proteica <i>in vitro</i> .....	56
7.4 Bioaccesibilidad y cinética de liberación proteica de las muestras sometidas a la digestión <i>in vitro</i> .....	59
7.5 Electroforesis (SDS-PAGE).....	63
7.6 Evaluación de parámetros nutricionales .....	65
7.6.1 Determinación cromatográfica líquida de alto rendimiento de aminoácidos libres de las muestras, Aminoácido esencial limitante, Puntuación de aminoácidos esenciales, Puntuación de aminoácidos corregida por la digestibilidad de las proteínas <i>in vitro</i> e Índice de eficiencia proteica calculado .....	66
VIII. Conclusiones.....	69
IX Bibliografía .....	70



## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Producción mundial de las principales leguminosas	4
2	Producción mundial de haba	6
3	Composición nutricional del haba seca y cruda por 100g	7
4	Perfil proteico del haba seca	8
5	Contenido de aminoácidos en 100 g de haba madura y cruda	9
6	Efectos biológicos de diferentes péptidos contenidos en las leguminosas	18
7	Preparación de soluciones madre para digestión <i>in vitro</i>	30
8	Porcentaje de rendimiento de diferentes extracciones proteicas y su contenido de proteína	37
9	Composición proximal de harina cruda, harina cocida, aislado proteico y concentrado proteico con polifenoles	38
10	Porcentaje de digestibilidad proteica <i>in vitro</i> de harina cruda, harina cocida, aislado proteico y concentrado proteico con polifenoles	38
11	Porcentaje de bioaccesibilidad de harina cruda, harina cocida, aislado proteico y concentrado proteico con polifenoles	39
12	Velocidad promedio de proteína total liberada (mg/mL) <i>in vitro</i>	40
13	Proteína total liberada (mg/mL) <i>in vitro</i>	41
14	Cinética de liberación (mg/mL por min) <i>in vitro</i>	41
15	Peso molecular de las proteínas identificadas mediante SDS-PAGE en la harina de haba cruda	44
16	Peso molecular de las proteínas identificadas mediante SDS-PAGE en la harina de haba cocida	45
17	Peso molecular de las proteínas identificadas mediante SDS-PAGE en la harina aislado proteico sin polifenoles	46
18	Peso molecular de las proteínas identificadas mediante SDS-PAGE en la harina concentrado proteico con polifenoles	47
19	Comparación del perfil de aminoácidos y parámetros nutricionales de harina cruda, harina cocida, aislado proteico y concentrado proteico con polifenoles	51

## Lista de figuras

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	Digestión de las proteínas alimentarias	<b>13</b>
<b>2</b>	Metabolismo de las proteínas alimentarias	<b>14</b>
<b>3</b>	Esquema general del diseño experimental	<b>23</b>
<b>4</b>	Esquema general del proceso para la digestión <i>in vitro</i>	<b>31</b>
<b>5</b>	Proteína total liberada (mg/mL) <i>in vitro</i>	<b>42</b>
<b>6</b>	Cinética de liberación (mg/mL por minuto) <i>in vitro</i>	<b>42</b>
<b>7</b>	Proteínas identificadas mediante el software GelAnalyzer 19.1 en el perfil electroforético de Harina de haba cruda	<b>44</b>
<b>8</b>	Proteínas identificadas mediante el software GelAnalyzer 19.1 en el perfil electroforético de Harina de haba cocida	<b>45</b>
<b>9</b>	Proteínas identificadas mediante el software GelAnalyzer 19.1 en el perfil electroforético de aislado proteico sin polifenoles	<b>46</b>
<b>10</b>	Proteínas identificadas mediante el software GelAnalyzer 19.1 en el perfil electroforético de concentrado proteico con polifenoles	<b>47</b>
<b>11</b>	Perfil electroforético por peso molecular de las proteínas de APS y CPP	<b>48</b>
<b>12</b>	Perfil electroforético por peso molecular de fracción proteica de harina cruda y harina cocida	<b>49</b>

## Nomenclatura

<b>°C</b>	Grado Celsius
<b>μL</b>	Microlitros
<b>μm</b>	Micrómetro
<b>AA</b>	Aminoácidos
<b>ASP</b>	Aislado proteico sin polifenoles
<b>CHO</b>	Carbohidratos
<b>CMH-I</b>	Antígenos de histocompatibilidad de clase I
<b>CPP</b>	Concentrado proteico con polifenoles
<b>CSP</b>	Concentrado proteico sin polifenoles
<b>Cys</b>	Cisteína
<b>DPIV</b>	Digestibilidad proteica <i>in vitro</i>
<b>EAAS</b>	Puntuación de aminoácidos esenciales
<b>ECA</b>	Enzima convertidora de angiotensina
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>FGS</b>	Fluido gástrico simulado
<b>FIS</b>	Fluido intestinal simulado
<b>FSS</b>	Fluido salival simulado
<b>h</b>	Hora/s
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HCl</b>	Hidróxido de sodio
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio
<b>kDa</b>	Kilodalton, unidad de masa atómica
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de potasio monobásico

<b>L</b>	Litro
<b>M</b>	Molar
<b>Met</b>	Metionina
<b>MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub></b>	Cloruro de magnesio hexahidratado
<b>min</b>	Minuto/s
<b>mL</b>	Mililitro
<b>N</b>	Nitrógeno
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sodio
<b>OPA</b>	O-Ftalaldehído
<b>Pb</b>	Péptidos bioactivos
<b>PDCAAS-IV</b>	Puntuación de aminoácidos corregida por la digestibilidad de las proteínas <i>in vitro</i>
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Receptor activado por proliferadores peroxisómicos gamma
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis unidimensional desnaturizante en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TEMED</b>	Tetrametiletildiamina

## Resumen

El haba (*Vicia faba*) es apreciada por su valor nutricional y alto contenido en proteínas. Su componente proteico presenta actividad antifúngica, anticancerígena, hipocolesterolémica, antioxidante, entre otras. Algunos de estos beneficios son atribuidos a proteínas y péptidos biológicamente activos que son liberados de la matriz alimentaria, y son bioaccesibles para ejercer su efecto funcional en diversos sistemas biológicos. Sin embargo, el aislado proteico de haba se ha estudiado poco hasta ahora. El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad nutricional *in vitro* de la fracción proteica de haba (*Vicia faba*) y su potencial funcional.

Se avaluó la fracción proteica de semillas maduras de haba cruda y cocida. La extracción proteica de la harina desengrasada de semilla de haba cruda se llevó a cabo mediante la precipitación ácida (pH 4) con el punto isoeléctrico. Se realizó la determinación cromatográfica líquida de alto rendimiento de aminoácidos libres. Las muestras fueron sometidas a una digestión gastrointestinal *in vitro*, y se dializaron durante 180 min para simular la absorción intestinal. La bioaccesibilidad se estimó a través del porcentaje de proteína dializada cuantificada con el método Scopes. Después de la digestión *in vitro*, la fracción proteica fue analizada mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). La calidad nutricional se determinó mediante técnicas *in vitro*.

El aislado proteico sin polifenoles (ASP) mostró un rendimiento de extracción de  $16.97 \pm 0.56\%$ , con la mayor concentración proteica de  $94.39 \pm 0.76\%$ . El tratamiento térmico aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) la digestibilidad proteica *in vitro* en la harina de haba cocida ( $94.15 \pm 2.45\%$ ). El ASP y el concentrado proteico con polifenoles (CPP) mostraron la mayor bioaccesibilidad,  $29.85 \pm 1.88$  y  $33.19 \pm 1.65\%$ , respectivamente, sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). El análisis mediante SDS-PAGE reveló la presencia de péptidos de bajo peso molecular ( $< 15$  kDa) bioaccesibles en la harina cruda, ASP y CPP. El aminoácido esencial limitante en las cuatro muestras pertenece a los AA azufrados (Met + Cys). La puntuación de aminoácidos esenciales aumentó en la harina de haba sometida al proceso de cocción respecto a la cruda (0.61 contra 0.78). La PDCAAS-IV (%) aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) después del tratamiento térmico, de 19 hasta 73%, en la harina cruda y la harina cocida, respectivamente. El mayor E-PER (2.15) se obtuvo en el ASP.

La fracción proteica de haba (*Vicia faba*) presentó una calidad nutricional *in vitro* y propiedades potenciales para su uso como ingrediente funcional en el desarrollo y formulación de nuevos alimentos. Se deben realizar más investigaciones para promover el uso de la fracción proteica de haba, debido a que actualmente esta infrutilizada.

## Abstract

The broad bean (*Vicia faba*) is appreciated for its nutritional value and high protein content. Its protein component has antifungal, anticancer, hypocholesterolemic, and antioxidant activity, among others. Some of these benefits are attributed to biologically active proteins and peptides that are released from the dietary matrix, and are bioaccessible to exert their functional effect in various biological systems. However, the bean protein isolate has so far been little studied. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* nutritional quality of the faba bean (*Vicia faba*) protein fraction and its functional potential.

The protein fraction of mature raw and cooked broad bean seeds was evaluated. The protein extraction of the defatted raw bean seed flour was carried out by acid precipitation (pH 4) with the isoelectric point. High performance liquid chromatographic determination of free amino acids was carried out. The samples were subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion and dialysed for 180 min to simulate intestinal absorption. Bioaccessibility was estimated through the percentage of dialyzed protein quantified with the Scopes method. After *in vitro* digestion, the protein fraction was analyzed by denaturing electrophoresis on polyacrylamide gels (SDS-PAGE). The nutritional quality was determined by *in vitro* techniques.

The protein isolate without polyphenols (ASP) showed an extraction yield of  $16.97 \pm 0.56\%$ , with the highest protein concentration of  $94.39 \pm 0.76\%$ . The heat treatment significantly increased ( $p < 0.05$ ) the *in vitro* protein digestibility in the cooked bean flour ( $94.15 \pm 2.45\%$ ). The ASP and the protein concentrate with polyphenols (CPP) showed the highest bioaccessibility,  $29.85 \pm 1.88$  and  $33.19 \pm 1.65\%$ , respectively, without significant differences ( $p > 0.05$ ). Analysis by SDS-PAGE revealed the presence of bioaccessible low molecular weight peptides ( $< 15$  kDa) in raw flour, ASP and CPP. The limiting essential amino acid in the four samples belongs to sulfur AA (Met + Cys). The essential amino acid score increased in bean flour subjected to the cooking process compared to raw (0.61 vs. 0.78). PDCAAS-IV (%) increased significantly ( $p < 0.05$ ) after heat treatment, from 19 to 73%, in raw flour and cooked flour, respectively. The highest E-PER (2.15) was obtained in the ASP.

The protein fraction of broad bean (*Vicia faba*) presented an *in vitro* nutritional quality and potential properties for its use as a functional ingredient in the development and formulation of new foods. More research should be done to promote the use of the bean protein fraction, since it is currently underutilized.

## I. Introducción

La haba (*Vicia faba*) es uno de los cultivos más antiguos y valorado en la alimentación, ocupando el quinto lugar de producción entre diferentes leguminosas en el mundo. Tiene gran importancia en la dieta debido a su alto contenido de proteína y la presencia de compuestos bioactivos, que han demostrado su potencial en el mantenimiento de la salud humana y la prevención de enfermedades (FAO, 2016). En México ocupa el tercer lugar en la producción de leguminosas y su cultivo se ha incrementado hasta un 10% anual con una producción de 36 mil 334 toneladas al año (Gaucín, 2016).

El consumo de proteínas vegetales tiene un creciente interés a nivel mundial debido a sus beneficios nutricionales, funcionales, sostenibles, ambientales y culturales. La haba es una importante fuente de proteína vegetal y se puede utilizar de muchas formas, ya sea mediante el consumo directo o como fracciones (harinas, concentrados y aislados proteicos) en alimentos preparados o procesados. El estudio de las proteínas de haba es de especial interés por su valor nutricional y funcional. La proteína extraída de la haba se puede utilizar dentro de un producto en polvo en diferentes productos alimenticios (Alpizar-Reyes *et al.*, 2018). Además, la hidrólisis de estas proteínas puede crear nuevas aplicaciones alimentarias al modificarse sus propiedades biológicas, nutricionales y funcionales. Los tratamientos proteolíticos rompen la secuencia primaria, produciendo aminoácidos y péptidos bioactivos que han reportado beneficios biológicos como actividades antioxidantes, antihipertensivas, antimicrobianas, anticancerígenas y actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La proteólisis también puede modificar las propiedades nutricionales ofreciendo la ventaja significativa de eliminar los compuestos antinutricionales y aumentar la digestibilidad de la fracción proteica y la bioaccesibilidad de Pb (Samaei *et al.*, 2020)

La haba es una fuente de proteína vegetal con importantes propiedades biológicas y actualmente esta desaprovechada. Se deben realizar otros esfuerzos para promover el uso de la fracción proteica de haba para productos de valor nutricional óptimo y aceptabilidad por parte del consumidor (Coda *et al.*, 2017). Una forma de aumentar el consumo de faba, es transformar la fracción de proteína en componentes alimentarios funcionales de alta calidad. Las actuales aplicaciones funcionales del aislado proteico de haba y su uso siguen siendo limitadas, en parte debido a la escasa comprensión de las relaciones estructura-función (Bühler *et al.*, 2020), por lo tanto, esta investigación busca determinar las propiedades químicas y nutricionales *in vitro* de la fracción proteica de haba (*Vicia faba*).

## II. Antecedentes

### 2. Leguminosas

Las leguminosas pertenecen a la familia *Leguminosae* o *Fabaceae*; sus semillas han jugado un papel importante en la mayoría de las culturas y civilizaciones. Su cultivo e incorporación a la dieta humana básica y su preparación como alimentos datan de 7000 a. C. Las leguminosas ocupan un lugar importante en la nutrición humana, especialmente en los hábitos alimenticios de bajos ingresos (Sánchez-Chino *et al.*, 2015).

Las leguminosas de mayor producción en todo el mundo (Tabla 1) son soja (*Glycine max*), siendo esta la más industrializada, frijol (*Phaseolus vulgaris*), chícharo (*Pisum sativum*), garbanzo (*Cicer arietinum*), lentejas (*Lentis esculenta*), y habas (*Vicia faba*) (Sánchez-Chino *et al.*, 2015).

**Tabla 1. Producción mundial de las principales leguminosas**

Producto	Toneladas
Soja	348,712,311
Frijoles	30,434,280
Chícharo	21,225,579
Garbanzos	17,192,188
Lentejas	6,333,352
Haba	4,923,090

Fuente: FAOSTAT, 2018.

Las leguminosas son un alimento con diversas propiedades nutricionales, presentando múltiples beneficios. Contienen un alto valor nutricional, concretamente son buena fuente de proteínas y carbohidratos (CHO). Una característica que distingue y convierte a las leguminosas en un grupo alimenticio especial es que sus CHO, aunque están presentes en proporciones significativas, se digieren lentamente, por lo que leguminosas pueden considerarse alimentos de bajo índice glucémico, ayudando a prevenir la resistencia a la insulina (Jenkins *et al.*, 2012).

Sus propiedades nutraceuticas en parte se deben a la presencia de compuestos bioactivos, como proteínas y péptidos. Se ha demostrado que algunos tipos específicos de proteínas como las lectinas (proteínas unidas a CHO) exhiben propiedades anticancerígenas *in vitro* (RAW264.7, HT-29 cáncer de colon humano) (Rao *et al.*, 2018; Prabhu & Rajeswari, 2018). Además, disminuyen la tasa de incidencia de las principales enfermedades que afectan la salud a nivel mundial, como afecciones del corazón, diversos tipos de cáncer y las algunas enfermedades neurodegenerativas (Hidalgo *et al.*, 2018).



## **2.1 Haba (*Vicia faba*)**

### **2.1.1 Antecedentes históricos**

El haba (*Vicia faba*), también conocida como frijol ancho, frijol de caballo o frijol de campo, es un cultivo antiguo. Se cree que fue domesticado en la Media Luna Fértil, región que corresponde a parte de los territorios de Levante mediterráneo, Mesopotamia y Persia, durante la era neolítica 9,000 - 10,000 años antes del presente (Ijaz *et al.*, 2018). El haba se ha asociado con la domesticación temprana de los cultivos según registros arqueológicos que datan de la Edad de Piedra, Bronce y Hierro en la Cuenca Mediterránea: en España, Italia, Francia, Suiza, Alemania y en el Cercano Oriente. El nombre de *faba* se originó en una de las formas del verbo griego φάγέω - “comer” – que resalta el uso como alimento y pienso por los antiguos griegos y romanos. Se han distinguido dos grupos: las formas de semillas pequeñas en el sudoeste de Asia, incluidas la India, Afganistán y las regiones adyacentes de Bukhara y Cachemira; y formas de semillas grandes en el oeste. El grupo oriental es muy antiguo y se remonta a la cultura neolítica; este grupo tiene el mayor número de formas endémicas y la mayor diversidad de características (Duc *et al.*, 2010).

### **2.1.2 Cultivo y cosecha**

Pertenece a la familia de las *Fabaceae*, es uno de los principales cultivos de leguminosas sembradas en invierno, y es muy capaz de sobrevivir en condiciones extremas de frío. Los mecanismos fisiológicos como la acumulación de prolina libre y la desaturación de ácidos grasos unidos a la membrana influyen a la tolerancia a las heladas de la planta (Singh *et al.*, 2013). Se puede utilizar durante todo el año, ya que se puede consumir tanto en forma cruda como procesada. En la dieta humana, se consume principalmente el grano de semilla, mientras que las vainas se usan como pienso, sin embargo, como las vainas también proporcionan fitoquímicos, tienen el potencial de ser utilizadas como fuente de compuestos funcionales. Su consumo es cotidiano en las dietas tradicionales del Mediterráneo, India, China, Inglaterra, Medio Oriente, África y Sudamérica, tiene una importancia considerable como alimento de bajo costo rico en proteínas y CHO (Tazart, Lamacchia, Zaidi, & Haros, 2016; Giménez *et al.*, 2013).

Las habas se cosechan en la etapa vegetativa cuando las vainas y las semillas son frescas y verdes, y se usan como vegetales. Alternativamente, se pueden cosechar en la etapa de madurez después de que las vainas y las habas se sequen. Se ha estudiado previamente

la composición de las habas; CHO, fibra, proteínas, vitaminas, minerales y factores antinutricionales no proteicos como saponinas, alcaloides del ácido fítico y taninos, y en contraste con los cereales, se encontró que el haba contiene altos niveles de lisina y arginina, que pueden complementar los bajos niveles de estos en los cereales (Multari, Stewart, & Russell, 2015; Kumar, Nidhi, Prasad, & Sinha, 2015).

### 2.1.3 Producción

El área de cultivo disminuyó en todo el mundo de 1962 a 1991, debido al costo del producto, la prevalencia de hongos patógenos y la ausencia de cultivos resistentes a enfermedades, sin embargo, desde entonces se ha estabilizado a 2.1 – 2.7 millones de hectáreas, al igual que otras leguminosas, el haba es una buena fuente renovable de nitrógeno (N) (Ijaz *et al.*, 2018). El haba se encuentra en los siete principales cultivos de leguminosas, crecen en verano y en invierno una vez por año, crece de forma erecta y tiene gran cantidad de hojas, se cultiva en 2.5 millones de hectáreas en todo el mundo (FAO, 2016). Su producción en el 2018 fue de 4.9 millones de toneladas en el mundo (Tabla 2), y en México fue de 37 mil toneladas (FAOSTAT, 2018).

**Tabla 2. Producción mundial de haba (*Vicia faba*)**

Continente	Toneladas	Porcentaje (%) del total
África	1,497,215	30
América	223,256	5
Asia	1,895,012	38
Europa	929,868	19
Oceanía	377,740	8
Mundial	4,923,091	100

Fuente: FAOSTAT, 2018.

### 2.1.4 Beneficios del haba al medio ambiente

El haba puede fijar N en el suelo más que otras especies de leguminosas bajo las mismas condiciones y se utiliza como interruptor de cultivos en la siembra intensiva dominados por cereales. Esta fijación sucede debido a la simbiosis con la bacteria *Rhizobium*, lo que reduce la dependencia de fertilizantes nitrogenados. Por lo tanto, se recomienda en las prácticas de manejo agrícola de rotación de cultivos con la siembra de haba y otros cultivos. Además, el haba podría ayudar a la industria a cambiar hacia una materia prima más sostenible. De hecho, la producción intensiva de cultivos forrajeros es una de las principales causas de la degradación del suelo y los cultivos como el haba, que tienen la capacidad de

fijar N, pueden ofrecer una estrategia efectiva para abordar los daños ambientales de las prácticas de monocultivo (Chapagain & Riseman, 2015).

### 2.1.5 Composición nutricional

El haba contiene un alto valor nutricional (Tabla 3) debido a su alto contenido de proteínas (25 – 30%) y sus CHO complejos (30 – 40%) (Rahman *et al.*, 2019). También tiene potencial terapéutico, ya que proporciona L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), el precursor del neurotransmisor catecolamina y un medicamento utilizado en la enfermedad de Parkinson (Turco *et al.*, 2016).

**Tabla 3. Composición nutricional del haba (*Vicia faba*) seca y cruda por 100g**

Nutriente	Contenido (g/100 g)
Energía	341.00 kcal
Agua	10.98
Proteína	26.12
Lípidos	1.53
Carbohidratos	58.29
Fibra total	25.00
Cenizas	3.08

Fuente: U.S.D.A., 2019.

Las habas, sus fracciones y sus productos de procesamiento (granos, cáscaras y harinas) contienen diversos factores antinutricionales como saponinas, inhibidores de proteasas,  $\alpha$ -galactósidos y ácido fítico. Sin embargo, incluso procesos domésticos simples como remojo y cocción son capaces de reducir sus cantidades hasta un 100%, lo que evita las consecuencias perjudiciales (M. *et al.*, 2019).

### 2.1.6 Características de la fracción proteica del haba

La alimentación a base de plantas generalmente se consideran una fuente inferior de proteínas en comparación con la carne, sin embargo, el haba siempre ha sido apreciada por su alto contenido general de proteínas (Tabla 4) y su valor nutricional adicional. Como la mayoría de las leguminosas, las proteínas del haba están formadas por dos fracciones principales, las albúminas y las globulinas. Las primeras son proporcionalmente ricas en AA azufrados y lisina y las globulinas son ricas en legumina, convicilina y vicilina. Las albúminas pueden actuar como enzimas presentes en la semilla, que se utilizan en el proceso de germinación, esta fracción es más rica en metionina (Met) y cisteína (Cys) que, en globulina, al menos en chícharos y habas (Lüscher *et al.*, 2014).

**Tabla 4. Perfil proteico del haba (*Vicia faba*) seca**

<b>Tipo de proteína</b>	<b>Contenido en porcentaje (%)</b>
Globulina	73.6%
Albúmina	2.17%
Prolamina	3.53%
G <sub>1</sub> -gluteína	1.57%
G <sub>2</sub> -gluteína	4.61%
G <sub>3</sub> -gluteína	11.52%
Proteína insoluble	1.93%

Fuente: El Fiel *et al.*, 2002

Las principales proteínas de almacenamiento en las semillas de habas son las globulinas, que se encuentran en orgánulos unidos a la membrana, llamados cuerpos proteicos, mientras que sobreviven a la desecación durante la maduración y se someten a hidrólisis en la germinación, proporcionan esqueletos de amoníaco y carbono a las plántulas en desarrollo. Se estima que las proteínas de la semilla de haba contienen ~80% de globulina, que a su vez se compone de legumina y vicilina/convicilina, también denominadas 11S y 7S, respectivamente, en función de sus coeficientes de sedimentación por ultracentrifugación (Multari *et al.*, 2015).

Las globulinas 11S de la semilla de haba (leguminas) son proteínas hexaméricas con un peso molecular de aproximadamente 340 kDa, mientras que las globulinas 7S (vicilina/convicilina) son proteínas triméricas de aproximadamente 158 kDa. Las globulinas pertenecen a la superfamilia Cupin, y los tipos legumina y vicilina tienen un alto grado de homología estructural. Las globulinas generalmente son ricas en ácidos aspártico y glutámico, leucina y arginina, aunque pueden tener cierta variabilidad en la secuencia de aminoácidos y la estructura general. La legumina es una de las principales proteínas de la semilla de haba, que representa aproximadamente el 50% de las proteínas de almacenamiento. Está codificada por múltiples genes que pertenecen a las subunidades de tipo A (que contienen metionina) y de tipo B (que carecen de metionina) (El Fiel *et al.*, 2002). La vicilina es una proteína heterogénea en su forma nativa de trímero. Con respecto a las subunidades de convicilina, se han descrito al menos dos genes estructurales, aunque la cuestión de si la convicilina puede considerarse una subunidad de vicilina o una clase distinta de globulina aún no se ha resuelto. En las habas, se acepta generalmente que la selección de una proporción más alta de legumina:vicilina podría mejorar su calidad nutricional, ya que algunas subunidades importantes de leguminosas contienen proporciones relativamente más altas de aminoácidos que contienen azufre en comparación con la vicilina (Warsame *et al.*, 2020).

La vicilina se forma durante el desarrollo de la semilla antes que la legumina, sin embargo, la legumina se sintetiza a un ritmo más rápido que la vicilina y predomina en la semilla madura. De hecho, desde el punto de vista cuantitativo, la legumina es más abundante que la vicilina, y comprende alrededor del 40% al 45% de la fracción proteica total, mientras que la vicilina comprende alrededor del 20% al 25%. Ambas fracciones de proteínas tienen una composición de aminoácidos similar (Multari *et al.*, 2015).

En comparación con los cereales, las semillas de haba secas tienen un alto contenido de lisina (19.8 g / kg de materia seca) y un bajo contenido de Met, Cys y triptófano (Trp) (2.6, 3.7 y 2.7 g / kg de materia seca), en la Tabla 5 se muestra el contenido de AA del haba. En la dieta humana, la combinación de habas con otros alimentos como cereales, son fuentes proteicas permiten cumplir con los requisitos de proteína del organismo (Vioque *et al.*, 2012). Desde el punto de vista nutricional, las proteínas de las leguminosas son especialmente ricas en lisina, leucina, ácido aspártico, ácido glutámico y arginina, pero son deficientes en los AA que contienen azufre (Rosa-Sibakov *et al.*, 2018).

**Tabla 5. Contenido de aminoácidos en 100 g de haba (*Vicia faba*) madura y cruda**

Nombre	Cantidad (g)
Triptófano	0.247
Treonina	0.928
Isoleucina	1.053
Leucina	1.964
Lisina	1.671
Metionina	0.213
Cisteína	0.334
Fenilalanina	1.103
Tirosina	0.827
Valina	1.161
Arginina	2.411
Histidina	0.664
Alanina	1.070
Aspartato	2.916
Glutamato	4.437
Glicina	1.095
Prolina	1.099
Serina	1.195

Fuente: U.S.D.A., 2019

## **2.2 Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos de haba**

Un concentrado proteico se define como un producto proteico comestible con un contenido de proteínas de al menos un 65% en peso seco, mientras que un aislado proteico es un producto con al menos un 90% de proteína en peso seco (Wang *et al.*, 2004). Los aislados y concentrados proteicos de leguminosas han ganado importancia en la industria alimentaria debido a su notable valor nutricional, además, representan una alternativa en la preparación y desarrollo de nuevos alimentos. El uso exitoso de los concentrados y aislados de proteínas de leguminosas depende de la versatilidad de sus propiedades funcionales, las cuales están influenciadas por factores intrínsecos (composición y conformación de proteínas constituyentes), factores ambientales y métodos y condiciones de aislamiento (Ndez-Quintela *et al.*, 1997).

Se han utilizado varios métodos para producir ingredientes ricos en proteínas a partir de leguminosas. Los aislados de proteínas se pueden producir utilizando métodos de extracción acuosa; estos incluyen extracción alcalina, neutra o ácida, seguida de precipitación isoeléctrica o ultrafiltración, así como extracción de sal seguida de micelización. Otra opción para producir ingredientes proteicos es el fraccionamiento en seco, en el que las legumbres secas se muelen y las partículas se clasifican al aire según el tamaño y la densidad en fracciones ricas en proteínas y ricas en almidón (Vogelsang-O'Dwyer *et al.*, 2020).

Para una eficiente extracción acuosa se debe tomar en cuenta la solubilidad proteica. La extracción acuosa, seguida de la precipitación con el punto isoeléctrico a pH controlado es poco desnaturizante para las proteínas, lo cual permite mantener las propiedades funcionales del producto. Las proteínas de la semilla de haba se clasifican en albúminas, globulinas, glutelinas y prolaminas según su solubilidad. Las albúminas son solubles en agua, las globulinas en soluciones salinas diluidas, las glutelinas en soluciones ácidas y alcalinas diluidas, mientras que las prolaminas son solubles en etanol acuoso. (Ohanenye *et al.*, 2020).

La solubilidad de las proteínas es un factor crítico para la aplicabilidad de ciertos ingredientes proteicos en matrices alimentarias funcionales. El punto isoeléctrico puede afectar la solubilidad de una proteína. El punto isoeléctrico es el valor de pH de una molécula en particular, en la cual no tiene carga eléctrica. Las proteínas tienen una solubilidad mínima en agua o en soluciones de sales al pH que corresponde a su punto

isoeléctrico, lo que provoca su precipitación en la solución, facilitando su recuperación y extracción (Kukić *et al.*, 2015).

En el haba, está bien establecido por diversos estudios que el punto de precipitación isoeléctrico de la fracción proteica es cercano al pH 4 (Hernández-García *et al.*, 2016; Vioque *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2018). La precipitación isoeléctrica de la mayoría de las proteínas a pH 4, favorece las interacciones proteína-proteína debido a una repulsión molecular insignificante. Puede surgir la formación y posterior precipitación de agregados de gran peso molecular, reduciendo así la solubilidad de las proteínas. El punto isoeléctrico puede variar debido a la conformación proteica. La legumina (globulina 11S) es una holoproteína hexamérica, mientras que la vicilina (globulina 7S) existe como trímeros, ambos compuestos por subunidades polimórficas codificadas por familias multigénicas. La legumina y la vicilina se pueden separar con puntos isoeléctricos a pH 4.8 y 5.5, respectivamente, mediante precipitación isoeléctrica. En las habas maduras, la legumina representa el 55% de la proteína total de la semilla (Sharan *et al.*, 2021).

Los concentrados y aislados proteicos de haba son posibles agentes espumantes, emulsionantes y gelificantes que se pueden usar para producir alternativas lácteas y cárnicas. Las proteínas de haba tienen propiedades funcionales superiores en comparación con las proteínas animales, e incluso en comparación con otras fuentes de legumbres. Estas propiedades funcionales de los concentrados y aislados proteicos de haba dependen de la variedad de semilla, la conformación estructural de la proteína, interacciones con otras macromoléculas y procesamiento (Felix *et al.*, 2019).

### **2.3 Importancia nutricional de la proteína vegetal**

Existe un importante incremento en la demanda de proteína de origen animal, esto debido al crecimiento de la población y un mayor nivel de vida en los países en desarrollo, que se prevé se duplicará para 2050. La producción de proteína animal está asociada con intensas emisiones de gases de efecto invernadero y una mayor demanda de superficie terrestre, a diferencia de la producción de proteína vegetal (United Nations, 2015). Por lo tanto, ahora se exploran fuentes alternativas de proteínas que muestran un valor nutricional similar al de las proteínas de origen animal. De esta manera, las proteínas vegetales, especialmente en las proteínas de las leguminosas, son consideradas opciones viables para sustituir las proteínas de origen animal (Alves & Tavares, 2019).

La diversificación de las fuentes de proteínas en la ingesta alimentaria, en particular el aumento del consumo de proteínas vegetales, podría reducir los riesgos para la salud y el medio ambiente asociados con la producción y el consumo excesivo de proteínas animales (Berrazaga *et al.*, 2020). Además, se ha demostrado que varias proteínas y péptidos de semillas de leguminosas ahora pueden incluirse en la categoría de nutracéuticos o componentes funcionales. La palabra nutracéutico, que es el resultado de la combinación de "nutrición" y "farmacéutico", se refiere a un alimento, o partes de un alimento, que proporciona beneficios médicos o para la salud, incluida la prevención de enfermedades. Este término, acuñado en 1989 en Estados Unidos de América por Stephen De Felice, se ha aplicado a varias vitaminas, lípidos, polifenoles, minerales, fracciones de fibra y, recientemente a péptidos y proteínas (Carbonaro *et al.*, 2015).

El haba se está convirtiendo en una buena alternativa a las proteínas de origen animal debido a su alta calidad nutritiva y funcionalidades tecnológicas incluyendo solubilidad y propiedades emulsionantes. Se ha estudiado el papel del haba como fuente de proteínas en la dieta humana y se ha demostrado que su componente proteico presenta actividad antifúngica, anticancerígena, hipocolesterolemica, antioxidante, entre otras. La mayoría de estas propiedades se atribuyen a proteínas y péptidos biológicamente activos (Karkouch *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2019).

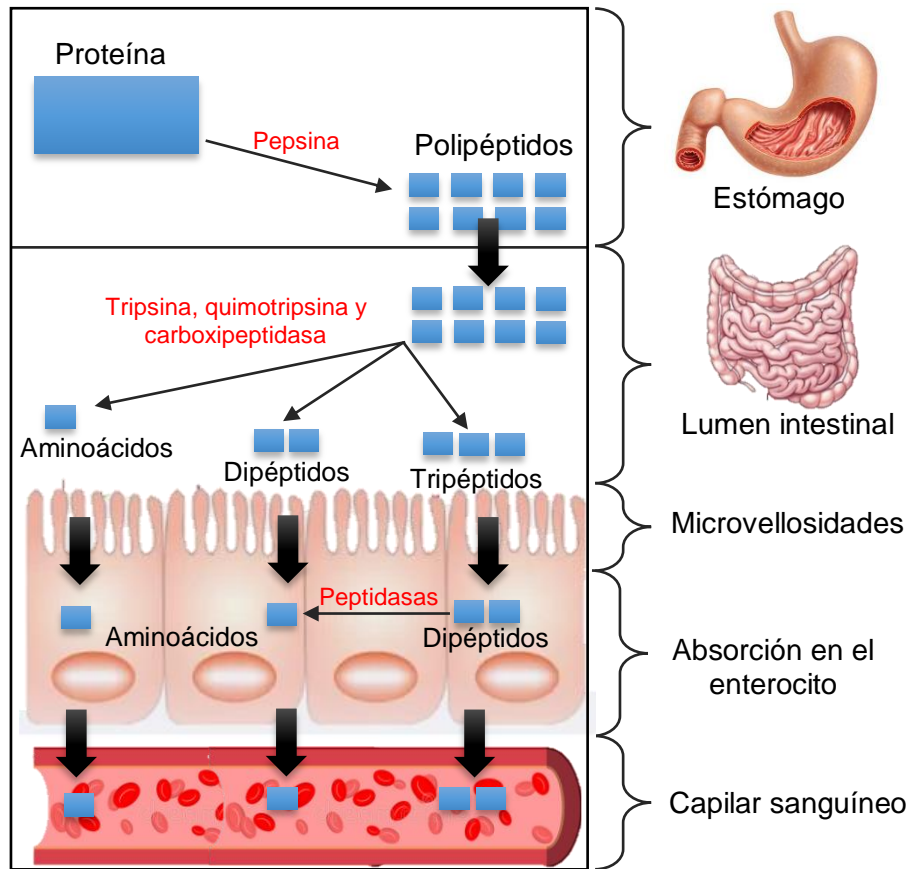
## **2.4 Digestión gastrointestinal de las proteínas**

El concepto general de digestibilidad de las proteínas es relativamente simple. Se define como la relación expresada en porcentaje de la diferencia entre el N ingerido y excretado entre N ingerido. Sin embargo, la medición *in vivo* es realmente compleja. Por esa razón, se han sugerido varios criterios resultantes de enfoques *in vitro* para aproximar la digestibilidad y bioaccesibilidad de proteínas que pueden ser adecuados para predecir la utilización de proteínas y AA por parte del cuerpo humano (Le Roux *et al.*, 2020).

La digestión proteica implica dos procesos principales que ocurren simultáneamente, primero la transformación mecánica, mediante la cual los trozos más grandes de alimentos se descomponen en trozos más pequeños, comienza en la boca y continúan hasta el estómago. Enseguida la transformación enzimática, la cual en proteínas comienza en el estómago y continúa hacia los intestinos, mediante diferentes enzimas que convierten macromoléculas en moléculas más pequeñas que se pueden absorber en el torrente sanguíneo. La digestión eficiente de la proteína en el estómago y el intestino delgado es



beneficiosa para evitar la fermentación proteica del colon, que provoca productos potencialmente tóxicos (Alminger *et al.*, 2014).

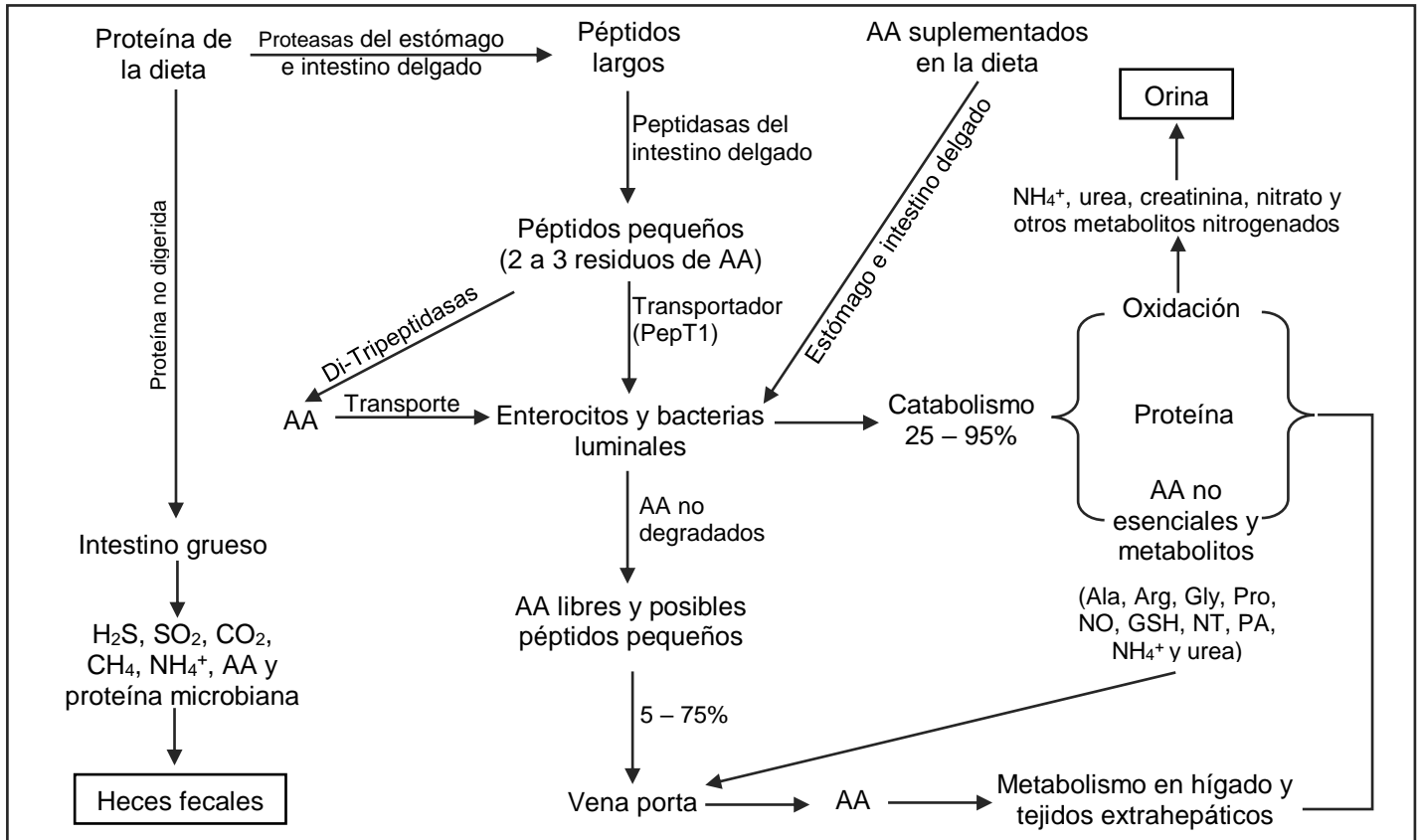


**Figura 1.** Digestión de las proteínas alimentarias. Se lleva a cabo en el estómago, el lumen y en los enterocitos del intestino delgado. La absorción de los péptidos pequeños y aminoácidos desde el lumen hasta los enterocitos requiere de transportadores específicos. La mayoría de los aminoácidos son transportados por transportadores de sodio dependientes (absorción activa). Cualquier residuo de péptidos pequeños son degradados a aminoácidos dentro del enterocito (célula de absorción). Los aminoácidos son transportados al torrente sanguíneo. Modificado de Wardlaw *et al.*, 2016.

En algunos alimentos el primer paso de la desnaturalización proteica se lleva a cabo durante su cocción, ya que no existe digestión enzimática en la boca solo mecánica. En el estómago, las proteínas comienzan a desnaturalizarse con el ácido clorhídrico, así mismo, este activa al pepsinógeno convirtiéndolo en pepsina. La pepsina es una endopeptidasa que divide las proteínas en peptonas, proteosomas, polipéptidos grandes a través de reacciones de hidrólisis (Figura 1) sobre los enlaces en los que intervienen el grupo amino de la fenilalanina, Trp, tirosina y el grupo carboxilo del ácido glutámico, pero no los ésteres de AA ni las amidas (Wilkinson & Ahern, 2009). El quimo resultante de la digestión gástrica entra en contacto con la mucosa intestinal permitiendo la acción de la enteroquinasa unida al borde en cepillo, una enzima que transforma el tripsinógeno pancreático inactivo en tripsina activa, la principal enzima digestiva pancreática de proteínas. La tripsina, a su vez,

activa otras enzimas proteolíticas pancreáticas, la quimotripsina y carboxipeptidasa, contribuyendo a descomponer la proteína intacta y continuar la descomposición iniciada en el estómago hasta formar oligopéptidos y AA (Mahan & Raymond, 2017).

Las peptidasas proteolíticas ubicadas en el borde en cepillo también actúan sobre los polipéptidos, descomponiéndolos en tripéptidos, dipéptidos y AA. La fase final de la digestión de proteínas tiene lugar en el borde en cepillo, donde algunos de los dipéptidos y



**Figura 2.** Metabolismo de proteínas alimentarias. Todos los AA derivados de la dieta sufren varios grados de catabolismo por las bacterias luminales y algunos de ellos son oxidados por los enterocitos. Los metabolitos de los AA se excretan en heces y orina. AA = aminoácidos; GSH = glutatión; NT = nucleótidos; PepT1 = transportador 1 de péptidos impulsado por

tripéptidos son hidrolizados en sus AA constituyentes por las hidrolasas peptídicas. La mayor parte de la digestión de proteínas tiene lugar en la parte superior del intestino delgado, pero continúa a lo largo del tracto gastrointestinal. Cualquier fracción de proteína residual es fermentada por microbios colónicos (Wardlaw *et al.*, 2016).

Los productos finales de la digestión de proteínas se absorben como AA y péptidos pequeños (Figura 2). Se requieren varias moléculas de transporte para los diferentes AA, debido a las grandes diferencias en el tamaño, polaridad y configuración de los diferentes

AA. Luego, los AA viajan a través de la vena porta hasta el hígado para su uso en la síntesis de proteínas, las necesidades energéticas, la conversión en CHO o lípidos, o se liberan en el torrente sanguíneo para su transporte a otras células (Mahan & Raymond, 2017).

Las células tienen mecanismos especiales que degradan las proteínas y los péptidos en AA para su posterior uso en la síntesis de proteínas de *novo*. En el núcleo y el citosol celular, este proceso se lleva a cabo principalmente por el sistema ubiquitina-proteosoma, seguido de aminopeptidasas y oligopeptidasas. La mayoría de los productos proteosómicos de una célula se descomponen rápidamente en AA libres (Ciechanover, 2017). Hay algunas excepciones, como los péptidos procesados con proteasoma que escapan a una mayor degradación que se presenta en la superficie celular como antígenos de histocompatibilidad de clase I (CMH-I). Cientos de péptidos antigénicos no CMH-I son estables dentro de las células, estos son los péptidos intracelulares (Sha *et al.*, 2018).

Los péptidos intracelulares, son funcionales y están formados por la actividad del proteasoma durante la degradación regular de las proteínas intracelulares. Los péptidos intracelulares tienden a tener una vida media más larga que la mayoría de los péptidos procesados con proteasoma no antigénico. Se ha visto que un pequeño grupo de péptidos intracelulares se produce a partir de marcos de lectura cortos y abiertos y de ribosomas defectuosos. Las proteínas precursoras de péptidos intracelulares tienen ubicaciones subcelulares importantes en el núcleo, el citosol o las mitocondrias (Teixeira *et al.*, 2019).

La fisiología de la digestión es altamente compleja y requiere el conocimiento de los cambios fisicoquímicos que ocurren en los alimentos. En particular el proceso de la digestión y los diversos factores que influyen en la digestibilidad, definida como la fracción soluble e insoluble de componentes de los alimentos que se transforma en materia potencialmente accesible y útiles para la nutrición, comprendiendo los procesos físicos y químicos que tienen lugar en la luz intestinal; la bioaccesibilidad de los nutrientes, que es la cantidad de un compuesto que se libera de la matriz alimentaria y se solubiliza en la fase acuosa (quimo) y queda disponible para su absorción en la circulación a través de la pared intestinal, y finalmente la biodisponibilidad que es la cantidad total de un compuesto que se libera y absorbe, para llegar al torrente sanguíneo, donde se entrega a los diferentes tejidos del cuerpo (Bornhorst *et al.*, 2016; Sengul *et al.*, 2014).

### 2.4.1 Digestión *in vitro* y bioaccesibilidad de las proteínas

Para evaluar cuestiones relacionadas con la dieta y la nutrición como la disponibilidad de nutrientes y compuestos bioactivos de los alimentos, los estudios de biodisponibilidad *in vivo* son considerados el "estándar de oro". Sin embargo, dado que los estudios *in vivo* son costosos, requieren mucho tiempo y tienen importantes consideraciones éticas, los estudios de bioaccesibilidad *in vitro* se utilizan ampliamente para explorar y predecir la biodisponibilidad de nutrientes y compuestos bioactivos de importancia para la nutrición humana (F. Liu *et al.*, 2021).

Los métodos para evaluar la bioaccesibilidad *in vitro* simulan los procesos fisiológicos de la digestión humana para estudiar el comportamiento gastrointestinal de alimentos. Los métodos *in vitro* tienen la ventaja de ser más rápidos, menos costosos, menos laboriosos, permiten medir un número relativamente grande de muestras y presentan menos restricciones éticas. La reproducibilidad, la elección de condiciones controladas y la facilidad de muestreo en el sitio de interés hacen que los modelos *in vitro* sean muy adecuados para estudios exploratorios de investigación (Minekus *et al.*, 2014).

La digestión *in vitro* simulada incluye típicamente las fases oral, gástrica, intestinal, y ocasionalmente la fermentación del intestino grueso. Estos métodos intentan imitar condiciones fisiológicas *in vivo*, teniendo en cuenta la presencia de enzimas digestivas y sus concentraciones, pH, tiempo de digestión y concentraciones de sales, entre otros factores. Estos modelos estáticos de digestión humana se han utilizado para abordar cuestiones científicas tan diversas como la digestibilidad y la bioaccesibilidad de macronutrientes como proteínas, CHO, lípidos y compuestos bioactivos. También se han utilizado para estudiar la liberación de micronutrientes como minerales y oligoelementos, y compuestos vegetales como polifenoles para predecir su bioaccesibilidad, ya que esta depende de la matriz alimentaria, las uniones que presenten sus macromoléculas y de las condiciones individuales fisiológicas de las personas (Perales-Vázquez *et al.*, 2020; Ménard *et al.*, 2014).

Para evaluar la bioaccesibilidad, una técnica de digestión *in vitro* eficiente debería proporcionar resultados precisos en poco tiempo y en consecuencia podría ayudar como herramienta para el análisis rápido de alimentos o modelos de alimentos con diferentes composiciones y estructuras. Sin embargo, hasta ahora no se ha llegado a imitar completamente el proceso *in vivo*, básicamente por la complejidad evidente del proceso de

digestión humana, por lo que los estudios *in vitro* son herramientas para escalar y comprender conocimiento científico (Lucas-González *et al.*, 2018).

## **2.5 Péptidos bioactivos de proteínas vegetales**

En los últimos años, se han evaluado varios ingredientes funcionales, como los aislados proteicos vegetales, en una amplia gama de áreas de la salud. Se sabe que los aislados proteicos vegetales contienen componentes activos clave, los péptidos bioactivos (Pb), los cuales ejercen efectos funcionales más allá de la nutrición y presentan una excelente oportunidad para la prevención y el tratamiento de trastornos crónicos. Para que los componentes clave de los ingredientes funcionales modulen las vías fisiológicas, deben sobrevivir al tránsito intestinal y, dependiendo de su objetivo, es posible que deban ser absorbidos a través de la barrera intestinal (Corrochano *et al.*, 2021).

Los Pb son secuencias cortas de aproximadamente 2–20 AA, y son importantes debido a su acción sobre la regulación de funciones fisiológicas en el organismo. En la actualidad, existe poca información sobre sus mecanismos de acción. Durante los últimos años, el número de investigaciones en diferentes modelos de estudio, junto con el desarrollo de nuevas herramientas bioinformáticas ha aumentado. Es necesario comprender los mecanismos regulados por los Pb derivados de los alimentos, para comprender el papel funcional que pueden asumir y esto representa un área potencialmente prometedora para futuras investigaciones (Martínez-Sánchez *et al.*, 2020).

Las proteínas del haba son una fuente importante de energía y AA esenciales para el crecimiento normal, el mantenimiento de la vida y la reproducción. Además de su valor nutricional, su digestión parcial por proteasas puede producir secuencias peptídicas con propiedades biológicas específicas, que actúan como moduladores fisiológicos tanto localmente en el intestino como sistémicamente (Kamran & Reddy, 2018). El descubrimiento de Pb derivados de alimentos, abrió una perspectiva completamente nueva sobre la nutrición y el papel de las proteínas y los hidrolizados de proteínas en el metabolismo y la salud. Estos péptidos biológicamente activos se han identificado de fuentes vegetales como el trigo, el maíz, las leguminosas y el arroz (Mohammadi-Sartang *et al.*, 2018).

Los Pb están principalmente encriptados e inactivos dentro de la proteína alimentaria y se activan una vez que se liberan de su proteína precursora. En el organismo, los péptidos encriptados pueden liberarse durante la digestión gastrointestinal por enzimas como la

tripsina o por enzimas microbianas. En estudios *In vitro* se ha visto que los Pb pueden liberarse durante el procesamiento de alimentos o la maduración mediante enzimas microbianas. Estos péptidos, para ser transportados intactos al sitio u órgano diana, deben escapar de la degradación durante la digestión. Se han descrito diferentes sistemas de transporte para la absorción intestinal de péptidos. Los péptidos más pequeños son transportados por un transportador de péptidos específico (Chauhan & Kanwar, 2020; Gewehr *et al.*, 2020).

### 2.5.1 Péptidos bioactivos y la importancia de sus efectos biológicos

Debido a la complejidad y diversos procesos que sufren las proteínas, surgen estructuras muy diversificadas de Pb, además, esto aporta las múltiples funciones (Tabla 6) derivadas de los alimentos, incluyendo un importante potencial anti-adipogénico, ya que se ha visto que tienen la capacidad de modular varios trastornos metabólicos asociados con la obesidad, como la resistencia a la insulina, la inflamación, el estrés oxidativo y las dislipidemias (Chatterjee *et al.*, 2018).

**Tabla 6. Efectos biológicos de diferentes péptidos contenidos en las leguminosas**

Muestra	Efecto	Tipo de estudio	Péptido/Proteína identificada	Referencia
Haba	Hipocolesterolémico	<i>In vivo</i> (ratas)	Aislado de proteína	Macarulla <i>et al.</i> , 2001
	Antifúngico	<i>In vivo</i> (ratones)	Péptido (13-kDa)	Ye & Ng, 2002
	Inhibitorio y anti proliferativo en cáncer	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i> (ratones)	VFTI-G1 (15-kDa)	Fei Fang <i>et al.</i> , 2011
	Anticancerígeno e hipocolesterolémico	<i>In vivo</i> (ratones)	Proteína hidrolizada	León-Espinosa <i>et al.</i> , 2016
	Antioxidante	<i>in vitro</i>	VESEAGLTETWNPNHPELR LSPGDVLVIPAGYPVAIK	Karkouch <i>et al.</i> , 2017
Soya	Antihipertensivo	<i>In vitro</i>	Val-Leu-Ile.Val-Pro	Mallikarjun Gouda <i>et al.</i> , 2006
Soya fermentada	Antihipertensivo	<i>In vitro</i>	Leu-Val-Gln-Gly-Ser	Rho, <i>et al.</i> , 2009
Garbanzo	Antihipertensivo	<i>In vitro</i>	Met-Asp-Phe-Leu-Ile	Girón-Calle <i>et al.</i> , 2008
Frijol pinto	Antiinflamatorio	<i>in vitro</i>	Phe-Val-Pro-His	García-Mora <i>et al.</i> , 2015
Frijol	↑ Lipólisis ↓ Diferenciación	<i>in vitro</i>	Proteína hidrolizada	Castillo, González, & Moore-Carrasco, 2019
Chícharo	Antihipertensivo	<i>In vitro</i>	Lys-Pro-Ser-Tyr	Vermeirssen <i>et al.</i> , 2005

Fuente: Modificado de García, Puchalska, Esteve, & Marina, 2013.

González-Espinosa de los Monteros *et al.*, (2011), evaluó el efecto anti-adipogénico y lipolítico de la proteína hidrolizada del germinado de soya. En el modelo *in vitro* de células fibroblásticas murinas 3T3-L1, la proteína hidrolizada del germinado de soya mostró un efecto inhibitorio de la acumulación lipídica y un incremento en la lipólisis en los adipocitos. La posible explicación es que la germinación produce cambios en la fracción proteica, generando péptidos pequeños de bajo peso molecular (BPM) (< 1kDa), lo que incrementa la diversidad de péptidos y la posibilidad de sus efectos benéficos, además, los cambios que genera la germinación en las semillas aumentaron el efecto de sus componentes sobre la regulación del receptor activado por proliferadores peroxisómicos gamma (PPAR $\gamma$ ) y la diferenciación celular. Esta investigación reportó que los hidrolizados de la soya germinada favorecieron la oxidación de triglicéridos dentro de las células adiposas cultivadas, lo que sugiere que la proteína hidrolizada del germinado de soya puede ayudar a disminuir la acumulación de grasa corporal.

En un ensayo de Oseguera Toledo (2016) se demostró que los péptidos hidrolizados (<1 kDa) de frijol pinto, tienen la capacidad de aumentar la secreción de insulina en células  $\beta$  pancreáticas resistentes a la insulina (modelo *in vitro* INS-1E de rata), y redujeron significativamente las especies reactivas de oxígeno hasta un 70%. Además, este estudio probó los mismos péptidos sobre la línea celular 3T3-L1 y se vio una inhibición en la acumulación de lípidos, y se mejoró la captación de glucosa hasta en un 67% a través de la modulación de proteína quinasa B, en los adipocitos resistentes a la insulina, mejorando la señalización de la insulina y reduciendo la activación del homólogo de fosfatasa y tensina

El efecto de los péptidos hidrolizados de frijol pinto en el aumento de la captación de glucosa, puede deberse a la despolarización directa de la membrana y, posteriormente, a la liberación de insulina debido a su contenido de AA, o debido a que actúan como miméticos de péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), o la expresión inducida de los receptores que estimulan la liberación de insulina dependiente de glucosa. En cuanto a la inflamación, se vio una reducción de la expresión de citocinas como IL-1 $\beta$  y FNT- $\alpha$ . Se ha sugerido que las células  $\beta$  *in vitro* expuestas a altas concentraciones de glucosa producen IL-1 $\beta$  y activan NF- $\kappa$ B, lo que junto con otras adipocinas conduce a la pérdida de masa de células  $\beta$  debido a la apoptosis, por lo tanto, la modulación de esta vía es importante para el metabolismo de la glucosa (Oseguera Toledo *et al.*, 2016).

Otros péptidos como lunasin, de la soya, se han investigado y mostrado resultados prometedores. En un estudio realizado por Hsieh (2017), con el objetivo de explorar si el

péptido lunasin podría reducir la inflamación inducida por mediadores relacionados con la obesidad en los adipocitos 3T3-L1, se observó que en las células 3T3-L1 la secreción de citocina proinflamatoria interleucina1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) fue inhibida por el péptido lunasin. El péptido lunasin también mostró propiedades antiinflamatorias al inhibir proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), el inhibidor del activador de plasminógeno-1 y las producciones de leptina estimuladas por medio FNT- $\alpha$ . Estos resultados revelaron que el péptido lunasin actúa como un posible agente antiinflamatorio no solo en los macrófagos sino también en los adipocitos, mejorando la señalización entre estas dos células. Los investigadores sugieren que la ingesta del péptido lunasin proveniente de la dieta o como suplemento, podría ayudar en la prevención o como terapia auxiliar en el estado inflamatorio relacionado con la obesidad (Hsieh *et al.*, 2017).

En cuanto al haba, León-Espinosa *et al.*, (2016) reportaron que los péptidos del aislado proteico obtenidos a partir de hidrólisis enzimática, mostraron un efecto protector contra la inflamación causada por alteraciones en biomarcadores de obesidad, así mismo, potencial para prevenir la carcinogénesis del colon en un ensayo de 5 semanas con ratones machos, en donde se les administró una dieta hipercolesterolémica con diferentes dosis del hidrolizado de aislado de proteína de haba. Estos efectos hipolipidémicos son atribuidos a los AA como isoleucina, tirosina, fenilalanina, prolina, leucina, valina, lisina y Met, ya que se ha visto tienen la posibilidad de modular el estado hipercolesterolémico debido a su acción en el metabolismo hepático de las lipoproteínas. Esta actividad probablemente esté relacionada con un equilibrio adecuado entre los AA hidrofóbicos e hidrofílicos.

El aislado proteico de haba sometido a hidrólisis enzimática ha mostrado una importante capacidad antioxidante *in vitro* con potencial de utilizarse como fuente de Pb naturales para aplicaciones cosméticas y farmacéuticas. Un estudio realizado por Karkouch *et al.*, (2017) demostró una potente capacidad antioxidante de los péptidos liberados del hidrolizado de aislado proteico de haba, debido a la actividad quelante ferrosa evitando así la reacción en cadena de los radicales además de la capacidad de inhibir la enzima tirosinasa.

Por lo anterior, en los últimos años hay un creciente interés en encontrar fuentes naturales de péptidos bioactivos en los alimentos vegetales, especialmente en las leguminosas. Las habas son una fuente importante de proteína en la alimentación, y tienen un papel fundamental en las dietas tradicionales en muchas regiones del mundo. Además, poseen propiedades biológicas que las hacen ser considerados como potenciales alimentos funcionales. Algunas de estas propiedades son atribuidas a proteínas y péptidos



biológicamente activos (Liu *et al.*, 2019). La fracción proteica puede verse afectada de manera positiva mediante diversos tratamientos, como hidrólisis enzimática y métodos térmicos. Estos tratamientos, incrementan la desnaturalización proteica y la síntesis de nuevas proteínas estructurales, así mismo, favorecen su digestibilidad dando lugar a que ocurra una extensa liberación de proteínas y péptidos bioactivos almacenados en la semilla, promoviendo una mayor bioaccesibilidad.

A pesar esto, hay poca información de los aislados proteicos de haba, debido a que se han investigado poco hasta ahora. Debido a ello, el presente estudio propone la evaluación de la composición proximal, digestibilidad y bioaccesibilidad de la fracción proteica de haba (*Vicia faba*) a través de técnicas *in vitro*, ya que evaluar estos parámetros es crucial para determinar su calidad nutricional y su potencial funcional.

### III Hipótesis

El presente trabajo de investigación no aplica la formulación de hipótesis, debido a que es un estudio con alcance exploratorio y descriptivo. Consiste en un estudio con la finalidad de examinar las características bromatológicas, digestibilidad y bioaccesibilidad de la semilla de haba (*Vicia faba*) a partir de un aislado proteico sin polifenoles y un aislado proteico con polifenoles.

### IV. Objetivos

#### 4.1 Objetivo general

Evaluar la calidad nutricional de la fracción proteica de haba (*Vicia faba*) mediante técnicas *in vitro*.

#### 4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar composición proximal de la fracción proteica de haba (*Vicia faba*).
2. Cuantificar la digestibilidad y bioaccesibilidad *in vitro* de la fracción proteica de haba (*Vicia faba*).
3. Determinar los parámetros nutricionales *in vitro* de la fracción proteica de haba (*Vicia faba*).

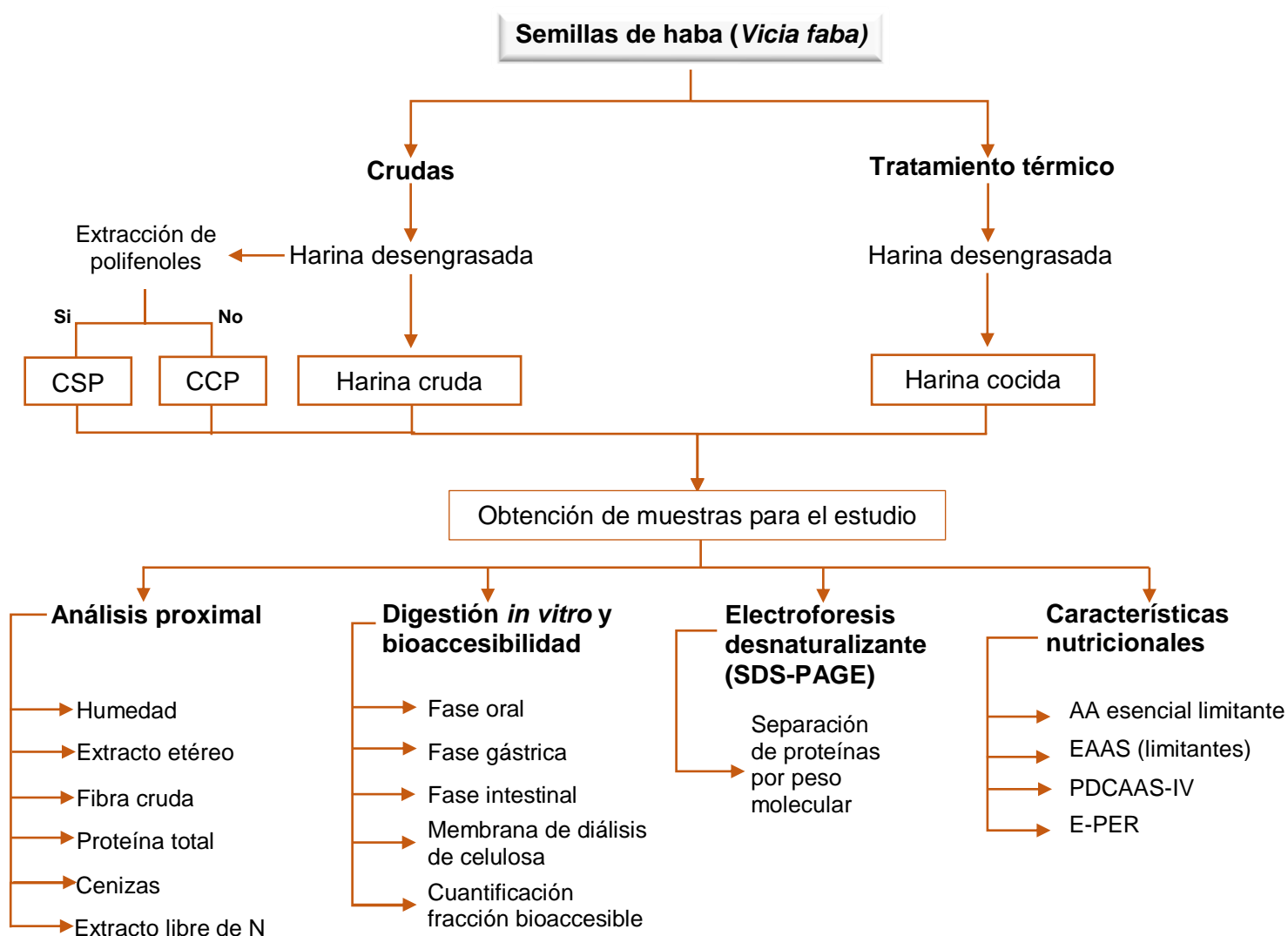
## V Metodología

### 5.1 Diseño de estudio

La presente investigación es un estudio experimental y analítico.

### 5.2 Estrategia general de diseño experimental

En la Figura 3 se presenta el esquema general del diseño experimental para las semillas de haba (*Vicia faba*) y las determinaciones planteadas en los objetivos específicos de esta investigación.



**Figura 3.** Esquema general del diseño experimental. Elaboración propia. CSP = Concentrado proteico sin polifenoles, CCP = Concentrado proteico con polifenoles, AA = aminoácido, EAAS = Puntuación de aminoácidos esenciales, PDCAAS-IV = Puntuación de aminoácidos corregida por la digestibilidad de las proteínas *in vitro*, E-PER = Índice de eficiencia proteica estimado.

## 5.2.1 Material, equipo y reactivos

<b>Material</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agitadores magnéticos</li> <li>• Bolsas de polietileno</li> <li>• Cubreboca</li> <li>• Desecador de vidrio</li> <li>• Espátulas metálicas</li> <li>• Frascos de vidrio ámbar</li> <li>• Frascos de vidrio con tapa.</li> <li>• Guantes</li> <li>• Lentes de protección</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Matraces Erlenmeyer</li> <li>• Probetas 10, 50, 100 y 1000 mL</li> <li>• Puntas para micropipeta</li> <li>• Tubos de ensayo</li> <li>• Tubos de ensayo con rosca</li> <li>• Tubos de plástico con tapa 15 y 50 mL.</li> <li>• Varillas de vidrio</li> <li>• Vasos de precipitado</li> </ul>
<b>Equipos</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agitador vórtex (VX-200 – LABNET)</li> <li>• Balanza analítica (HR-250AZ, A&amp;D Weighing)</li> <li>• Baño de agua (1265PC, Sheldon Manufacturing)</li> <li>• Baño seco digital (AccuBlock™, LABNET)</li> <li>• Campana de flujo laminar nivel 2 (AirClean® Systems)</li> <li>• Centrífuga (Hermle Labortechnik Z 216 MK)</li> <li>• Espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Extractor-Goldfish LABCONCO</li> <li>• Incubadora con agitador orbital (1575, Sheldon Manufacturing)</li> <li>• LECO (FP-528)</li> <li>• Medidor de pH (HI 254, HANNA Instruments)</li> <li>• Mufla FE-363</li> <li>• Placas de calentamiento Thermo Scientific Cimarec 588850100</li> <li>• Potenciómetro HANNA (HI221)</li> <li>• Refrigerador (4°C, -20°C)</li> <li>• Unidad de electroforesis Mini-PROTEAN 3 cell vertical</li> </ul>
<b>Reactivos</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido acético glacial (CTR Scientific)</li> <li>• Ácido clorhídrico 1M (HCl) (CTR Scientific)</li> <li>• Acrilamida 99.9% reactivo de pureza de electroforesis (Bio-Rad)</li> <li>• Alcohol metílico (CTR Scientific)</li> <li>• Azul de bromofenol reactivo de pureza de electroforesis (Bio-Rad)</li> <li>• BenchMark™ Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific)</li> <li>• Bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) (Sigma-Aldrich)</li> <li>• Bis (N, N' - Methylene – bis - acrylamide) reactivo de pureza de electroforesis (Bio-Rad)</li> <li>• Carbonato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (J. T. Baker)</li> <li>• Cloruro de calcio 0.3M (CaCl<sub>2</sub>) (Jalmek)</li> <li>• Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>) (CTR Scientific)</li> <li>• Cloruro de potasio (KCl) (Jalmek)</li> <li>• Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma-Aldrich)</li> <li>• Dodecilsulfato de sodio (SDS) reactivo de pureza de electroforesis (Bio-Rad)</li> <li>• Extracto de bilis de origen porcino (Sigma-Aldrich B8631 – 100G)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Jalmek)</li> <li>• Glicerol grado de biología molecular (Research Organics, INC.)</li> <li>• Glicina reactivo de pureza de electroforesis (Bio-Rad)</li> <li>• Hidróxido de sodio (NaOH) (CTR Scientific)</li> <li>• Pancreatina de origen porcino [4X USP] (Sigma-Aldrich P1750 – 100G)</li> <li>• Pepsina de mucosa gástrica en polvo [≥400 U/mg pt.] (Sigma-Aldrich P7125 – 100G)</li> <li>• Persulfato de amonio grado de biología molecular (Research Organics, INC.)</li> <li>• Polvo de tinción de proteína Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad)</li> <li>• Tetrametilendiamina (TEMED) reactivo de pureza de electroforesis (Bio-Rad)</li> <li>• Tris Base, grado de biología molecular (Promega)</li> <li>• β-mercaptoetanol reactivo de pureza de electroforesis (Bio-Rad)</li> </ul>

### **5.3 Preparación de la muestra**

Las semillas de haba secas fueron proporcionadas por productores del área rural de Puebla. Se retiró cualquier tipo de impureza y se seleccionaron las semillas de tamaño homogéneo que no presentaran algún daño.

#### **5.3.1 Obtención de la harina de haba cocida**

La cocción de haba se realizó acorde a la metodología propuesta por Khalil (2001) con ligeras modificaciones. Las semillas de haba se remojaron en agua destilada (1:5 p/v) por 12 h en refrigeración a 4 °C. Completado el tiempo de remojo, se enjuagaron 3 veces con agua destilada y se dejaron escurrir, se colocaron en vasos de precipitado de 1 L añadiendo 100 mL de agua destilada y se taparon con papel aluminio para la cocción en el esterilizador de vapor de alta presión (Yamato Scientific America Inc., SM300) a 121 °C por 15 min. Terminado el tiempo de cocción, se dejaron enfriar a temperatura ambiente para esparcirlas sobre bandejas metálicas con papel encerado y secar las semillas en horno eléctrico (Felisa FE-292D) por 48 h a 50°C removiendo las semillas esporádicamente para un secado uniforme. Para la obtención de la harina, las semillas cocinadas y secas se trituraron con una licuadora (Oster BEST02-E01), los trozos obtenidos fueron procesados en un molino de análisis de laboratorio (IKA® Molinos A 11 basic), la harina resultante fue tamizada a través de una malla número 20 (abertura: 850 µm) para obtener una harina fina de tamaño homogénea. El desgrasado de la harina se realizó de acuerdo a Serrano-Sandoval *et al.* (2019), el cual consistió en agitación constante con hexano (1:4 p/v), a 250 rpm durante, 4 h a temperatura ambiente. Terminado el tiempo, se recuperó la harina pasando la mezcla a través de un filtro de microfibra de vidrio (Whatman 1827-047) utilizando un matraz Kitasato y con ayuda de una bomba de vacío. El hexano con el extracto etéreo fue recuperado y almacenado en un bote de vidrio para determinaciones posteriores. La harina se dejó secar por 24 h en una Campana de flujo laminar nivel 2 (AirClean® Systems), la muestra fue almacenada en bolsas de polietileno a temperatura ambiente.

#### **5.3.2 Obtención de la harina de haba cruda**

Las semillas de haba cruda se procesaron según Vioque *et al.* (2012) para la obtención de harina desengrasada. Las semillas se secaron en el horno eléctrico previamente mencionado a 70 °C por 24 h, ya secas se trocearon en una licuadora (Oster BEST02-E01) para después pasarlas por un molino (IKA® Molinos A 11 basic) y obtener una harina fina, la cual se tamizó a través de una número 20 (abertura: 850 µm) para obtener un tamaño de

partícula uniforme. Para desengrasar la harina de haba cruda se utilizaron las mismas condiciones antes mencionadas (Serrano-Sandoval *et al.*, 2019) de la harina de haba cocida en autoclave según Khalil (2001). La harina desengrasada fue almacenada en bolsas de polietileno a temperatura ambiente.

### **5.3.3 Obtención de concentrados proteicos de harina de haba**

Para la extracción proteica de haba se utilizó el método propuesto por Sair (1959) con algunas modificaciones (Hernández-García *et al.*, 2016; Vioque *et al.*, 2012), el cual consiste en eliminar compuestos no proteicos con una disolución alcalina y la obtención de la fracción proteica mediante la precipitación ácida con el punto isoeléctrico de la proteína de haba (pH 4). A la harina de haba cruda desengrasada se le realizó la extracción de compuestos fenólicos por medio de una suspensión (10% p/v) con acetona al 75%, se dejó en agitación en una incubadora con agitación orbital (Sheldon Manufacturing, Inc., 1365 PC) a 280 rpm a temperatura ambiente durante 24 h. Cumplido el tiempo, la suspensión fue centrifugada a 13,520 g a 22 °C por 20 min, el sobrenadante fue descartado y se recuperó el precipitado. El precipitado se sometió a la fase alcalina, consiste en una suspensión (10% p/v) de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> al 0.25% ajustando el pH a 10.5 con NaOH 1 M, se dejó en agitación a 280 rpm a temperatura ambiente por 24 h. Posteriormente, la suspensión se centrifuga a 13,520 g a 4 °C por 20 min. El precipitado es el residuo alcalino insoluble el cual es descartado, se recuperan las proteínas solubles en el sobrenadante, las cuales son precipitadas en la fase ácida con el punto isoeléctrico de la proteína de haba, el sobrenadante se ajustó a pH 4 con HCl 12 M y se centrifugó bajo las condiciones anteriores para recuperar el sedimento y descartar el sobrenadante. El sedimento se secó en el horno a 50°C por 16 h. Para la obtención del concentrado proteico con compuestos fenólicos se realizó el mismo procedimiento descrito omitiendo la extracción de compuestos fenólicos.

### **5.4 Análisis proximal de harinas y concentrados proteicos**

Se realizó a las muestras según los métodos oficiales de la Asociación de Comunidades Analíticas (AOAC International, 2019). Consistió en determinar el contenido de humedad, cenizas, proteína cruda, extracto etéreo, grasa cruda, y fibra cruda. Por diferencia de 100, se calculó el extracto libre de N (CHO solubles).

#### **5.4.1. Determinación de humedad (AOAC 14.003)**

Consiste en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa por tratamiento térmico en un horno de calentamiento. Las muestras (3 g) se secaron en un horno eléctrico (Felisa FE-292D) a 100°C hasta medir un peso constante, se registró la diferencia de peso entre el material seco y húmedo. Se calculó el % de humedad con la siguiente fórmula (AOAC, 1990):

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = \frac{(A - B)}{(A - C)} \times 100$$

Donde:

A: peso (g) de la cápsula con muestra (g) antes del secado

B: masa de la cápsula (g) con la muestra desecada (g)

C: masa de la cápsula vacía (g)

#### **5.4.2 Determinación de cenizas (AOAC 14.006)**

Residuo inorgánico resultando de la carbonización y posterior calcinación de las muestras a 550 °C hasta medir un peso constante. Se calculó el % de cenizas con la siguiente fórmula (AOAC, 1990):

$$\text{Cenizas (\%)} = \frac{(CC - C)}{(W)} \times 100$$

Donde:

CC = peso inicial del crisol con muestra (g).

C = peso final de la muestra (g).

w = peso de la muestra (g).

#### **5.4.3 Determinación de proteínas (AOAC 992.23)**

El método de combustión de Dumas es un método absoluto para la determinación del contenido total de N en una matriz generalmente orgánica (AOAC, 2005). Las muestras (200 mg) se introdujeron en el equipo LECO (FP-528) incinerándolas a 950 °C en una atmósfera de oxígeno. A través de tubos de oxidación y reducción posteriores, el N se convierte cuantitativamente en N<sub>2</sub>. Otros productos de combustión volátiles quedan atrapados o separados. Un detector de conductividad térmica mide el gas N. Los resultados se expresan como % o mg de N, que pueden convertirse en proteína mediante el uso del factor de conversión 6.25 (Müller, 2017).

#### 5.4.4 Determinación de extracto etéreo (AOAC 7.056)

El extracto etéreo está representado por sustancia extraídas empleando éter etílico. El método de Goldfish se basa en el principio de extracción de lípidos presentes en una muestra, mediante solventes calientes y a reflujo, logrando la cuantificación por pérdida de peso en la muestra. Las muestras se colocaron en el extractor Goldfish (LABCONCO modelo 35001) hasta el completar el proceso, los vasos con extracto se secaron en estufa, después se pesaron para determinar la cantidad de lípidos contenida en la muestra con la siguiente formula (AOAC, 1980):

$$\text{Extracto etéreo (\%)} = \frac{[(VEE - VT) - (VEB - VT)]}{(g)} \times 100$$

Donde:

VEE: Peso del vaso más extracto etéreo de la muestra

VEB: Peso del blanco

VT: Peso del vaso tarado

g: Gramos de muestra

#### 5.4.5 Determinación de fibra cruda (AOAC 962.09)

Las muestras sin extracto etéreo y secas se emplearon para la determinación de fibra cruda mediante hidrólisis ácida con un 1.25% de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>) para la extracción de azúcares y almidón, seguida de la hidrólisis alcalina con un 1.25% de hidróxido de sodio (NaOH), que elimina las proteínas y parte de la hemicelulosa y de la lignina (Möller, 2014). La fibra cruda resultante es el residuo orgánico insoluble que consiste principalmente en celulosa y cierta porción de lignina y hemicelulosa contenidas en la muestra original, el cálculo se obtuvo con la siguiente formula (AOAC, 1990b):

$$\text{Fibra cruda base seca (\%)} = \frac{(PS_m - PS_{mc})}{(P_m)} \times 100$$

Donde:

PS<sub>m</sub>: Peso seco del crisol con muestra (g)

PS<sub>mc</sub>: Peso seco del crisol con muestra calcinada (g)

P<sub>m</sub>: Peso seco de la muestra (g)



#### 5.4.6 Cálculo extracto libre de nitrógeno por diferencia

Agrupar los nutrientes no analizados con las determinaciones anteriores dentro del análisis proximal. El extracto libre de N lo forma principalmente por CHO digeribles, así como también vitaminas y demás compuestos orgánicos solubles no nitrogenados, se obtiene al restar los porcentajes calculados para cada nutriente a 100 (FAO, 1993):

$$\text{Extracto libre de nitrógeno (\%)} = 100 - (A + B + C + D + E)$$

Donde:

A = Contenido de humedad (%)

B = Contenido de proteína cruda (%)

C = Contenido de extracto etéreo (%)

D = Contenido de fibra cruda (%)

E = Contenido de ceniza (%)

#### 5.5 Digestión *in vitro*

La digestión *in vitro* estática (Figura 4) se llevó a cabo de acuerdo al protocolo del consenso internacional estandarizado INFOGEST (Brodkorb *et al.*, 2019) con ligeras modificaciones. Este protocolo utiliza proporciones constantes de comida a líquidos digestivos y un pH constante para cada paso de la digestión. Se prepararon las soluciones para simular la concentración de electrolitos en los fluidos fisiológicos de la digestión humana. La Tabla 7 (Brodkorb *et al.*, 2019) indica las concentraciones para el fluido salival simulado (FSS), fluido gástrico simulado (FGS) y fluido intestinal simulado (FIS). La digestión *in vitro* se llevó a cabo por triplicado, con una muestra independiente para los ajustes de pH y un blanco de enzimas digestivas por cada muestra a tratar: harina de haba cruda, harina de haba cocida concentrado proteico sin polifenoles (CSP) y concentrado proteico con polifenoles (CPP). El experimento se llevó a cabo en un baño de agua (1265PC, Sheldon Manufacturing) a 37 °C con agitación manual cada 15 min.

**Tabla 7.** Preparación de soluciones madre para digestión *in vitro*. Fluidos de digestión simulados para un volumen de 400 mL diluidos con agua destilada (1.25x).

Solución de sal agregada	Concentraciones de stock		FSS (pH 7)		FGS (pH 3)		FIS (pH7)	
			mL de stock añadidos para 0.4 L (1,25x)	Concentración final de sal en FSS (mM)	mL de stock añadidos para 0.4 L (1,25x)	Concentración final de sal en FGS (mM)	mL de stock añadidos para 0.4 L (1,25x)	Concentración final de sal en FIS (mM)
			(g/L)	(M)	(mL)	(mM)	(mL)	(mM)
KCl	37.3	0.5	15.1	15.1	6.9	6.9	6.8	6.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68	0.5	3.7	3.7	0.9	0.9	0.8	0.8
NaHCO <sub>3</sub> <sup>a</sup>	84	1	6.8	13.6	12.5	25	42.5	85
NaCl	117	2	-	-	11.8	47.2	9.6	38.4
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	30.5	0.15	0.5	0.15	0.4	0.12	1.1	0.33
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*</sup>	48	0.5	0.06	0.06	0.5	0.5	-	-
<b>Para el ajuste de pH</b>								
HCl		6	0.09	1.1	1.3	15.6	0.7	8.4
NaOH		1	-	-	-	-	-	-
CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> <sup>b</sup>	44.1	0.3	0.025	1.5	0.005	0.15	0.04	0.6

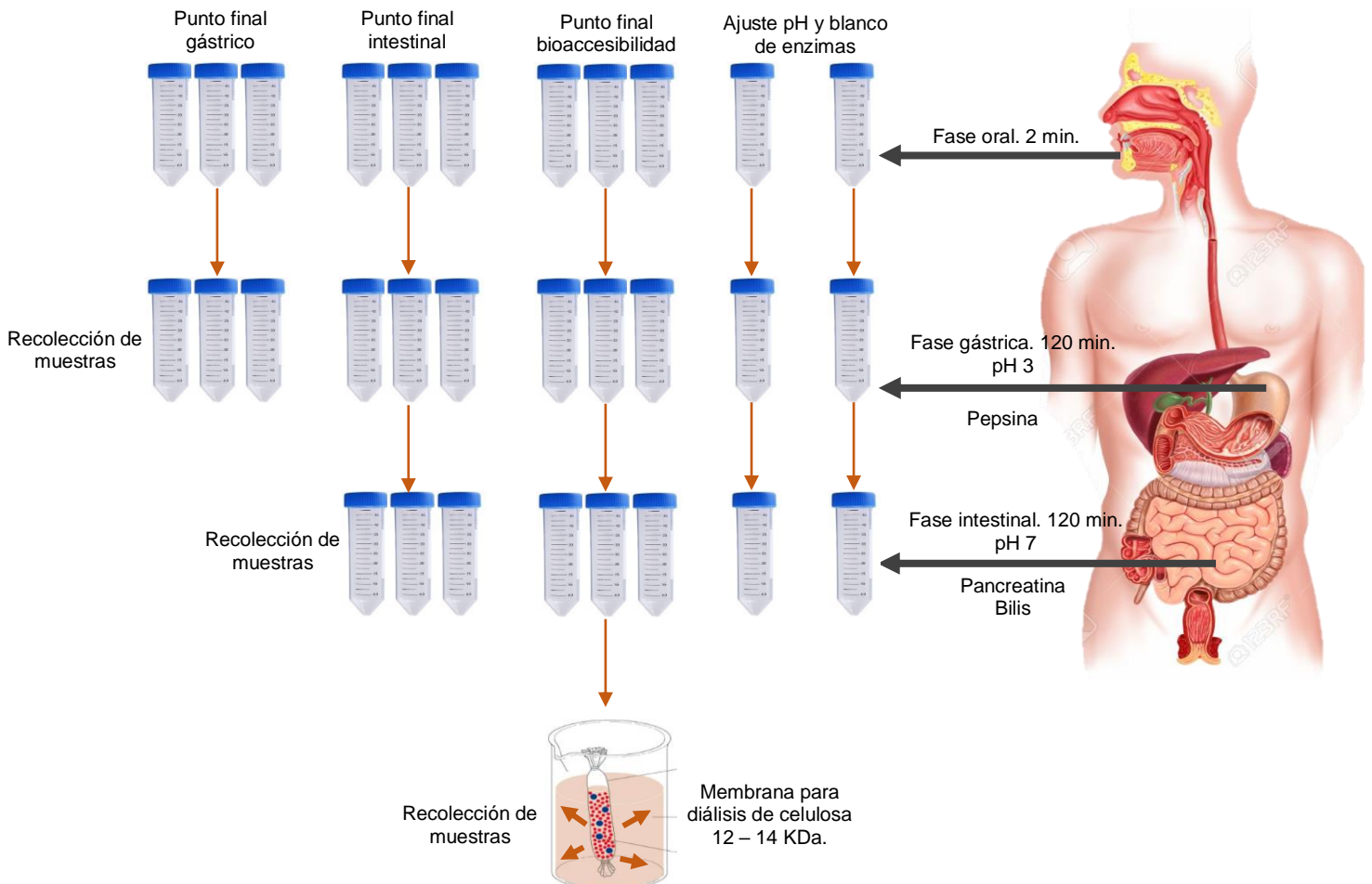
<sup>a</sup>El uso de sales de carbonato en las soluciones de electrolitos requiere el uso de recipientes sellados con espacio de cabeza limitado. <sup>b</sup>CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> debe agregarse inmediatamente antes de su uso. FSS = fluido salival simulado, FGS = fluido gástrico simulado, FIS = fluido intestinal simulado.

**Fase oral.** Se pesó 1 gramo de cada muestra en tubos de 50 mL, se agregó 0.8 mL de fluido salival simulado (FSS), 0.005 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.3 M y 0.195 mL de agua destilada para completar una relación 1:1 p/v, se mantuvo en agitación manual suave durante 2 min. Se omitió la adición de α-amilasa salival debido a la naturaleza proteica de las muestras a tratar.

**Fase gástrica.** A los 2 mL de bolo alimenticio procedentes de la fase oral, se les agregó 1.5 mL de fluido gástrico simulado (FGS), 20 mg de pepsina [≥400 unidades / mg pt.] disuelta en 0.32 mL de FGS, 0.001 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.3 M, 0.04 mL de HCl 1 M y 0.139 mL de agua destilada para completar una relación 1:1 v/v. Los tubos se mezclaron bien con agitador vórtex y después de 5 min se reajustó el pH a 3 con HCl 1 M, las muestras permanecieron 2 h en esta fase.

**Fase intestinal.** A los 4 mL de digerido gástrico se les agregó 2.2 mL de fluido intestinal simulado (FIS), 8 mg de pancreatina [4 x USP] disuelta en 1 mL de FIS 100 mg de extracto de bilis (B8631 – 100G) disuelta en 0.5 mL de FIS, 0.008 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.3 M, 0.03 mL de NaOH 1 M y 0.262 mL de agua destilada para completar una relación 1:1 v/v. Los tubos se mezclaron bien con agitador vórtex y después de 5 min

se reajustó el pH a 7 con NaOH 1 M, las muestras permanecieron 2 h en esta fase. Se recolectaron las muestras, se les ajustó el pH a 10.5 para inactivar las enzimas y fueron almacenadas a -20 °C.



**Figura 4.** Esquema general del proceso para la digestión *in vitro* (4 muestras diferentes; 1g en cada tubo) del Consenso Internacional estandarizado (Brodkorb *et al.*, 2019). Elaboración propia.

### 5.5.1 Cuantificación de proteína de las muestras digeridas

Para la cuantificación de proteínas después de la digestión *in vitro* se utilizó un método descrito por Scopes (1974) el cual utiliza la absorbancia del enlace peptídico a 205 nm, esta técnica muestra ventajas sobre otros métodos que presentan variabilidad debido a la composición de AA. Las diferentes muestras de la digestión *in vitro* fueron recolectadas para posteriores determinaciones. Las muestras se analizaron colocando una alícuota (1  $\mu$ L) en el espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c utilizando la longitud de onda UV de 205 nm para permitir mediciones sensibles de cuantificación de microvolúmenes de péptidos y proteínas los cuales se expresan en mg/mL (Thermo Scientific, 2014).

### 5.5.2 Determinación de digestibilidad proteica *in vitro*

La digestibilidad proteica *in vitro* (DPIV) se expresó como el porcentaje de la diferencia en el contenido de proteínas antes de la digestión y el contenido de proteínas en el sobrenadante después de la digestión acorde al método propuesto por Li *et al.*, (2017) con ligeras modificaciones. De cada muestra digerida se tomó 1 mL (fase intestinal), se pasó a un microtubo Eppendorf™ de 1.5 mL para ser centrifugado a 15,000 rpm durante 10 min. a temperatura ambiente. El precipitado es considerado como la parte insoluble que no es potencialmente absorbible, mientras que el sobrenadante contiene las proteínas solubles potencialmente absorbibles. Para la cuantificación de proteínas en el sobrenadante se utilizó el método descrito anteriormente propuesto por Scopes (1974).

El grado de digestibilidad se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Digestibilidad (\%)} = 100 \times \frac{Pt_0 - Pt_1}{Pt_0}$$

Donde  $Pt_0$  es el contenido proteico de la muestra sin tratamiento antes de la digestión;  $Pt_1$  es el contenido proteico en el precipitado de la muestra después de la digestión intestinal.

### 5.5.3 Bioaccesibilidad de las proteínas digeridas

Para evaluar la bioaccesibilidad de las muestras digeridas se realizó la simulación de los procesos de absorción mediante un procedimiento de diálisis estática con membrana de celulosa con método descrito por Managa *et al.* (2021) con ligeras modificaciones. Las muestras de la fase intestinal digeridas (8 mL) se vertieron dentro de una membrana de celulosa tubular para diálisis (D9652, Sigma-Aldrich), previamente hidratadas en agua destilada durante 10 min., como modelo simplificado de la barrera epitelial. Cada bolsa de diálisis se colocó dentro de un matraz de 125 mL, se sumergieron totalmente con 40 mL de **fluido intestinal simulado**, esta mezcla se mantuvo tapada a 37 °C en baño de agua durante 120 min con agitación manual suave cada 15 min. La fórmula utilizada para calcular la bioaccesibilidad de la proteína digerida fue (F. Liu *et al.*, 2021):

$$FB(\%) = 100 \times \frac{Pt_d \text{ (mg/mL)}}{Pt_i \text{ (mg/mL)}}$$

Donde  $FB(\%)$  es la fracción bioaccesible en porcentaje;  $Pt_d$  es la proteína dializada de las muestras digeridas;  $Pt_i$  es el contenido de proteína en la muestra inicial sin digerir.

#### 5.5.4 Cinética de liberación proteica de las muestras digeridas

La cinética de liberación proteica de las muestras digeridas se determinó según el método propuesto por Perales-Vázquez *et al.*, (2020) con ligeras modificaciones. Se replicaron las condiciones descritas en el párrafo anterior para evaluar la bioaccesibilidad, y se recogieron alícuotas de 5  $\mu$ L cada 15 min. del FIS con las proteínas liberadas desde bolsas de diálisis al matraz para su posterior análisis. La cuantificación de proteínas de las muestras recolectadas se realizó por el método descrito anteriormente propuesto por Scopes (1974).

Para determinar la cinética de liberación de la proteína digerida en la fase intestinal de la digestión *in vitro* se utilizó la siguiente ecuación:

$$V_f = \sum \frac{\Delta C}{\Delta T}$$

Donde  $V_f$  es la tasa final de liberación de la proteína digerida durante la cinética de liberación (mg/mL por min);  $\Delta C$  es la diferencia de la concentración de la proteína inicial y la concentración de la proteína final;  $\Delta T$  es la diferencia de tiempo específico con el tiempo inicial.

#### 5.6 Electroforesis (SDS-PAGE)

La proteína del ASP y CPP, harinas y muestras digeridas de haba se analizó con electroforesis unidimensional desnaturante en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) con sistema de tampón discontinuo como fue descrito por Laemmli (1970) con ligeras modificaciones (Xing *et al.*, 2017). Esta técnica permite separar proteínas en función a su peso molecular y su migración a través del gel mediante la aplicación de un campo eléctrico, estas mediciones de proteólisis permiten comparara la digestibilidad *in vitro*.

##### Preparación de las muestras

Para la estandarización de las muestras a analizar, los digeridos resultantes de la fase gástrica e intestinal fueron llevadas a un volumen de 40 mL, con agua destilada, igual que el volumen de bioaccesibilidad, para las muestras sin digerir, se pesó en balanza analítica (HR-250AZ, A&D Weighing) 1g de cada muestra y se aforo a 40 mL con agua destilada. Las muestras se mezclaron en agitador vórtex hasta la eliminación de grumos.

## **Preparación de los geles y separación de las proteínas**

Se prepararon los reactivos y soluciones madre según el manual Bio-Rad Laboratories (2014) para la elaboración del gel de 0.75 mm de espesor al 12% (resolución: abajo) y 4% (concentrador: arriba). Se tomaron 25  $\mu$ L de cada muestra y se diluyeron a relación 1:2 con buffer de muestra con  $\beta$ -mercaptoetanol y se calentaron a 95 °C por 4 min para cargar las muestras (14  $\mu$ L) en el gel utilizando como marcador de peso molecular (15  $\mu$ L) BenchMark Protein Ladder. La electroforesis se realizó con sistema de tampón discontinuo en una unidad de electroforesis Mini-PROTEAN 3 cell vertical a 60 V hasta que la marca azul hubiese alcanzado el fondo del gel concentrador, aumentando a 120 V hasta que la marca azul alcanzara el fondo del gel de resolución. El gel fue teñido con la solución (0.1% azul de Coomassie, 45% metano y 45% ácido acético glacial) durante toda la noche con agitación suave (80 rpm). El gel fue sumergido en solución desteñidora (5% ácido acético glacial, 45% agua destilada y 50% metanol) con agitación suave hasta que desapareció el color de fondo, el gel se enjuago varias veces con agua destilada hasta que las bandas de proteína coloreadas fueran claramente visibles. El análisis de imágenes de los geles SDS-PAGE se llevó a cabo utilizando el software GelAnalyzer 19.1 (Istvan, 2021).

## **5.7 Evaluación de parámetros nutricionales:**

### **5.7.1 Determinación cromatográfica líquida de alto rendimiento de aminoácidos libres de las muestras**

Para el análisis de AA libres totales en las muestras de proteicas de haba, se utilizó un método de cromatografía líquida de alta presión (HPLC por su siglas en inglés) en fase inversa, utilizando derivatización de fluorescencia previa a la columna de acuerdo a Vázquez-Ortiz *et al.*, (1995). Los AA primarios se trataron con 0-Ftalaldehído (OPA). Los productos de reacción se separaron en una columna de fase inversa (Microsorb Short-ones de 3  $\mu$ m) con desarrollo de elución en gradiente. Los AA se separaron en 21 min. Los AA secundarios se hicieron reaccionar con 4-cloro-7-nitrobenzofurazan (NBD) y su separación se llevó a cabo en una columna Lichrosorb FW-C18, 5 $\mu$ m.

### **Preparación de las muestras**

Los extractos para análisis se prepararon mezclando las muestras en un homogeneizador (Waring™) en una proporción de 1 g de muestra por 2 mL de ácido tricloroacético (TCA). Los extractos se centrifugaron y se analizó parte del sobrenadante.

### **Aminoácidos primarios. Solución derivatizante de OPA**

A 10 mg de OPA disueltos en 250  $\mu$ L de metanol, se le añadieron 37.5  $\mu$ L de solución Brij®35 al 30%, 25  $\mu$ L de 2-mercaptoetanol y 3 mL de tampón borato potásico 0.5 M pH = 10.4. Esta solución se diluyó a 10 mL con tampón borato y se mezcló bien. Luego se almacenó en refrigeración en la oscuridad y se dejó reposar durante 24 h antes de su uso.

### **Preparación de derivatización de muestras**

Una muestra de extracto de TCA se diluyó con 5 mL de tampón de citrato de sodio pH = 2,2, se filtró (Whatman 934-AH) y se diluyó con ácido alfa-aminobutírico (2.5 M/mL) como estándar interno (EI) de la siguiente manera:

100  $\mu$ L de extracto de TCA + 40  $\mu$ L de EI a 1 mL

Derivación de la muestra. Inmediatamente antes de cargar el circuito de inyección, se preparó una combinación de 0.5 mL de solución de OPA y 0.5 mL de muestra o solución estándar de AA que contenía EI en un tubo de ensayo pequeño y se mezcló. Se inyectó en 2 min.

### **Aminoácidos secundarios**

Preparación de los derivados de NBD. Se combinaron volúmenes iguales de muestra de extracto de TCA, tampón de borato 0.4 M y la solución de NBD (2 mg/mL en metanol) y la mezcla se calentó durante 5 min a 60 °C en un vial cerrado. La reacción se detuvo enfriando la mezcla a 0 °C. Se inyectaron 10  $\mu$ L en la columna. La cuantificación se realizó utilizando un patrón externo.

### **5.7.2 Aminoácido esencial limitante, Puntuación de aminoácidos esenciales, Puntuación de aminoácidos corregida por la digestibilidad de las proteínas *in vitro* e Índice de eficiencia proteica estimado**

La puntuación de AA esenciales (EAAS), también conocida como Puntuación Química de proteína (Chemical Score), se utiliza para determinar si una proteína está completa con base en la cantidad de AA esenciales en comparación con el nivel presente en una proteína de referencia seleccionada por su excelencia nutricional (Mitchell & Block, 1946). La EAAS se determinó como la relación entre el contenido de aminoácido esencial limitante de las muestras y el de la proteína de referencia establecida por la FAO/OMS utilizando el requerimiento de AA para niños de 3 a 10 años de edad (FAO, 2013). La proporción del aminoácido esencial más bajo representó el aminoácido esencial limitante. Los cálculos se

realizaron de acuerdo a la FAO, (2013) con ligeras modificaciones propuestas por Le Roux *et al.*, (2020). La ecuación fue la siguiente:

$$EAAS \text{ (limitantes)} = \frac{\text{Contenido de AA limitante en la muestra}}{\text{Contenido de AA limitante en patron de referencia}}$$

La Puntuación de AA corregida por la digestibilidad de las proteínas *in vitro* (PDCAAS-IV) se calculó adaptando la metodología de la FAO, (2013) en la que la digestibilidad de la proteína fecal verdadera (normalmente determinada *in vivo* en ratas en crecimiento) se reemplazó por la digestibilidad proteica *in vitro* (DPIV) calculada como se describe anteriormente. La ecuación fue entonces la siguiente:

$$PDCAAS - IV (\%) = DPIV (\%) \times EAAS$$

El Índice de Eficiencia Proteica (PER) fue el primer método *in vivo* adoptado para la evaluación de rutina de la calidad proteica de los alimentos. Los investigadores han intentado correlacionar los métodos *in vivo* con los métodos *in vitro* con el fin de desarrollar métodos menos complicados y fiables para la medición del PER. Uno de estos métodos es el Índice de Eficiencia Proteica Estimado (E-PER).

Los valores del PER Pronosticado se calcularon a partir de la composición de AA de las muestras basándose en la siguiente ecuación desarrollada por Alsmeyer *et al.*, (1974):

$$E - PER = -0.468 + 0.454(\text{Leu}) - 0.105(\text{Tyr})$$

## 5.8 Análisis estadístico

Los análisis y experimentos con las muestras se realizaron por triplicado. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (DEM). Para el análisis estadístico, los resultados fueron analizados con el software estadístico IBM SPSS Statistics 25.0. Para comprobar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk y una vez confirmada la homogeneidad de varianzas (homocedasticidad) con la prueba Levene, se realizó análisis de varianzas de un factor (ANOVA) para comprobar diferencias entre grupos, y la prueba *post-hoc* de Tukey para confirmar las diferencias entre grupos estadísticamente significativas con un valor de significancia  $p < 0.05$



## VI. Resultados

### 6.1 Rendimiento de la extracción proteica de harina cruda

El porcentaje de rendimiento de las dos extracciones proteicas (con y sin polifenoles) y su concentración de proteína se muestran en la Tabla 8. En cuanto a la extracción proteica sin polifenoles, se logró obtener una concentración proteica >90%, por lo cual, de aquí en adelante se menciona como aislado proteico sin polifenoles (ASP), mientras que la extracción proteica con polifenoles mostró una concentración proteica <90%, concentración perteneciente de un concentrado proteico con polifenoles (CPP). La extracción proteica del CPP mostró un mayor rendimiento ( $p < 0.05$ ), sin embargo, la mayor concentración proteica se obtuvo en el ASP ( $p < 0.05$ ), demostrando que la extracción proteica con un mayor nivel de pureza en las proteínas al retirar los polifenoles reduce significativamente el rendimiento de obtención hasta un 8%.

**Tabla 8.** Porcentaje de rendimiento de diferentes extracciones proteicas y su contenido de proteína. Datos expresados en media  $\pm$  DEM ( $n=3$ ).

Lote	Aislado proteico sin polifenoles		Concentrado proteico con polifenoles	
	1	2	1	2
Harina cruda inicial (g)	25.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	25.03 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	25.03 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	25.01 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
Muestra obtenida (g)	4.24 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	4.10 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	5.53 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	5.60 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
Rendimiento (%)	16.97 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	16.40 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	22.10 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	22.36 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>
Concentración proteica (%)	94.39 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup>	93.36 $\pm$ 1.26 <sup>a</sup>	84.84 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	84.36 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>

Prueba ANOVA de un factor y Tukey como prueba *post hoc*. Letras en superíndice diferentes en la misma fila indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). \*Determinación por método de combustión de Dumas (AOAC 992.23).

### 6.2 Análisis proximal de harinas y aislado proteico

La composición proximal de las muestras analizadas en base seca según los métodos oficiales de la Asociación de Comunidades Analíticas (AOAC International, 2019) se muestra en la Tabla 9. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre grupos en los resultados de ceniza, mientras que en el resto de resultados humedad, proteína, lípidos, fibra cruda y extracto libre de N existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

La extracción proteica que se realizó retirando los compuestos fenólicos mostro mayor concentración de proteína a diferencia de la extracción proteica sin retirar los compuestos fenólicos con 94.4 y 84.4% de concentración proteica, respectivamente. En ambas muestras no se logró cuantificar la fibra cruda, ya que para la extracción proteica se retira la mayor cantidad posible de otros componentes no proteicos. Los extractos proteicos

mostraron las menores cantidades de ceniza en comparación con las harinas, a pesar de esto, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

**Tabla 9.** Composición proximal de harina cruda, harina cocida, aislado proteico y concentrado proteico con polifenoles. Datos expresados en % (p/p) base seca, media  $\pm$  DEM ( $n=3$ ).

Componente (%)	Harina cruda	Harina cocida	ASP	CPP
Humedad	3.34 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>	5.79 $\pm$ 0.98 <sup>bc</sup>	2.68 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	7.55 $\pm$ 0.85 <sup>c</sup>
Ceniza	3.17 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	3.16 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	2.69 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	2.90 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>
Proteína	26.47 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	27.98 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	94.39 $\pm$ 0.76 <sup>c</sup>	84.37 $\pm$ 0.30 <sup>d</sup>
Extracto etéreo	2.00 $\pm$ 0.20 <sup>c</sup>	1.66 $\pm$ 0.29 <sup>bc</sup>	0.23 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	1.43 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>
Fibra cruda	1.89 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.78 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	<0.1 <sup>b</sup>	<0.1 <sup>b</sup>
Extracto libre de N	63.13 $\pm$ 1.07 <sup>a</sup>	59.43 $\pm$ 3.16 <sup>b</sup>	<0.1 <sup>c</sup>	3.74 $\pm$ 0.50 <sup>d</sup>

ASP = Aislado proteico sin polifenoles, CPP = Concentrado proteico con polifenoles. \*Trazas (menos del 0.1%). Prueba ANOVA de un factor y Tukey como prueba *post hoc*. Letras en superíndice diferentes en la misma fila indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

### 6.3 Determinación de digestibilidad proteica *in vitro*

En la Tabla 10 se muestran los resultados de la digestibilidad de las diferentes muestras después de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Las muestras presentaron algunas diferencias estadísticamente significativas en la proteína cuantificada (mg/mL) antes de ser sometidas a la digestión *in vitro*. La concentración proteica en la Harina de haba cocida fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ), seguido del CPP. Por otra parte, la harina de haba cruda y el ASP mostraron la mayor concentración proteica sin presentar diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

Respecto a la fase intestinal todos los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). La muestra con mayor cuantificación proteica en el sedimento fue la harina de haba cruda, seguido del ASP, CPP y por último la harina de haba cocida. Por el contrario, las muestras con la menor sedimentación proteica, fueron las que presentaron mayor cantidad de proteínas en el sobrenadante.

**Tabla 10.** Porcentaje de digestibilidad proteica *in vitro* de harina cruda, harina cocida, aislado proteico y concentrado proteico con polifenoles. Datos expresados en media  $\pm$  DEM ( $n=3$ ).

Muestra	Proteína cuantificada (mg/mL)*			Digestibilidad proteica <i>in vitro</i> (%)
	Inicial sin digestión	Sedimento fase intestinal	Sobrenadante fase intestinal	
Harina cruda	7.27 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	4.99 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	2.28 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	31.34 $\pm$ 1.40 <sup>a</sup>
Harina cocida	6.52 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.38 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>	6.14 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	94.15 $\pm$ 2.45 <sup>b</sup>
ASP	7.15 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	1.59 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	5.55 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	77.73 $\pm$ 2.26 <sup>c</sup>
CPP	6.90 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	1.99 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>	4.90 $\pm$ 0.17 <sup>d</sup>	71.09 $\pm$ 1.69 <sup>d</sup>

ASP = Aislado proteico sin polifenoles, CPP = Concentrado proteico con polifenoles. Prueba ANOVA de un factor y Tukey como prueba *post hoc*. Letras en superíndice diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). \*Determinación por método de Scopes (1974) el cual utiliza la absorbancia del enlace peptídico a 205 nm.

Al término de la digestión gastrointestinal *in vitro*, se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en todas las muestras. La harina de haba cocida fue la muestra que presentó el mayor porcentaje de digestibilidad con valor arriba del 90%, seguido del ASP y el CPP. La harina cruda presentó la menor digestibilidad proteica.

#### 6.4 Bioaccesibilidad de la proteína de las muestras digeridas

La tabla 11 muestra los resultados de la bioaccesibilidad de los péptidos (<14 kDa) de proteína de haba (*Vicia faba*) de las distintas muestras después de ser sometidas a una digestión *in vitro* y la cantidad de péptidos después de ser dializadas.

**Tabla 11.** Porcentaje de bioaccesibilidad de harina cruda, harina cocida, aislado proteico y concentrado proteico con polifenoles de haba (*Vicia faba*). Datos expresados en media  $\pm$  DEM ( $n=3$ ).

Muestra	Proteína cuantificada (mg/mL)*		Bioaccesibilidad (%)
	Inicial sin digestión	Dializada	
Harina cruda	7.27 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	1.20 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	16.43 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>
Harina cocida	6.52 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	1.34 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	20.47 $\pm$ 1.78 <sup>a</sup>
ASP	7.15 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	2.13 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	29.85 $\pm$ 1.88 <sup>b</sup>
CPP	6.90 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	2.29 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	33.19 $\pm$ 1.65 <sup>b</sup>

ASP = Aislado proteico sin polifenoles, CPP = Concentrado proteico con polifenoles. Prueba ANOVA de un factor y Tukey como prueba *post hoc*. Letras en superíndice diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). \*Determinación por método de Scopes (1974) el cual utiliza la absorbancia del enlace peptídico a 205 nm.

La mayor cantidad de péptidos bioaccesibles (<14 kDa) y dializados se obtuvieron a partir de las muestras del ASP y el CPP sin diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.110$ ), a pesar de que el concentrado proteico presentara valores más elevados. En cuanto a las harinas, la harina cocida presentó un mayor porcentaje de bioaccesibilidad, sin embargo, este no fue significativamente distinto al de la harina cruda, ( $p=0.05$ ). En ese sentido, la harina cruda y cocida presentaron una bioaccesibilidad estadísticamente similar, por lo que el tratamiento térmico no mostró un aumento estadísticamente significativo en la bioaccesibilidad. El ASP y el CPP no mostraron valores estadísticamente diferentes.

#### 6.6 Cinética de liberación proteica de las muestras sometidas a la digestión *in vitro*

Los resultados de la cinética de liberación proteica (mg/mL) de las muestras sometidas a la digestión *in vitro* se muestran en la Tabla 12, 13 y 14.

Durante la cinética de liberación se obtuvieron velocidades promedio de la proteína total liberada (mg/mL) *in vitro* desde 0.010 hasta 0.019 mg/mL de proteína por min (Tabla 12). La harina cruda y harina cocida mostraron velocidades similares sin diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ). El ASP y el CPP no mostraron diferencias

significativas en sus velocidades de liberación proteica ( $p>0.05$ ), además de reportar la mayor velocidad de liberación.

La cantidad de proteína total liberada (mg/mL) *in vitro* mostró diferencias significativas ( $p<0.05$ ) en todas las muestras a lo largo de los 120 min (Tabla 13 y Figura 5), sin embargo, se obtuvieron valores estadísticamente similares ( $p>0.05$ ) en la harina cruda y harina cocida en los min 15, 75, 90, 105 y 120, lo que sugiere que el tratamiento térmico no influyó en la cantidad de proteína liberada. Por otro lado, el ASP y CPP no mostraron valores estadísticamente diferentes ( $p>0.05$ ) a excepción del min 105, esto señala que el ASP y CPP presentan la misma cantidad de proteína total liberada, además, estas muestras reportaron la mayor liberación proteica total.

La tasa de liberación de proteína (mg/mL por min) *in vitro* se muestra en la (Tabla 14 y Figura 6). Se obtuvieron velocidades estadísticamente iguales ( $p>0.05$ ) en todas las muestras durante el transcurso del min 15 al 30, y del min 30 al 45. Todas las muestras presentaron su mayor tasa de liberación durante el min 0 al 15, siendo la harina cruda la muestra con menor tasa de liberación, sin embargo, esta no se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p>0.05$ ) con la harina cocida y el CPP. La harina cruda y la harina cocida mostraron la misma ( $p>0.05$ ) tasa de liberación, lo que sugiere que el tratamiento térmico no cambió la velocidad de liberación proteica. Por otra parte, el ASP y el CPP si mostraron algunas diferentes tasas de liberación ( $p<0.05$ ) durante el min 45 al 60 y 90 al 105.

**Tabla 12.** Velocidad promedio de proteína total liberada (mg/mL) *in vitro* de harina cruda, harina cocida, aislado proteico y concentrado proteico con polifenoles. Datos expresados en media  $\pm$  DEM ( $n=3$ ).

Muestra	Velocidad promedio (mg/mL por min)
Harina cruda	0.010 $\pm$ 0.000 <sup>a</sup>
Harina cocida	0.011 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>
ASP	0.018 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>
CPP	0.019 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>

ASP = Aislado proteico sin polifenoles, CPP = Concentrado proteico con polifenoles. Prueba ANOVA de un factor y Tukey como prueba *post hoc*. Letras en superíndice diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ( $p<0.05$ ).

**Tabla 13.** Proteína total liberada (mg/mL) *in vitro* de harina cruda, harina cocida, aislado proteico y concentrado proteico con polifenoles. Datos expresados en media  $\pm$  DEM ( $n=3$ ).

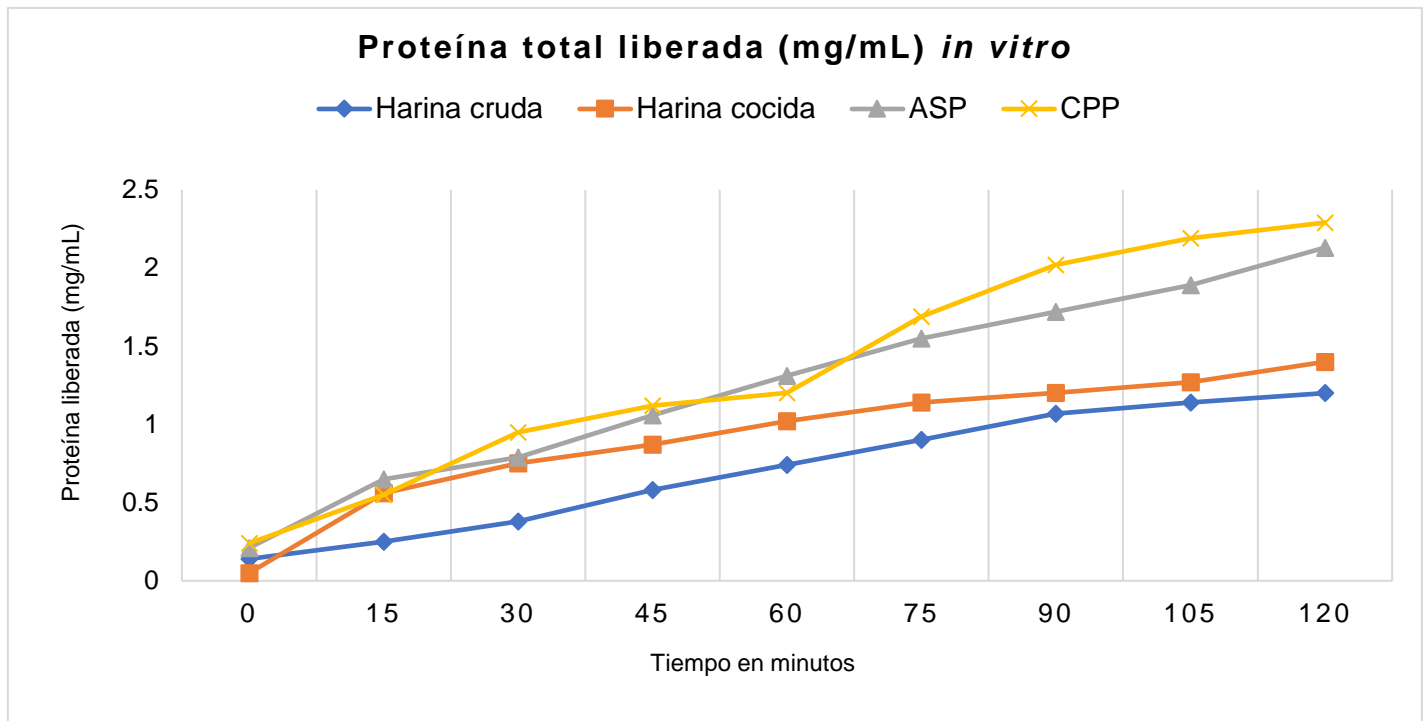
Muestra (mg de proteína dializada/mL) *	Tiempo (min)							
	15	30	45	60	75	90	105	120
Harina cruda	0.25 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.38 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.58 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.74 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.90 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	1.07 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	1.14 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	1.20 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
Harina cocida	0.56 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>	0.75 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	0.87 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	1.02 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	1.14 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	1.20 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	1.27 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	1.40 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>
ASP	0.64 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	0.79 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	1.06 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	1.31 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	1.55 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	1.72 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	1.89 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	2.13 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>
CPP	0.55 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	0.95 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	1.12 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	1.20 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	1.69 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>	2.02 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	2.19 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	2.29 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>

ASP = Aislado proteico sin polifenoles, CPP = Concentrado proteico con polifenoles. Prueba ANOVA de un factor y Tukey como prueba *post hoc*. Letras en superíndice diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). \*Determinación por método de Scopes (1974) el cual utiliza la absorbancia del enlace peptídico a 205 nm.

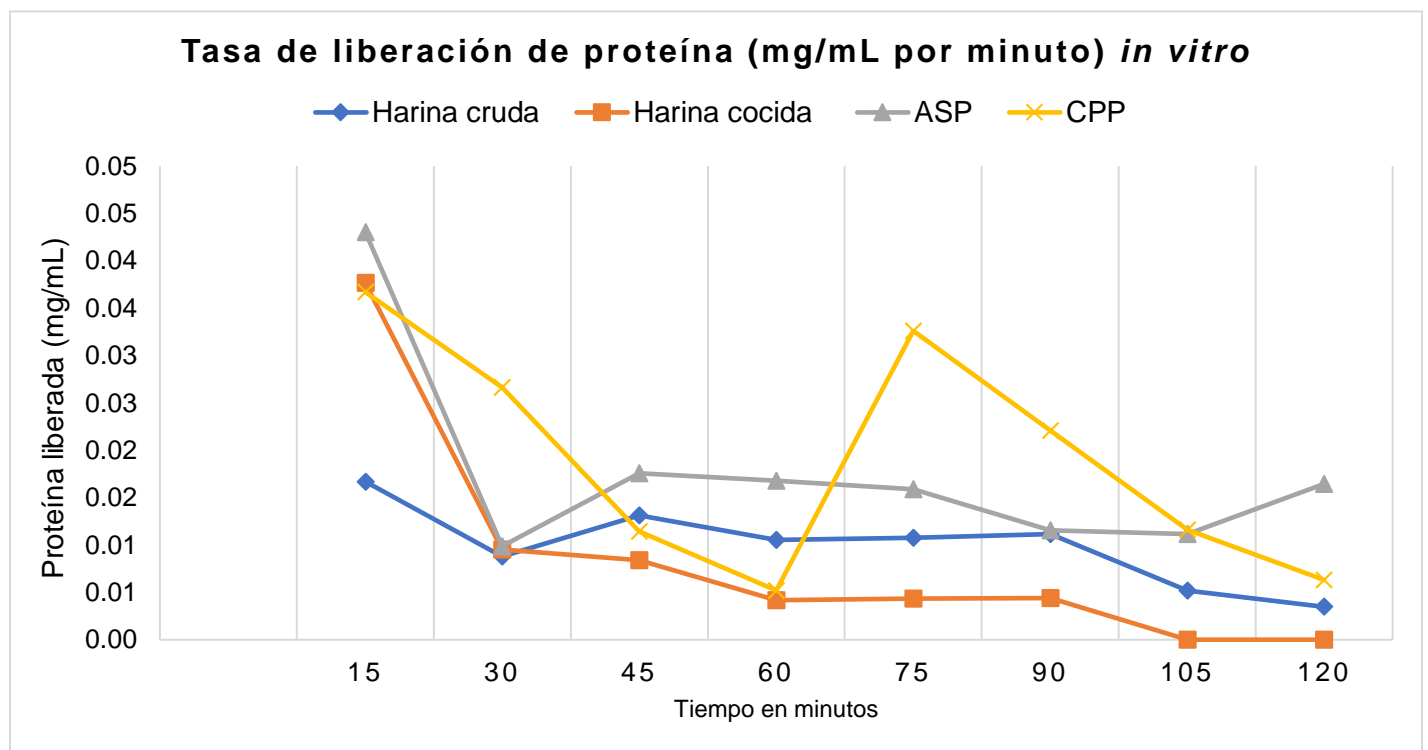
**Tabla 14.** Cinética de liberación (mg/mL por min) *in vitro* de harina cruda, harina cocida, aislado proteico y concentrado proteico con polifenoles. Datos expresados en media  $\pm$  DEM ( $n=3$ ).

Muestra (mg de proteína dializada/mL) *	Tiempo (min)							
	15	30	45	60	75	90	105	120
Harina cruda	0.02 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup>	0.01 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
Harina cocida	0.04 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.01 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup>	0.01 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
ASP	0.04 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.01 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.01 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.01 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
CPP	0.04 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup>	0.03 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.03 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.01 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.01 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>

ASP = Aislado proteico sin polifenoles, CPP = Concentrado proteico con polifenoles. Prueba ANOVA de un factor y Tukey como prueba *post hoc*. Letras en superíndice diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). \*Determinación por método de Scopes (1974) el cual utiliza la absorbancia del enlace peptídico a 205 nm.



**Figura 5.** Proteína total liberada (mg/mL) *in vitro* de harina cruda, harina cocida, aislado proteico y concentrado proteico con polifenoles.



**Figura 6.** Cinética de liberación (mg/mL por minuto) *in vitro* de harina cruda, harina cocida, aislado proteico y concentrado proteico con polifenoles

## 6.7 Electroforesis (SDS-PAGE)

Se evaluó el proceso de digestión *in vitro* a través de la acción proteolítica de las enzimas (pepsina y proteasas pancreáticas) sobre la fracción proteica de las muestras. En las Figuras 11 y 12 se muestran el perfil electroforético por peso molecular de la fracción proteica de las muestras sometidas a digestión *in vitro* determinadas por SDS-PAGE. En las muestras se observaron proteínas predominantes con peso molecular de 50 y 30 kDa, seguido de las proteínas entre 15 y 20 kDa, y finalmente las de 70 kDa. Además, se observaron bandas tenues con peso molecular de 60, 40, 27 y 17 kDa. El perfil electroforético de la harina cruda mostró la presencia de 12 proteínas, la Harina cocida mostró bandas muy tenues presentó 4 proteínas, el ASP mostró 12 proteínas y el CPP 11 (Tabla 15 a18 y Figura 7 a 10). Las proteínas se lograron identificar y se determinó su peso molecular empleando la curva de calibración del marcador de peso molecular.

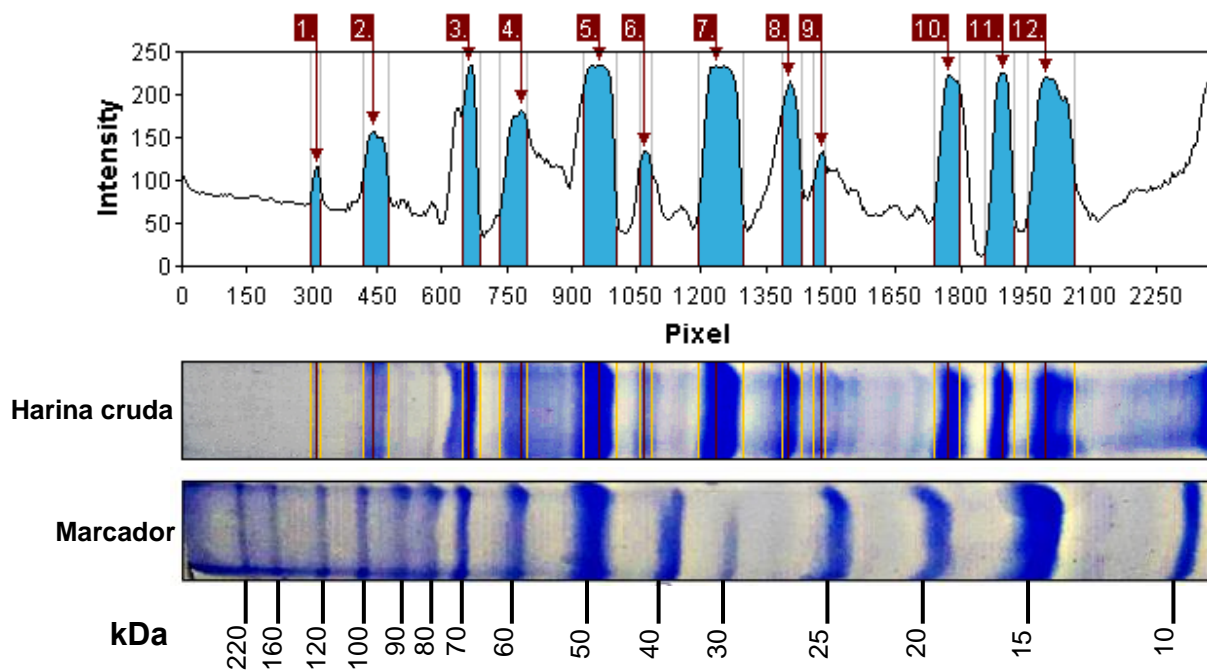
Los resultados muestran la modificación del perfil proteico de cada muestra a través de la digestión *in vitro*, lo que indica que todos los tratamientos enzimáticos fueron capaces de degradar proteínas de alto peso molecular a proteínas más pequeñas. Durante la fase gástrica, la pepsina fue particularmente efectiva, produciendo proteínas con menor peso molecular en la Harina de haba cruda, ASP y CPP. Al finalizar la fase intestinal se observaron 4 bandas de peso molecular entre 13 y 23 kDa en la Harina de haba cruda, y 5 bandas (14 a 22 kDa) en el CPP, a diferencia del ASP donde se identificaron 8 bandas (15 a 22 kDa). En la Harina de haba cruda y el CPP fueron predominantes las proteínas <17 kDa de peso molecular, mientras que en el ASP todavía estaban presentes algunas proteínas no hidrolizadas >20 kDa, lo que sugiere una menor actividad proteolítica.

El perfil proteico bioaccesible de las muestras fue analizado mediante SDS-PAGE de la fracción proteica dializada después de la digestión *in vitro*. En la Harina cruda de haba y el ASP se observaron proteínas bioaccesibles de bajo peso molecular (BPM) <15 kDa, mientras que en el CPP se observó solo una tenue banda por debajo de los 10 kDa. La Harina de haba cocida no mostró ninguna banda.

**Tabla 15.** Peso molecular (kDa) de las proteínas identificadas mediante SDS-PAGE en la harina cruda

Harina Cruda		
Banda	R <sub>f</sub> <sup>a</sup>	Peso molecular (kDa)
1	0.126	132
2	0.179	104
3	0.267	71
4	0.313	59
5	0.384	45
6	0.423	39
7	0.488	31
8	0.554	25
9	0.584	23
10	0.698	18
11	0.747	16
12	0.785	15

<sup>a</sup>Se define como la distancia (mm) de migración de la proteína a través del gel dividida por la distancia de migración del frente del colorante. La distancia debe medirse desde la parte superior del gel de resolución hasta la banda de interés.



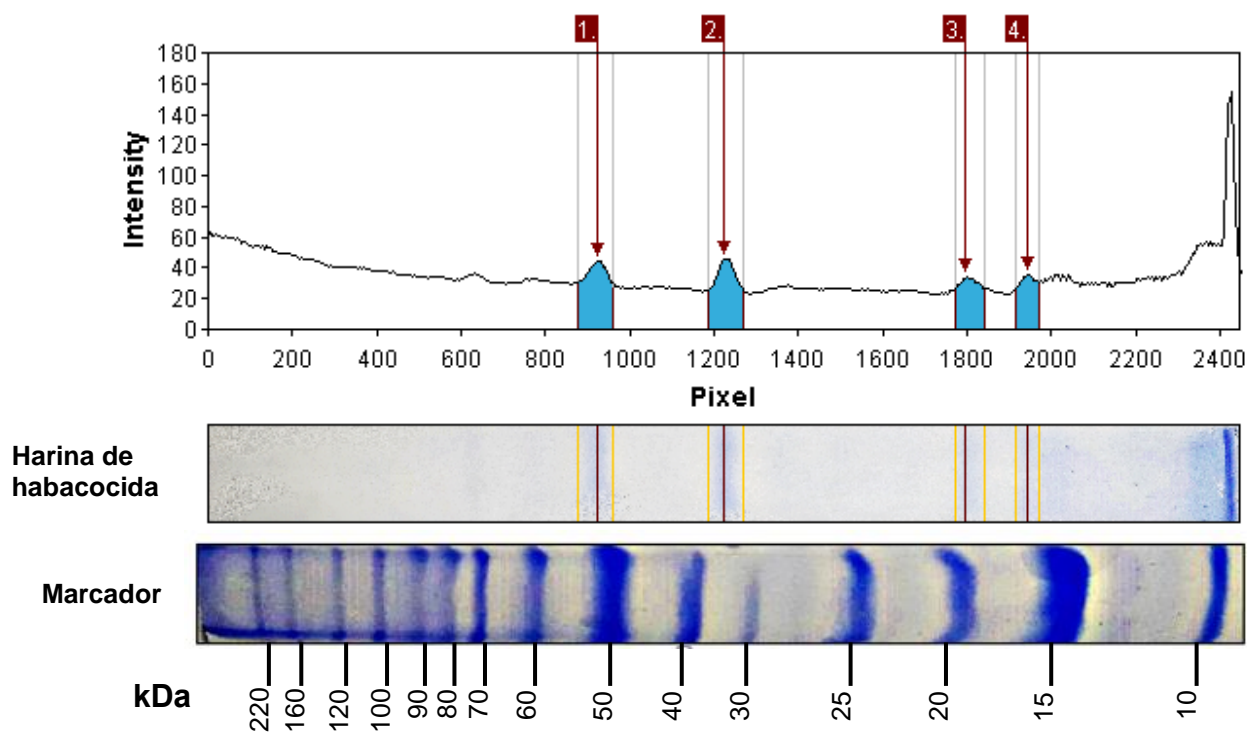
**Figura 7.** Proteínas identificadas mediante el software GelAnalyzer 19.1 en el perfil electroforético de harina de haba cruda



**Tabla 16.** Peso molecular (kDa) de las proteínas identificadas mediante SDS-PAGE en la harina de haba cocida

Harina de haba cocida		
Banda	R <sub>f</sub> <sup>a</sup>	Peso molecular (kDa)
1	0.381	45
2	0.5	30
3	0.728	17
4	0.787	15

<sup>a</sup>Se define como la distancia (mm) de migración de la proteína a través del gel dividida por la distancia de migración del frente del colorante. La distancia debe medirse desde la parte superior del gel de resolución hasta la banda de interés.

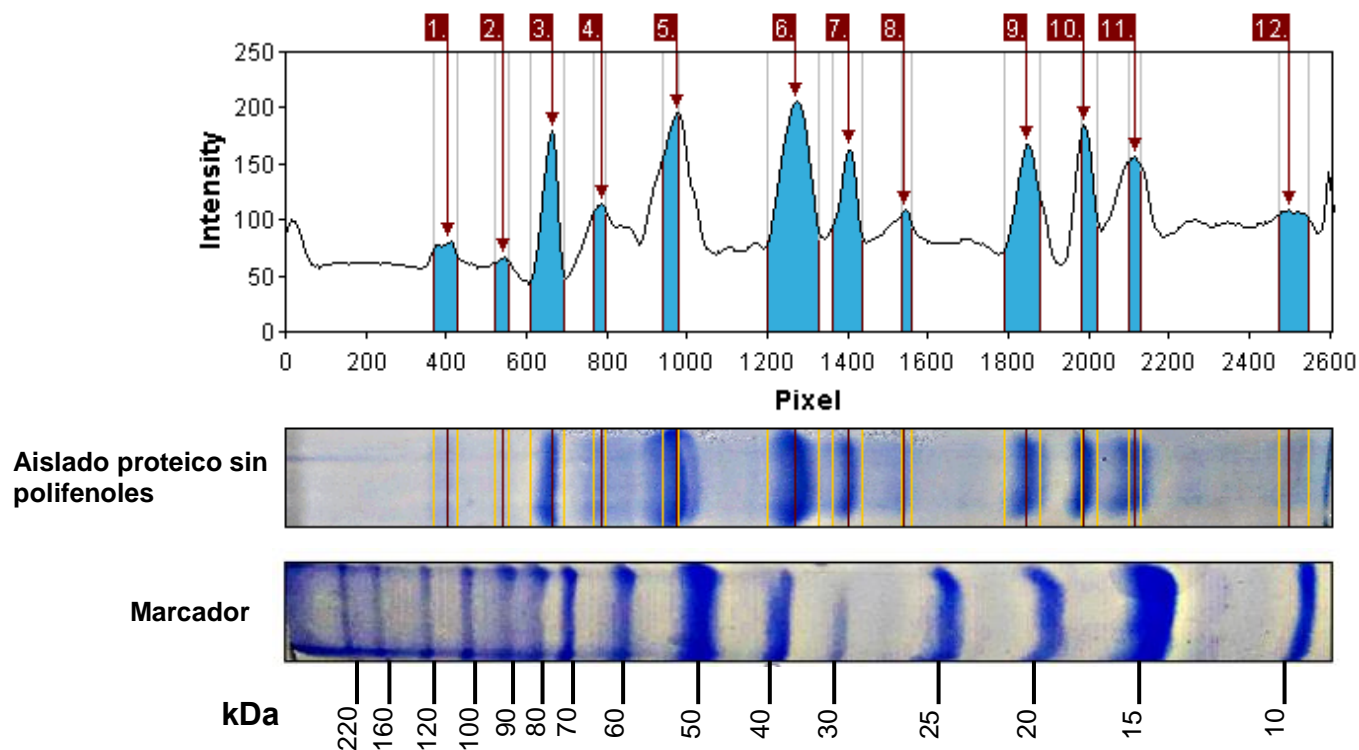


**Figura 8.** Proteínas identificadas mediante el software GelAnalyzer 19.1 en el perfil electroforético de harina de haba cocida

**Tabla 17.** Peso molecular (kDa) de las proteínas identificadas mediante SDS-PAGE en el aislado proteico sin polifenoles

Aislado proteico sin polifenoles		
Banda	R <sub>f</sub> <sup>a</sup>	Peso molecular (kDa)
1	0.15	107
2	0.197	85
3	0.238	70
4	0.286	56
5	0.36	41
6	0.463	29
7	0.51	25
8	0.558	22
9	0.653	19
10	0.697	17
11	0.736	16
12	0.898	15

<sup>a</sup>Se define como la distancia (mm) de migración de la proteína a través del gel dividida por la distancia de migración del frente del colorante. La distancia debe medirse desde la parte superior del gel de resolución hasta la banda de interés.

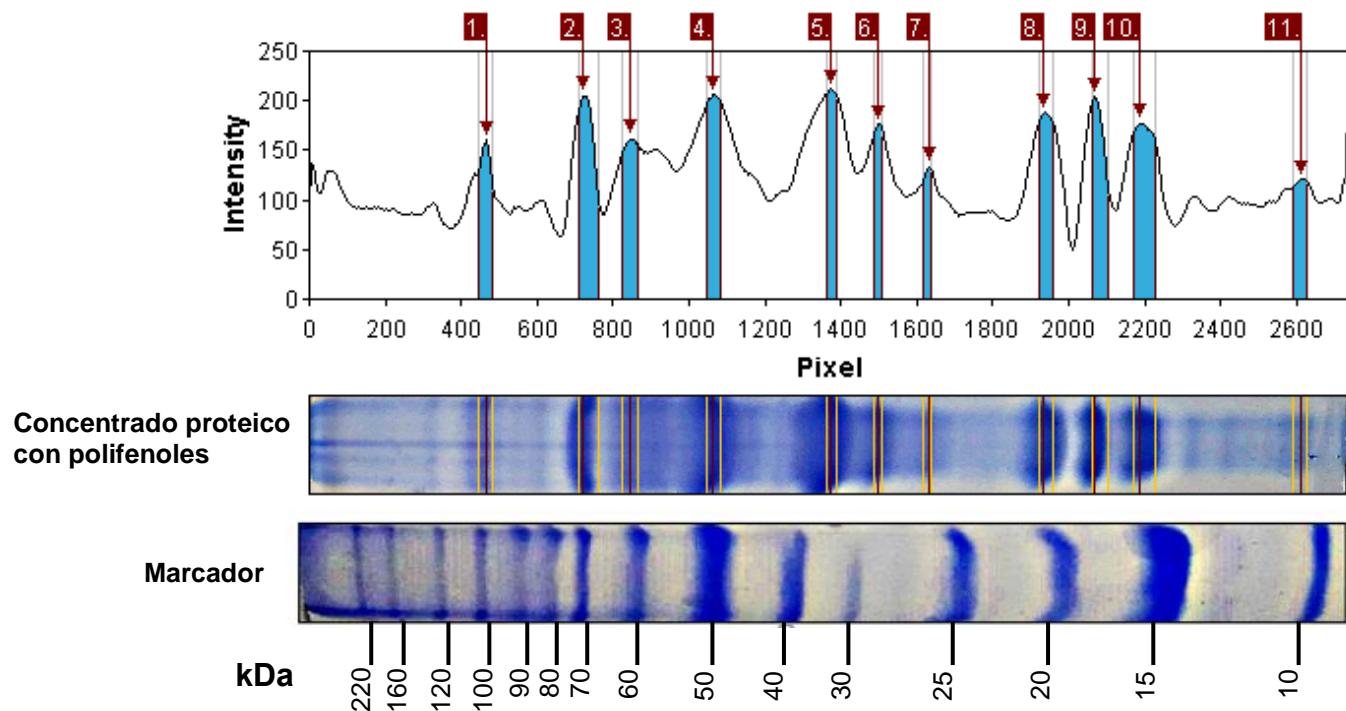


**Figura 9.** Proteínas identificadas mediante el software GelAnalyzer 19.1 en el perfil electroforético de harina de aislado proteico sin polifenoles

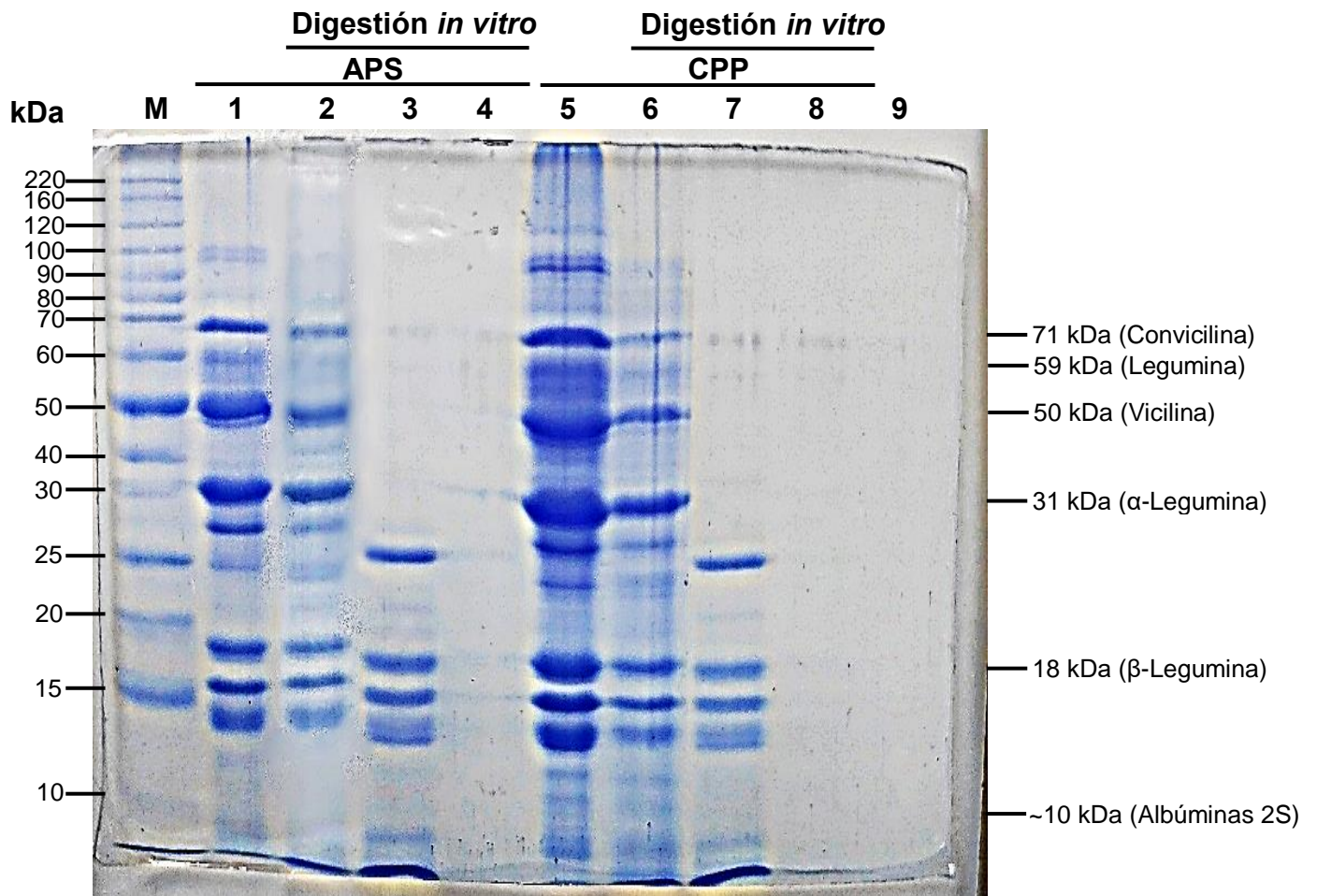
**Tabla 18.** Peso molecular (kDa) de las proteínas identificadas mediante SDS-PAGE en el concentrado proteico con polifenoles

Concentrado proteico con polifenoles		
Banda	R <sub>f</sub> <sup>a</sup>	Peso molecular (kDa)
1	0.156	107
2	0.238	70
3	0.281	57
4	0.36	41
5	0.501	26
6	0.558	22
7	0.593	21
8	0.671	18
9	0.705	17
10	0.736	16
11	0.932	14

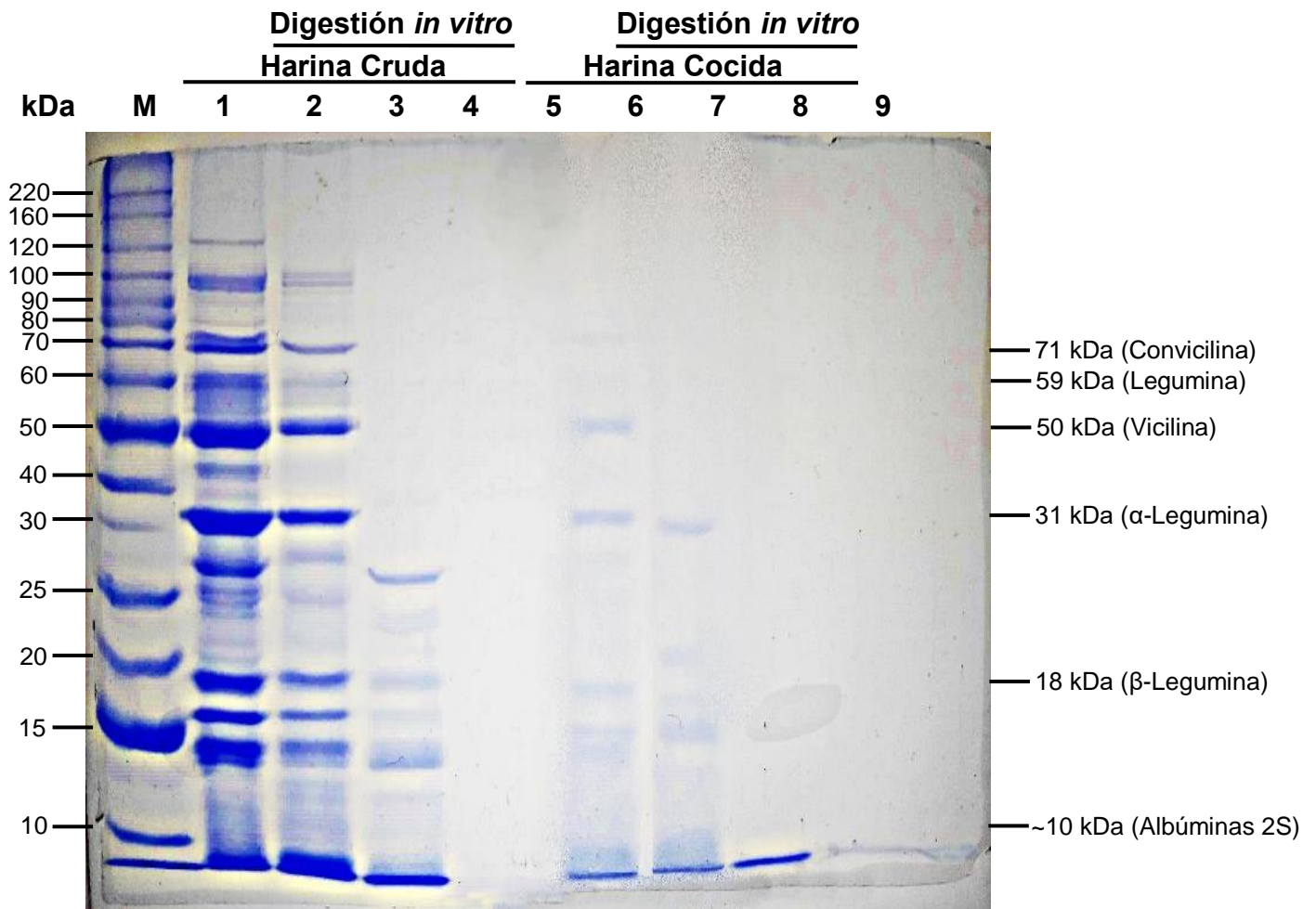
<sup>a</sup>Se define como la distancia (mm) de migración de la proteína a través del gel dividida por la distancia de migración del frente del colorante. La distancia debe medirse desde la parte superior del gel de resolución hasta la banda de interés.



**Figura 10.** Proteínas identificadas mediante el software GelAnalyzer 19.1 en el perfil electroforético de harina de concentrado proteico con polifenoles



**Figura 11.** Perfil electroforético por peso molecular de las proteínas de APS y CPP de haba sometidas a una digestión *in vitro* determinadas por SDS-PAGE. Carriles: M: Marcador de peso molecular; 1: APS; 2: APS fase gástrica, 3: APS fase intestinal, 4: APS bioaccesible, 5: CPP, 6: CPP fase gástrica, 7: CPP fase intestinal, 8: CPP bioaccesible y 9: blanco de enzimas digestivas.



**Figura 12.** Perfil electroforético por peso molecular de fracción proteica de harina cruda y harina cocida de haba sometidas a una digestión *in vitro* determinadas por SDS-PAGE. Carriles: M: Marcador de peso molecular; 1: HaCr; 2: HaCr fase gástrica, 3: HaCr fase intestinal, 4: HaCr bioaccesible, 5: HaCo, 6: HaCo fase gástrica, 7: HaCo fase intestinal, 8: HaCo bioaccesible y 9: blanco de enzimas digestivas.

## 6.8 Evaluación de parámetros nutricionales:

### 6.8.1 Determinación cromatográfica líquida de alto rendimiento de aminoácidos libres de las muestras, Aminoácido esencial limitante, Puntuación de aminoácidos esenciales, Puntuación de aminoácidos corregida por la digestibilidad de las proteínas *in vitro* e Índice de eficiencia proteica calculado

Se utilizó la cromatografía líquida de alta presión (HPLC por sus siglas en inglés) para la determinar la concentración de 15 AA contenidos en las muestras. Los resultados se muestran en la (Tabla 19). De los 15 AA determinados, la harina de haba cocida presentó mayor concentración en 7 AA, seguido del ASP en 5 AA, seguido del CPP en 2 AA y finalmente la harina de haba cruda solo mostró mayor cantidad en uno de los AA cuantificados.

En la harina de haba cocida 6 de los 7 AA (alanina, fenilalanina + tirosina, isoleucina, Met + Cys, tirosina y valina) con mayor concentración pertenecen a los AA apolares (hidrofóbicos). Mientras que en ASP 3 de los 5 AA (ác. aspártico, ác. glutámico y treonina) con mayor concentración pertenecen a la categoría de los apolares (hidrofílicos), además, dos de estos contienen ácidos carboxílicos en sus cadenas laterales.

La proteína total (%) determinada por HPLC fue diferente para todas las muestras, el ASP mostró el mayor porcentaje, seguido del CPP, harina cocida y finalmente la harina cruda, además, estos resultados varían a los antes presentados por el método de combustión Dumas. Entre los AA determinados, el aminoácido esencial limitante en las cuatro muestras pertenece a los AA azufrados (Met + Cys). La EAAS aumentó en la harina de haba sometida al proceso de cocción respecto a la cruda (0.61 contra 0.78), y la menor puntuación la mostró el ASP (0.44). La PDCAAS-IV (%) fue estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ) en todas las muestras, la mayor puntuación fue en la harina cocida con alrededor del 73%, y para la harina cruda a pesar de tener una EAAS mayor que ASP y CPP, su PDCAAS-IV fue el menor de todas las muestras analizadas (<20%). Esto sugiere que el tratamiento térmico aumenta significativamente la PDCAAS-IV en la muestra analizadas de harina de haba. El ASP y CPP mostraron PDCAAS-IV cercanas a 34 y 38%, respectivamente, siendo estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ). En cuanto al Índice de eficiencia proteica estimado el valor más alto se presentó en el ASP, seguido del CCP, seguido de la harina de haba cocida y finalmente la harina de haba cruda, con valores de 2.15, 2.11, 1.75 y 1.43, respectivamente.

**Tabla 19.** Comparación del perfil de aminoácidos y parámetros nutricionales de harina cruda, harina cocida, aislado proteico y concentrado proteico con polifenoles.

Aminoácido (g/100 g proteína) <sup>a</sup>	Harina cruda	Harina cocida	ASP	CPP	FAO 2013 <sup>b</sup>
Alanina	3.25	3.54	3.19	3.26	-
Arginina	2.82	2.96	2.21	2.72	-
Ác. Aspártico	5.78	6.17	6.70	6.20	-
Fenilalanina + Tirosina	8.60	10.46	8.68	8.61	4.1
Glicina	5.38	5.57	6.11	6.07	-
Ác. Glutámico	11.53	14.06	14.96	13.02	-
Histidina	18.44	15.81	13.95	11.90	1.6
Isoleucina	2.67	3.19	2.96	2.99	3.0
Leucina	5.36	6.32	6.81	6.72	6.1
Lisina	6.04	6.01	5.98	6.43	4.8
Met + Cys	1.41	1.81	1.02	1.21	2.3
Serina	2.80	2.77	3.19	3.27	-
Treonina	15.29	9.16	16.60	15.87	2.5
Triptófano	-	-	-	-	0.66
Valina	2.72	3.26	3.08	3.19	4.0
Proteína total (%) <sup>c</sup>	28.23	32.96	93.35	74.79	
AA esencial limitante	Met + Cys	Met + Cys	Met + Cys	Met + Cys	
EAAS (limitantes)	0.61	0.78	0.44	0.53	1
*DPIV (%)	31.34 ± 1.40 <sup>a</sup>	94.15 ± 2.45 <sup>b</sup>	77.73 ± 2.26 <sup>c</sup>	71.09 ± 1.69 <sup>d</sup>	
*PDCAAS-IV (%) <sup>d</sup>	19.12 ± 0.86 <sup>a</sup>	73.44 ± 1.92 <sup>b</sup>	34.20 ± 0.99 <sup>c</sup>	37.68 ± 0.90 <sup>d</sup>	
E-PER	1.43	1.75	2.15	2.11	

Determinación de aminoácidos libres con cromatografía líquida de alta presión realizada a través de un servicio externo. ASP = Aislado proteico sin polifenoles, CPP = Concentrado proteico con polifenoles, EAAS = Puntuación de aminoácidos esenciales, DPIV = Digestibilidad proteica *in vitro*, PDCAAS-IV = Puntuación de aminoácidos corregida por la digestibilidad de las proteínas *in vitro*. <sup>a</sup>Composición en base seca; <sup>b</sup>Requerimiento de aminoácidos para niños de 3 a 10 años de edad según la FAO, 2013; <sup>c</sup>Determinación de aminoácidos libres con cromatografía líquida de alta presión realizada a través de un servicio externo; <sup>d</sup>PDCAAS-IV (%) = DPIV (%) × EAAS, E-PER = Índice de eficiencia proteica estimado. Prueba ANOVA de un factor y Tukey como prueba *post hoc*. Letras en superíndice diferentes en la misma fila indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). \*Determinación por triplicado ( $n=3$ ).

## VII Discusión

### 7.1 Rendimiento de la extracción proteica de harina cruda

El rendimiento de extracción proteica es un importante parámetro a tomar en cuenta para promover el uso de una proteína de origen vegetal. El haba es una semilla con potencial a ser usada como fuente de proteína alternativa de origen vegetal debido a sus propiedades y características ya mencionadas anteriormente. La fracción proteica de haba puede ser obtenida por diferentes métodos, lo que puede influir en sus propiedades estructurales y funcionales, y como resultado afectar la concentración proteica final (Bühler *et al.*, 2020).

El rendimiento se vio significativamente afectado (Tabla 8) cuando se realizó la extracción de polifenoles con una solución acetona-agua, disminuyendo de 22.23% a 16.70%, sin embargo, la concentración de proteína aumentó significativamente (de 84.37% hasta 94.39%) debido a la mayor extracción de compuestos no proteicos. En este estudio el ASP presentó un color blanco a diferencia del CPP que presentó un color más oscuro y pardo, es probable que los polifenoles sean responsables del oscurecimiento en preparaciones de harina y aislados de proteínas, debido a la oxidación a quinonas coloreadas. Este problema se evitó mediante la extracción de polifenoles de la harina desengrasada y el uso de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> durante la fase alcalina para evitar la oxidación de los polifenoles residuales (Vioque *et al.*, 2012).

En otro estudio de Hernández-García *et al.*, (2016) se reportó un mayor rendimiento de extracción (36%), con una eficacia de extracción proteica del 92%, debido a una mayor recuperación proteica gracias al empleo de más fuerza *g* (15,000 *g*) durante la centrifugación en la fase alcalina (pH 10.5) y precipitación ácida (pH 4) logrado mayor sedimentación y como resultado una mayor recuperación, además de no utilizar tratamientos térmicos durante la extracción. En el mismo estudio se encontró que tratamientos térmicos cercanos a 72.80°C alteran la estructura conformacional de las proteínas del haba, afectando la solubilidad y en efecto el rendimiento de extracción. Por lo anterior, la solubilidad proteica a través de la modificación del pH es crucial para la separación durante la extracción proteica. Karaca *et al.*, (2011) utilizaron diferente pH a los antes mencionados en la fase alcalina y precipitación ácida, pH 9.5 y pH 4.5, respectivamente, y obtuvieron una menor concentración proteica (84.14%), a pesar de esto, la concentración es similar a la obtenida bajo las mismas condiciones en este estudio en el CPP (84.37%) (Tabla 8). Además, Karaca *et al.*, (2011) comparó la extracción proteica



empleando el punto isoeléctrico contra la extracción salina, y encontró que esta última disminuye ~3% la concentración proteica.

Las interacciones proteína-solvente están influenciadas por factores como pH, fuerza iónica, temperatura, tipo de solvente y por procesamiento (tratamientos de extracción o post-extracción). El pH es particularmente crucial en la elaboración de un aislado proteico, ya que el grado de precipitación proteica depende del pH. Se ha reportado en diversos estudios que el pH 10.5 en la fase alcalina favorece la solubilidad en gran parte de las proteínas, permitiendo recuperar la mayor cantidad de estas en el sobrenadante, seguido de la precipitación ácida con el punto isoeléctrico a pH 4, el cual ya ha sido bien establecido por diferentes autores (Rosa-Sibakov *et al.*, 2018). La ligera modificación de los pH antes mencionados puede perjudicar la extracción y el rendimiento proteico final, como lo reportado en el trabajo de Yang *et al.*, (2018), utilizaron un valor de pH 11 en la fase alcalina, para la fase ácida pH 4.5, y centrifugaciones a 8,000 g por 15 min, a pesar de emplear un mayor tiempo en la centrifugación y no usar tratamientos térmicos obtuvieron una concentración de 76% (cuantificada por método Dumas) en su extracción proteica.

Se ha demostrado que el calentamiento tiene un efecto negativo sobre la solubilidad de las proteínas en la harina de haba. La desnaturalización durante el proceso de extracción y secado puede ser responsable de una menor solubilidad. Por lo anterior, es preferible evitar tratamientos térmicos en la extracción proteica, Puruncajas Panta, (2017) comparó dos métodos de extracción reportando un rendimiento de 13.34% y 4.41% , para liofilización y secado en calor (spray dryer), respectivamente, donde incluso evaluó el rendimiento a diferentes pH y en todos se observó un rendimiento superior por liofilización. Además, Colca Stelman, (2014) evaluó la solubilidad proteica del haba a diferentes temperaturas durante diferentes periodos de tiempo, encontrando que la solubilidad proteica del haba cruda es cercana al 94.03%, mientras que cuando aplicaba calor (130°C por 30 min) disminuía hasta un 67.98%, lo que sugiere que la solubilidad de la proteína de haba podría disminuir de forma lineal con la aplicación de calor conforme se incrementa el tiempo.

La solubilidad es un parámetro esencial que debe ser considerado durante la manipulación de las proteínas, ya que favorece el proceso de extracción, ayudando a conservar las propiedades funcionales, sensoriales y la estabilidad del producto final. Se ha visto que tratamientos térmicos para desengrasar, pueden afectar la estructura de las proteínas disminuyendo la solubilidad, el grado de pureza y rendimiento de extracción. Almazán-Rodríguez *et al.*, (2016) compararon tres métodos de desengrasado para la elaboración de

aislados proteicos, y concluyeron que el mejor proceso de desengrasado fue la maceración con hexano. Los métodos Soxhlet y microondas, tras un análisis microscópico se apreció que las proteínas presentaron deformidad en la microestructura y gránulos dispersos debido al disgregado por el efecto térmico.

En este estudio, la menor concentración proteica obtenida en el CPP frente al ASP es debido a las interacciones de polifenoles con proteínas que pueden provocar la formación de complejos solubles o insolubles. Los polifenoles son afines a sitios principalmente donde se encuentran los residuos aromáticos. Como resultado de las interacciones hidrófobas, se produce el acoplamiento de la molécula de polifenol, y en sus proximidades, se forman enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo fenólicos y los grupos polares de las proteínas (grupos amino, hidroxilo y carboxilo), por lo que las características de polifenoles como de proteínas afectan la eficacia de la precipitación, y así mismo, el rendimiento de extracción (Frazier *et al.*, 2010; Kosińska *et al.*, 2011).

## **7.2 Análisis proximal de harinas y aislado proteico**

El haba ha sido un alimento básico durante mucho tiempo, y es apreciado por sus características nutricionales. Además de su alto contenido en proteínas y CHO, también es rica en fibra, vitaminas y minerales. En este estudio se utilizaron semillas de haba madura y seca del área rural de Puebla, la cual fue analizada (Tabla 9) según los métodos oficiales de la Asociación de Comunidades Analíticas (AOAC International, 2019).

El contenido de nutricional del haba varía según las condiciones de cultivo y la variedad de semilla. Los parámetros evaluados en la harina de haba cruda en este estudio son similares a los reportados por la U.S.D.A., (2019) (Tabla 3), con excepción de humedad, (3.34% contra ~11%), y fibra (1.89 contra 25%), respectivamente. En cuanto a la humedad, se sabe que cada variedad de semilla de haba posee diferencias debido a factores climatológicos, como temperatura, duración de la luz solar, humedad ambiental, entre otros, además, los tratamientos post cosecha de secado para todo el proceso de comercialización. En un estudio analizaron 10 variedades diferentes con origen de distintas regiones encontrando que la humedad puede variar desde 7.38 a 9.55% (Maya Ocaña, 2009). Respecto a la fibra, es de precisar que existen varios métodos gravimétricos para esta determinación, como fibra cruda, fibra ácido detergente, fibra neutro detergente, entre otros. En el presente estudio se analizó la fibra cruda, la cual constituye un 20 – 50% de la fibra dietética total, ya que disuelve la mayor parte de la hemicelulosa y lignina, una cantidad considerable de celulosa y elimina toda la fibra soluble, debido al tratamiento subsecuente

de ácidos y álcalis, por lo que infravalora la cantidad real de fibra dietética total (Grossi & Ohaco, 2010). Colca Stelman, (2014) compararon la fibra cruda de la harina de haba sin tratamiento, otra sometida a 120°C por 20min y 130°C por 15 min, reportando 1.33, 1.22 y 1.29%, respectivamente, lo cual es consistente con nuestros resultados, incluyendo la harina de haba cocida donde se observa una disminución de fibra y extracto libre de N después del tratamiento térmico, el resto de los parámetros no mostró cambios importantes en estas dos muestras.

El ASP mostró una concentración proteica de 94.39%, la cual es comparable con las reportadas en otras leguminosas como soya (89.7%), frijol rojo (89.3%), frijol rojo (red kidney bean) (92.2%), frijol mungo (93.9%), frijol negro (88.21%) y garbanzo (89.9 – 94.4%) (Kaur & Singh, 2007; Kudre *et al.*, 2013; Tang, 2008). En relación a lo anterior, Vogelsang-O'Dwyer *et al.*, (2020) realizaron una comparación entre harina de haba enriquecida y un aislado proteico de haba, la concentración proteica obtenida fue de 64.1 y 90.1%, respectivamente. Estos datos apoyan los resultados obtenidos en nuestro ASP y CPP con la misma técnica de extracción, el punto isoeléctrico. Cabe recalcar, que el ASP de nuestro estudio mostró <0.1% de fibra cruda ni extracto libre de N, a diferencia de otros estudios donde no se logró eliminar, lo que sugiere un buen método de extracción proteica en nuestro estudio. Como se ha mencionado, la variedad de haba puede influir en la variación de la concentración proteica, en un análisis realizado por Singhal *et al.*, (2016) donde elaboró aislados proteicos con 7 genotipos diferentes de haba, con más de 21 muestras de distintas regiones, reportó una variación hasta del 9% en la concentración proteica de las muestras, además, a diferencia de nuestro estudio, reportaron mayores cantidades de cenizas (~5%) en todas las muestras.

En el CPP se vio una menor concentración de proteína, esto debido a que no se retiraron los polifenoles. Las interacciones de polifenoles con proteínas pueden resultar en la formación de complejos solubles o insolubles, este fenómeno puede afectar la extracción proteica y la concentración obtenida (Kosińska *et al.*, 2011). Además, se logró cuantificar una pequeña porción del extracto libre de N, a diferencia del ASP, esto justifica la menor concentración proteica debido a una menor purificación en la extracción.

Es importante mencionar el ligero incremento en la cuantificación proteica de la harina cocida después de someter el haba a un tratamiento térmico. Este resultado podría ser debido a la aplicación de energía térmica ocasionando desplegamiento de las proteínas, así como la de otros compuestos no proteicos (glucósidos) que interfieren en la

cuantificación proteica. El haba contiene complejos proteicos como legumina, convicilina y vicilina, en los cuales sus glucósidos, especialmente vicina, convicina, divicina e isouramilo, podrían interferir en la cuantificación proteica. Sin embargo, después del tratamiento térmico el contenido residual de vicina y convicina representa menos del 1% del contenido en la harina original (Vioque *et al.*, 2012). A pesar de esto, se ha reportado lo contrario, donde el contenido proteico se ha visto disminuido significativamente desde 1 hasta 6% en 10 diferentes variedades de haba después de un proceso tostado a 120°C durante 10 min (Maya Ocaña, 2009). Estas discrepancias podrían estar relacionadas con los métodos de cuantificación proteica, ya que en el primer estudio se utiliza el método Dumas a través del equipo LECO, y en el segundo utilizan Kjeldahl, ambos con un factor de N del 6.25.

### **7.3 Determinación de digestibilidad proteica *in vitro***

La digestibilidad proteica es un indicador importante de calidad nutricional, el cual está influenciado por el perfil de AA que conforman la fracción proteica e interaccionan con la matriz alimentaria. Aunque la estructura de las proteínas es una propiedad que no se aborda actualmente en la evaluación de la calidad de las proteínas, las características estructurales y fisicoquímicas son críticas para la digestión *in vivo* de las proteínas de origen vegetal. Se ha encontrado que varias proteínas vegetales presentan una alta resistencia a la proteólisis en el tracto gastrointestinal debido a propiedades estructurales específicas.

La Tabla 10 muestra la digestibilidad proteica después de haber sometido las muestras a una digestión enzimática *in vitro*, la harina de haba cruda presentó el más bajo porcentaje de digestibilidad proteica (31.34%). Está bien establecido que en el haba cruda la digestibilidad proteica es baja. Entre los factores que influyen están los relacionados con la estructura y su interacción intermolecular con la matriz alimentaria. La interacción de las proteínas del haba con otros componentes de las semilla, especialmente los factores antinutricionales (taninos, ácido fítico, inhibidores de proteasas y proteínas antigénicas), reducen o inhiben su digestibilidad, y sus cantidades difieren según la variedad de la semilla (Ohanenye *et al.*, 2020). En relación al ácido fítico, se ha establecido que la disminución de la digestibilidad de las proteínas se correlaciona negativamente con el contenido de ácido fítico de las leguminosas durante la digestión (Rosa-Sibakov *et al.*, 2018). A pesar de lo anterior, se han reportado valores superiores de digestibilidad a los obtenidos en este estudio, Luo & Xie, (2013) evaluaron semillas de haba cruda con cáscara verde o blanca cultivadas en la provincia de Jiangsu, y obtuvieron una digestibilidad proteica *in vitro* de 72.65 y 73.28%, respectivamente. En cambio, la aplicación de tratamientos térmicos como

la cocción ordinaria o mediante autoclave, con remojo y descascarillado previo, disminuían de manera significativa los factores antinutricionales como taninos, ácido fítico y actividad inhibitoria de la tripsina aumentando considerablemente la digestibilidad proteica *in vitro* hasta 85.30 y 81.47%, en haba verde y blanca, respectivamente.

A pesar de lo anterior, cabe recalcar que los datos reportados no son del todo equiparables con los obtenidos en este estudio, debido a que en éste, se utilizó el protocolo de digestión *in vitro* estandarizado basado en un consenso internacional desarrollado por la red COST INFOGEST, seguido de la centrifugación de las muestras y finalmente la cuantificación proteica en el sobrenadante, mientras que Luo & Xie, (2013) utilizaron un método multienzimático propuesto por Hsu *et al.*, (1977) donde la digestibilidad proteica se cuantifica con una ecuación de regresión lineal relacionada al cambio de pH. En otro estudio con metodología similar a la de este estudio reportó 66.9% de digestibilidad proteica *in vitro* de haba cruda (Çalışkantürk Karataş *et al.*, 2017), sin embargo durante el proceso de digestión *in vitro* se usa un tratamiento térmico por 20 min, lo que pudiera incrementar la digestibilidad al doble de lo reportado en este estudio.

La harina de haba cocida mostró la mayor digestibilidad proteica *in vitro* (94.15%). Este aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) después del tratamiento térmico, podría deberse a la desnaturalización de la proteína, la destrucción del inhibidor de la tripsina o la reducción de otros factores antinutricionales como taninos y polifenoles, que interactúan con la proteína para formar complejos. Abdel-Aleem *et al.*, (2019) evaluaron la digestibilidad proteica del haba con diferentes muestras; semillas crudas y remojadas por 14 h con cocción a 100°C, obteniendo 70.35 y 87.29% de digestibilidad, respectivamente. En su estudio utilizó un fundamento similar al nuestro para cuantificar la digestibilidad, el cual consistió en centrifugar las muestras digeridas y cuantificar el N del sedimento y el sobrenadante. Los resultados reportados son cercanos a los reportados en este estudio para el haba cocida (94.15 y 87.29%). Sin embargo, cabe recalcar que en este estudio se utilizó una temperatura mayor de cocimiento, por lo cual podría aumentar la digestibilidad proteica. Esto se ha visto en otras leguminosas como el espelón (*Vigna unguiculata*), donde el tratamiento de cocción en autoclave aumentó la digestibilidad proteica hasta en un 90.3% (Boye *et al.*, 2012), lo que apoya a los resultados obtenidos en nuestro estudio.

Es de esperar que la digestibilidad proteica de las leguminosas aumente con la aplicación de tratamientos que eliminen los factores antinutricionales, esto se ha visto incluso en otras leguminosas. En concentrados proteicos de frijol, la cocción a 100°C por 60 min aumentó

significativamente la digestibilidad proteica *in vitro* calculada por el tamaño de partícula, de 49.80 a 63.61% (López Ibarra, 2018). Lo anterior es apoyado por diversos autores que concuerdan que la digestibilidad del frijol crudo varía entre 25 a 60%, mientras que cocidos aumenta de 65 hasta 85% dependiendo de la variedad y del método de cocción utilizado (Camacho Espinoza *et al.*, 2010). En otro estudio Rui *et al.*, (2016) evaluaron la digestibilidad proteica *in vitro* de un aislado proteico de soya con más del 90% de concentración proteica, utilizando el método multienzimático propuesto por Hsu *et al.*, (1977), reportando una digestibilidad *in vitro* de 85.69 a 90.45%. Estas variaciones notables entre diferentes leguminosas son debido al patrón de degradación de las globulinas desnaturalizadas de diferentes especies de leguminosas, por ejemplo la faseolina (globulina 7S) de *Phaseolus vulgaris* es digerida con menos facilidad por varias proteasas en estado desnaturalizado que en estado nativo, a diferencia de la vicilina (globulina 7S) de chícharo (*Pisum sativum*), la glicinina (globulina 11S) y la  $\beta$ -conglucina (globulina 7S) de soya (*Glycine max*) que son digeridas con mayor facilidad (Carbonaro *et al.*, 2015).

El ASP mostró una digestibilidad *in vitro* de 77.73%, mientras que en el CPP fue significativamente ( $p < 0.05$ ) más baja 71.09%. Las proteínas de las leguminosas se encuentran en matrices de semillas con otros componentes químicos, como polisacáridos y polifenoles, que dificultan la digestibilidad de las proteínas (Ohanenye *et al.*, 2020). Esto es consistente con nuestros resultados, ya que la extracción de polifenoles en el ASP aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) ~6% la digestibilidad. Le Roux *et al.*, (2020) comparó la digestibilidad a través de una digestión dinámica *in vitro* de dos concentrados proteicos de haba y chícharo sin polifenoles, reportando una digestibilidad proteica *in vitro* de 91.1 y 74.9%, respectivamente. En su estudio, calcularon el grado de hidrólisis proteica a través de la cuantificación de aminos primarios liberados durante la digestión. Es concluyente que la eliminación y purificación proteica contribuye de manera positiva en la digestibilidad proteica, sin embargo los métodos térmicos han demostrado ser superiores en mejorar la digestibilidad, dado que eliminan la mayor parte de los factores antinutricionales y desnaturalizan la estructura proteica nativa, además, métodos no térmicos como, germinación, fermentación, remojo y digestión enzimática microbiana han demostrado su potencial en el aumento significativo de la digestibilidad proteica y el valor nutricional de las leguminosas (Ohanenye *et al.*, 2020).

Se ha comparado la digestibilidad y la estructura secundaria de las proteínas de leguminosas crudas y tratadas térmicamente por Carbonaro *et al.*, (2012), y se observó que la fracción proteica del haba presenta una mayor digestibilidad a diferencia de la faseolina

del frijol, debido a que esta última tiene una estructura más estable que la vicilina del haba en el estado nativo. La estabilidad está en función contenido en la estructura secundaria de la hoja  $\beta$ , en faseolina alrededor del 50% y en vicilina alrededor del 30%. Mientras que, en la faseolina se produce la ruptura de la estructura cuaternaria solo con el calentamiento, en la vicilina el contenido de hojas  $\beta$ -vicilina aumenta mediante tratamiento térmico a costa de hélice  $\alpha$  y giros  $\beta$ . Además, en un estudio posterior Carbonaro *et al.*, (2015), han sugerido que el aumento de la estructura de la hoja  $\beta$  reduce la susceptibilidad a la proteólisis de la vicilina. Es evidente que la estructura de las proteínas de las semillas de leguminosas se caracteriza por un alto contenido en la conformación de la hoja  $\beta$  y una cantidad relativamente baja en la hélice  $\alpha$ . En general, se ha observado una disminución en la digestibilidad de las proteínas de semillas de leguminosas después de un proceso térmico severo. Sin embargo, los extractos ricos en vicilina de diferentes especies de *Phaseolus* difieren en sus patrones de agregación y digestibilidad, debido a la existencia de varios tipos de faseolina, con una composición de subunidades diferente.

El tratamiento térmico en el haba provoca una desnaturalización abriendo la estructura de la proteína, haciéndola más accesible para las enzimas hidrolíticas y, por lo tanto, aumenta la digestibilidad de la proteína. Al mismo tiempo, la desnaturalización de las proteínas también expone fracciones hidrófobas de las proteínas que de otro modo estarían protegidos del entorno acuoso. El efecto hidrofóbico, paralelo con otras interacciones que se habilitan repentinamente debido a los cambios conformacionales, eventualmente conducirá a la agregación de proteínas y a la disminución de la digestibilidad (Joye, 2019).

La digestibilidad del haba respecto a otras leguminosas, se ha reportado que también está en función al contenido de albúminas, debido a que esta fracción proteica de los alimentos vegetales tiene alto contenido de Cys. La fracción de albúmina suele ser muy resistente a la desnaturalización por calor y la digestión enzimática con tripsina, quimotripsina y pepsina (Warsame *et al.*, 2020). La estabilidad es conferida por la presencia de un alto número de enlaces disulfuro contenidos en proteínas de BPM. En el haba, la fracción de albúmina se encuentra <20% de la proteína total, lo cual justifica su bajo contenido en AA azufrados (Met y Cys) y su digestibilidad proteica superior a algunas otras leguminosas.

#### **7.4 Bioaccesibilidad y cinética de liberación proteica de las muestras sometidas a la digestión *in vitro***

La bioaccesibilidad es un aspecto importante al momento de evaluar alimentos. Se define como la cantidad de un constituyente alimentario que está presente en el intestino, como

consecuencia de su liberación de la matriz del alimento y que esta potencialmente disponible para su absorción, la cual depende de la estabilidad del compuesto, las interacciones con otros componentes de los alimentos y la organización molecular del alimento.

En la Tabla 11 se muestra la bioaccesibilidad de las muestras. El CPP mostró la mayor bioaccesibilidad, sin embargo, no mostró diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ) con el ASP (33.19 y 29.85%, respectivamente). De igual manera para las muestras de harina de haba cruda y harina de haba cocida, donde la primera mostró la menor bioaccesibilidad, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) con la harina de haba cocida (16.43 y 20.47%, respectivamente). La proteína bioaccesible de las muestras se analizó a través de electroforesis (SDS-PAGE), y mediante el análisis de las bandas a través del software GelAnalyzer 19.1. Se observó que las proteínas bioaccesibles correspondían a proteínas de BPM (<15 kDa) (Figuras 11 y 12). Un modelo de bioaccesibilidad *in vitro* es una estrategia eficaz y válida para comprender los cambios estructurales de los alimentos ingeridos en condiciones fisiológicas simuladas en el tracto gastrointestinal humano, diversos autores para establecer el potencial nutraceutico de diversos compuestos bioactivos del haba (Lin *et al.*, 2019).

En cuanto a la fracción proteica del haba hay pocos estudios sobre su bioaccesibilidad *in vitro*, ya que la mayoría de los estudios disponibles se enfocan en la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos, y en relación a la fracción proteica la mayoría evalúa la digestibilidad. Sin embargo, en los últimos años se ha surgido interés por los Pb que surgen a través de la proteólisis por diferentes métodos. Xing *et al.*, (2017) evaluaron el efecto del pH de la fermentación sobre la bioaccesibilidad de las proteínas de cuatro cuajadas de soya, después de la digestión gastrointestinal *in vitro* se llevó a cabo la bioaccesibilidad utilizando una membrana de celulosa para diálisis con punto de corte de 10 kDa. En su trabajo se observó un incremento significativo de péptidos, de 0.71 mg/mL a 1.44mg/mL, de BPM (<10 kDa) conforme progresaba la digestión gastrointestinal, lo cual se confirmó a través de electroforesis (SDS-PAGE), estos resultados son similares a los obtenidos en nuestro estudio en la proteína dializada de harina de haba cocida. Sin embargo, se ha visto que estos resultados pueden diferir según la leguminosa analizada, debido a que estos péptidos de BPM y el grado de proteólisis alcanzado, depende de la estabilidad estructural de la proteína, y el método aplicado para la proteólisis lo que afecta no solo el grado de digestibilidad y bioaccesibilidad, sino también a la producción de secuencias bioactivas. De igual manera, en otros estudios que han evaluado proteínas de origen animal se han visto



resultados semejantes, donde una mayor digestibilidad proteica resulta en una elevada liberación de péptidos de BPM (Marcolini *et al.*, 2015).

Una digestión gastrointestinal *in vitro* no estandarizada entre los estudios publicados, podría hacer que los resultados no sean del todo equiparables. El método aplicado en la bioaccesibilidad también podría representar una importante variabilidad, ya que en el estudio antes mencionado se utilizó una membrana con punto de corte de 10 kDa por lo que es de esperar que los péptidos con mayor bioaccesibilidad sean aquellos con pesos moleculares <10 kDa, mientras que en nuestro estudio se utilizó un punto de corte de 12 – 14 kDa, motivo por el cual el análisis de las bandas de bioaccesibilidad (Figuras 8 y 9) a través del software GelAnalyzer 19.1 mostró proteínas bioaccesibles con peso molecular <15 kDa. Otro factor importante a tomar en cuenta es el método para cuantificar la proteína bioaccesible, en nuestro estudio se utilizó el método Scopes (1974) el cual utiliza la absorbancia del enlace peptídico a 205 nm, esta técnica muestra ventajas sobre otros métodos que presentan variabilidad debido a la composición de AA, mientras que en el estudio antes mencionado se utiliza el ensayo de Bradford con una longitud de onda a 595 nm, el cual se basa en la cuantificación de la unión del Azul de Coomassie a las proteínas, en este método las sustancias que podrían interferir interfieren son los detergentes y las soluciones básicas.

En un estudio previo con el objetivo de investigar los efectos de diferentes coagulantes sobre la degradación de proteínas y la liberación de péptidos de proteína de soya durante la digestión gastrointestinal, Rui *et al.*, (2016) reportaron una digestibilidad *in vitro* de la proteína de soya de 85.96 a 90.45%, la cual aumentaba la bioaccesibilidad de los péptidos <10 kDa, es decir, que a mayor digestibilidad proteica se obtenían mayor cantidad de péptidos bioaccesibles, debido a que una proteína en estado nativo tiene fuerte unión intra e intermolecular que podrían dificultar el proceso de hidrólisis de las enzimas digestivas, por lo que disminuye la liberación de péptidos de BPM. Para la bioaccesibilidad se utilizó una membrana con punto de corte de 10 kDa, por lo que los resultados mostraron péptidos bioaccesibles con peso molecular menor a 10 kDa, los cuales aumentaron significativamente conforme avanzaba la digestión gástrica a la fase intestinal, de 0.38 mg/mL a 1,03 mg/mL. Estos resultados apoyan a los obtenidos en nuestro estudio, donde en la fase gástrica no se observaban bandas con peso molecular <10 kDa, sin embargo, en la fase intestinal se lograron observar mayor cantidad de proteínas de BPM.

La proteína total liberada de las muestras analizadas se observa en la Figura 5. El ASP y CPP no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p>0.05$ ) relevantes, su liberación proteica total fue similar, con excepción durante los primeros 15 min. Por otra parte, la harina de haba cruda y la harina de haba cocida, mostraron diferencias significativas ( $p<0.05$ ) durante los primeros 60 min, sin embargo, después del min 75 no mostraron diferencias ( $p>0.05$ ), por lo que su liberación proteica total a los 120 min fue similar. Estos resultados podrían estar relacionados con el tipo de muestra y su matriz alimentaria, ya que se observaron valores estadísticamente similares para la harina cruda y cocida, así mismo para el ASP con el CPP. En cuanto a bioaccesibilidad y liberación proteica total, la harina de haba cruda y la harina de haba cocida no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p>0.05$ ), igualmente el ASP y el CPP tampoco mostraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ). La mayor bioaccesibilidad y liberación proteica total por parte del ASP y el CPP podría ser debido a una menor interacción con la matriz alimentaria, a consecuencia de su mayor grado de purificación, eliminando la mayor parte de los compuestos no proteicos, contrario a las harinas cruda y cocida que mostraron estadísticamente una menor ( $p<0.05$ ) bioaccesibilidad y liberación proteica total (Tablas 11 y 13) (Kosińska *et al.*, 2011).

A pesar de que el ASP y el CPP contienen más del doble de proteína que las harinas, no mostraron valores en función a esta proporción en su bioaccesibilidad y su liberación proteica total. Como se mencionó anteriormente, los factores antinutricionales afectan la digestibilidad proteica, por lo tanto, disminuyen su digestibilidad, afectando su bioaccesibilidad, y finalmente se ve reflejado en la tasa de liberación proteica. Lo anterior se ha visto incluso en matrices alimentarias diferentes, donde se ha evaluado la tasa de liberación de compuestos fenólicos, concluyendo que las interacciones con otros factores antinutricionales disminuyen la tasa de liberación de compuestos bioactivos (Perales-Vázquez *et al.*, 2020). En cuanto la velocidad de liberación promedio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p>0.05$ ) entre las harinas, al igual que entre el ASP y el CPP. La información en relación a este parámetro es relevante ya que puede usarse para evaluar los picos de absorción potenciales en ensayos *in vivo* adicionales.

Es importante recalcar, de acuerdo a estudios previos, que los péptidos de BPM bioaccesibles resultantes de una digestión *in vitro* reportados en este estudio, son potencialmente efectivos en la inhibición de la patogénesis del síndrome metabólico (Jakubczyk *et al.*, 2019), e incluso péptidos con peso molecular  $<3$  kDa presentan actividad antioxidante y antitumoral en diferentes líneas celulares (Kuerban *et al.*, 2020), además de

otros efectos fisiológicos beneficios ya mencionados. De acuerdo a la literatura estos péptidos son liberados de las proteínas alimentarias en el tracto gastrointestinal, los cuales son absorbidos y alcanzan la circulación sistémica para realizar actividades específicas a nivel sistémico (Samaei *et al.*, 2020) .

## 7.5 Electroforesis (SDS-PAGE)

Se evaluó el perfil electroforético de las muestras de haba sometidas a digestión *in vitro*, los resultados (Figuras 11 y 12) mostraron diferencias importantes en el número de proteínas presentes antes y después de la digestión *in vitro*. En las leguminosas las principales proteínas de almacenamiento son las globulinas oligoméricas, según sus coeficientes de sedimentación pertenecen a los dos grupos de proteínas 7S y 11S. Los primeros son trímeros de aproximadamente 150 kDa, estabilizados por interacciones hidrófobas, enlaces electrostáticos y de hidrógeno, mientras que las proteínas 11S son hexámeros de aproximadamente 450 kDa. En este último, las cadenas ácidas y básicas están asociadas por puentes disulfuro y tres dímeros se mantienen unidos por enlaces no covalentes. Tras el tratamiento térmico, las proteínas oligoméricas (globulinas 7S y 11S) se disocian en monómeros y se vuelven a agregar, (por ejemplo, en la proteína 11S), formando complejos de alto peso molecular estabilizados por interacciones hidrófobas, con la participación frecuente de enlaces disulfuro (Kimura *et al.*, 2008).

En la semilla de haba la mayoría de las proteínas que se encuentran son globulinas (convicilina, legumina y vicilina), alrededor del 70 al 78%, albúminas con un 10 al 20%, 15% son glutelinas y menos del 5% prolaminas. Las proteínas presentan diferentes características conformacionales, como resultado muestran distinta solubilidad, en soluciones salinas las globulinas son solubles, mientras que las albúminas son solubles en agua, además, otras proteínas presentes en menor cantidad como prolaminas y glutelinas, son solubles en agua-alcohol y soluciones ácidas o alcalinas, respectivamente (Langton *et al.*, 2020).

El perfil electroforético de la harina de haba cruda antes de la digestión *in vitro* mostró la presencia de 12 proteínas (Tabla 15) con peso molecular de 15 hasta 132 kDa. Las bandas visibles (Figura 11) a 71, 59 y 50 kDa corresponden a subunidades de las globulinas convicilina, legumina y vicilina, respectivamente. Las subunidades de las leguminas están compuestas por una cadena ácida ( $\alpha$ -legumina) y una básica ( $\beta$ -legumina) con peso molecular de 31 y 18 kDa, respectivamente, las cuales están unidas por un solo enlace disulfuro. Además, estas bandas también se pudieron observar en el ASP y CPP lo que

demuestra que los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con otras investigaciones (Bühler *et al.*, 2020; Vogelsang-O'Dwyer *et al.*, 2020). Sin embargo, en la Harina de haba cocida no se lograron apreciar bandas bien definidas. La banda a 59 kDa (legumina) se observó menos teñida en el ASP y CPP, esto indica una mayor disociación de la legumina en sus subunidades ácida y básica debido al tratamiento de extracción proteica. Los aislados proteicos de haba suelen estar más enriquecidos en globulinas, ya que la fracción de albúmina retiene la solubilidad alrededor del punto isoeléctrico de las globulinas, debido a ello, la Harina de haba cruda presenta mayor cantidad de albúmina, ya que no se sometió a ningún tratamiento de extracción proteica con el punto isoeléctrico (Vogelsang-O'Dwyer *et al.*, 2020).

La Harina de haba cocida obtuvo bandas poco perceptibles, en donde se detectaron solamente 4 proteínas con peso molecular de 15 a 45 kDa. Esto se debe por la aplicación de calor durante el proceso de cocimiento, que desnaturaliza la estructura de las proteínas modificando la solubilidad y como resultado, se recupera poca proteína con estructuras de BPM como tripéptidos, dipéptidos y AA. Esta alteración ya ha sido descrita por Căpriță *et al.*, (2010) en la soya, comprobando que la solubilidad y la integridad de la proteína está inversamente relacionada con el tratamiento térmico, se demostró que la solubilidad y la integridad de la proteína de la harina de soya cruda se acercaba al 100%, mientras que la aplicación de algún tratamiento térmico disminuía este valor drásticamente desde un 40 hasta un 30%. En este estudio se sometió a la semilla de haba a remojo durante 12 h y se cocinó a 121°C durante 15 min en autoclave, motivo por el cual es de esperar que no se aprecien bandas bien definidas en el corrimiento electroforético de la Harina de haba cocida.

Samaei *et al.*, (2020) evaluó la eficacia de la actividad proteolítica enzimática sobre la fracción proteica del haba, los resultados mostraron que las proteínas de alto peso molecular presentan mayor resistencia a ser hidrolizadas, no solo por su tamaño y estructura, sino también debido a su composición y asociación a algunos CHO. A pesar de lo anterior, en este estudio los resultados obtenidos mostraron mayor actividad proteolítica en las muestras de Harina de haba cruda y CPP. Esto podría ser por la menor concentración de proteína frente al ASP, sin embargo, es importante mencionar que la extracción proteica puede eliminar algunas bandas de proteínas dependiendo del método y solución empleada para la extracción de la fracción proteica Singhal *et al.*, (2016).

En cuanto a la bioaccesibilidad de la fracción proteica después de haberla sometido a una digestión *in vitro* (Figuras 11 y 12; carriles 4 y 8), el ASP y el CPP mostraron bandas de proteínas bioaccesibles <15 kDa. Está bien establecido que las proteínas con mayor bioaccesibilidad son péptidos con un BPM cercano a los 10 kDa, especialmente los péptidos con una longitud corta de 2 a 10 AA. Lo anterior, se ha reportado en otros estudios realizados por Rui *et al.*, (2016) y Xing *et al.*, (2017), donde evaluaron la bioaccesibilidad proteica de la soya a través de una digestión *in vitro* y métodos de diálisis, comprobando que los péptidos de BPM (<10 kDa) tienen mayor bioaccesibilidad que es claramente visible a través del análisis de SDS-PAGE, lo que apoya los resultados en este estudio. Sin embargo, cabe mencionar que puede haber ligeras discrepancias con otros estudios debido a que existen variaciones entre los genotipos de semilla de haba (Tahir, 2015), lo que diversifica las proteínas del haba cualitativa y cuantitativamente, de manera que existen proteínas que aún no están bien identificadas ni estudiadas en la literatura científica como lo reportó Warsame *et al.*, (2020). En definitiva, es importante recalcar que estos péptidos de BPM bioaccesibles son los que han reportado un importante potencial nutracéutico con diferentes efectos fisiológicos como protección de la salud cardiovascular, reducción de la inflamación y el riesgo de cáncer, control del peso y aumento de la sensibilidad a la insulina (Carbonaro *et al.*, 2015).

## **7.6 Evaluación de parámetros nutricionales**

La medición de la calidad de las proteínas suele ser inespecífica, es decir, con las proteínas la calidad depende de la cantidad de al menos 9 AA esenciales y del equilibrio entre los respectivos AA, de los que depende la utilización de la proteína. La calidad nutricional de las proteínas de las leguminosas depende en gran medida de los AA esenciales. Estos AA se denominan con frecuencia AA críticos, y el más deficiente en relación con la proteína estándar se denomina aminoácido limitante, en leguminosas suelen ser Trp y/o AA azufrados (Met y Cys), dependiendo de la especie. Como resultado, los diferentes métodos de evaluación de proteínas dan diferentes resultados para el valor nutritivo. En ese sentido, la cromatografía líquida de alta presión de derivados fluorescentes con OPA se ha utilizado ampliamente para el análisis de AA mediante cromatografía de intercambio iónico como una de las técnicas químicas más importantes para predecir la calidad de las proteínas. (Olu & Edeiran, 2015).

### **7.6.1 Determinación cromatográfica líquida de alto rendimiento de aminoácidos libres de las muestras, Aminoácido esencial limitante, Puntuación de aminoácidos esenciales, Puntuación de aminoácidos corregida por la digestibilidad de las proteínas *in vitro* e Índice de eficiencia proteica calculado**

El perfil de AA (Tabla 19) mostró cambios importantes en las muestras. La harina de haba cocida presentó una disminución de los AA polares, esto podría ser por el remojo antes de la cocción, y por el agua utilizada durante la cocción. Se sabe que la aplicación de calor modifica el contenido de AA, además, durante la cocción la matriz alimentaria está en contacto con el agua lo que pudo facilitar la lixiviación de AA solubles en agua. Esto podría explicar la mayor concentración de AA hidrofóbicos (alanina, fenilalanina + tirosina, isoleucina, Met + Cys, tirosina y valina) en la harina de haba cocida. Por otro lado, El ASP mostró una mayor concentración de AA polares (ác. aspártico, ac. glutámico y treonina) que contienen ácidos carboxílicos en sus cadenas laterales, lo cual podría ser debido a que la muestra no estuvo remojándose en agua, además, estos AA pudieron haber alcanzado una mayor concentración durante la extracción de polifenoles con acetona y la precipitación ácida. Con respecto a la composición de AA, algunos estudios han encontrado mayores concentraciones de AA esenciales después de la cocción, mientras que otros han encontrado concentraciones reducidas de Met, tirosina y treonina (Nosworthy *et al.*, 2018).

El aminoácido esencial limitante en todas las muestras fueron los AA azufrados (Met + Cys). La EAAS (limitantes) aumentó de manera importante con el tratamiento térmico de 0.61 (harina de haba cruda) hasta 0.78 (harina de haba cocida), el ASP y CPP obtuvieron los puntajes más bajos, 0.44 y 0.53, respectivamente. Esto debido a que la extracción proteica disminuyó de manera considerable los AA azufrados Cys y Met, ya que estos AA están presentes en la fracción de albúmina, la cual tiene importancia en la estabilidad del punto isoeléctrico durante la acidificación para la precipitación proteica. El proceso térmico se ha visto que modifica el perfil de AA en la matriz alimentaria, Nosworthy *et al.*, (2018), reportó un aumento de AA azufrados (Met + Cys) después de un proceso de cocción, con una EAAS (limitantes) de 0.66 en haba cruda y 0.75 en haba cocida, lo cual es similar con nuestros resultados. En otro estudio sobre la calidad proteica del haba, se reportó una puntuación de AA esenciales mayor a la de nuestro estudio de 0.83, sin embargo, el aminoácido limitante fue Trp (Le Roux *et al.*, 2020).

La PDCAAS-IV es el parámetro teórico para determinar la calidad de las proteínas alimentarias. Se calcula en base a la EAAS (limitantes) de acuerdo con las

recomendaciones de la FAO para niños de 2 a 5 años y la DPIV. El valor más alto de PDCAAS-IV es 1, que proporcionará el 100% de los AA esenciales requeridos por un niño en edad preescolar de dos años. En este estudio la PDCAAS-IV presentó diferencias estadísticamente significativas ( $\rho < 0.05$ ) en todas las muestras, siendo la harina de haba cruda el valor más bajo (<20%) y la harina de haba cocida el valor más alto (73.44%), lo sugiere que la fracción proteica de haba después de un tratamiento térmico aumenta de manera significativa su valor nutricional. Esto debido a que las proteínas en su estado nativo, se pliegan en una conformación específica determinada por la composición de AA que la constituyen. Esta conformación fuertemente plegada dificulta la digestibilidad de las proteínas; además, las proteínas del haba se encuentran en estructuras supramoleculares y están atrapadas físicamente en estructuras celulares. Esta estructuración supramolecular restringe aún más el acceso de las enzimas hidrolíticas a sus sustratos (Joye, 2019).

Otras leguminosas como la soya y el chícharo, en las cuales la digestibilidad fue determinada *in vivo* presentan PDCAAS de 86 y 71%, respectivamente, estos valores son cercanos a los reportados en la muestra de harina de haba cocida (73.44%; *in vitro*) en nuestro estudio, sin embargo, es importante mencionar que el PDCAAS varían de acuerdo al aminoácido limitante que resulte en la semilla analizada, y el experimento realizado para determinar la digestibilidad (Mathai *et al.*, 2017). En este estudio, los valores de digestibilidad fueron calculados a partir de una digestión *in vitro*, sin embargo, la recomendación de la FAO (2013) es que se lleve a cabo en cerdo, y de no ser posible en ratas. A pesar de esto, los resultados *in vitro* obtenidos en este estudio son similares a los reportados por otros autores con metodología *in vivo* (ratas). Gilani & Sepehr, (2003) llevaron a cabo un experimento de 5 semanas en el cual evaluaron la calidad proteica del haba sometida a cocción en autoclave a 121°C por 20 min, reportando una digestibilidad proteica del 82%, una PDCAAS del 73%, (este estudio: 94.15 y 73.44%, respectivamente), valores equiparables a los obtenidos en la harina de haba cocida en este estudio e incluso superiores a los reportados en soya y frijol. Un estudio previo realizado por Sarwar & Peace, (1986) incluyó remojo previo a la cocción en autoclave (121 °C por 10 min) de 18 h, y reportó una digestibilidad proteica de 86% y una PDCAAS de 55%, este aumento en la digestibilidad podría ser por la mayor desnaturalización proteica gracias al remojo, sin embargo, la disminución en la PDCAAS podría ser ocasionada por la pérdida de aminoácidos y cambios en el perfil de aminoácidos por la alta desnaturalización, este fenómeno se explica en los párrafos anteriores.

El índice de eficiencia proteica (PER) mide la capacidad de una proteína para promover el desarrollo de ratas jóvenes en crecimiento y se reporta como el aumento de peso por gramo de proteína consumida. Sin embargo, las ratas tienen una mayor necesidad de AA que contenga azufre, por lo tanto, este método sobreestima los requisitos para los humanos y probablemente subestima la calidad de algunas proteínas, especialmente proteínas vegetales (Boye *et al.*, 2012). Los investigadores han propuesto métodos *in vitro* para correlacionarlos con los métodos *in vivo* con el fin de desarrollar métodos fiables para la medición de PER estimado a través de ecuaciones de regresión. En este estudio se utilizó una ecuación de regresión para el método de PER estimado (E-PER). El ASP mostro el mayor valor (2.15), mientras que la harina de haba cruda mostró el valor más bajo (1.43). El tratamiento de cocción aumento el E-PER en la harina de haba cocida (1.75). La baja cantidad de leucina en la harina de haba cruda disminuye considerablemente el E-PER, mientras que en las otras muestras los tratamientos a los que fueron sometidos aumentaron los niveles de leucina contribuyendo a aumentar el E-PER. Nosworthy *et al.*, (2018) reportó un valor de 0.85 y 0.66, para el haba hervida y haba horneada, respectivamente. Este aumento a través de la cocción con agua también se observó en las muestras analizadas. Lo anterior, también se ha observado en otras leguminosas, López-Ibarra *et al.*, (2021) evaluó la fracción proteica del frijol tépari, en muestras de harina cruda y cocida, y concentrado proteico crudo y cocido. Se observó que el tratamiento térmico favoreció el aumento en los valores de E-PER en las harinas (0.86 a 1.93) y los concentrados (1.34 a 1.81). El hecho de que el E-PER relacione el valor de digestibilidad y contenido de AA, sugiere que el valor nutricional aumenta gracias a procesos térmico y proteolíticos provocando que muestras fueran más accesibles a procesos digestivos posteriores.



## VIII. Conclusiones

1. La obtención del aislado proteico a partir del punto isoeléctrico de la fracción proteica de haba (*Vicia faba*) permitió obtener un alto rendimiento ( $16.97 \pm 0.56\%$ ) y concentración proteica ( $94.39 \pm 0.76\%$ ).
2. En este estudio, la extracción de la fracción proteica al retirar los polifenoles redujo significativamente el rendimiento de obtención proteica hasta un 8%.
3. El perfil de aminoácidos se ve afectado por la metodología empleada para la extracción de la fracción proteica de haba (*Vicia faba*). El tratamiento térmico aumentó significativamente los parámetros nutricionales *in vitro*; digestibilidad proteica (de  $31.34 \pm 1.40$  a  $94.15 \pm 2.45\%$ ), PDCAAS-IV (de  $19.12 \pm 0.86$  a  $73.44 \pm 1.92\%$ ), EAAS (de 0.61 a 0.78) y E-PER (de 1.43 a 1.75).
4. Los resultados obtenidos sobre la calidad nutricional *in vitro* de la fracción proteica de haba (*Vicia faba*) sugieren propiedades potenciales para su uso como ingrediente funcional en el desarrollo y formulación de nuevos alimentos.

## IX Bibliografía

- Abdel-Aleem, W. M., Sanaa M., A.-H., & Latif, S. (2019). Effect of Soaking and Cooking on Nutritional and Quality Properties of Faba Bean. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 10(10), 389–395. <https://doi.org/10.21608/jfds.2019.62862>
- Almazán-Rodríguez, L. I., González-Francisco, M., Mora-Escobedo, R., & Robles-Ramírez, M. C. (2016). *Influencia del método desengrasado en las características Fisicoquímicas y estructurales de aislados proteicos de Cacahuete. No. 1, 6.*
- Alminger, M., Aura, A.-M., Bohn, T., Dufour, C., El, S. N., Gomes, A., Karakaya, S., Martínez-Cuesta, M. C., McDougall, G. J., Requena, T., & Santos, C. N. (2014). *In Vitro Models for Studying Secondary Plant Metabolite Digestion and Bioaccessibility: In vitro models for bioaccessibility and digestion studies.... Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 413–436. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12081>
- Alpizar-Reyes, E., Castaño, J., Carrillo-Navas, H., Alvarez-Ramírez, J., Gallardo-Rivera, R., Pérez-Alonso, C., & Guadarrama-Lezama, A. Y. (2018). Thermodynamic sorption analysis and glass transition temperature of faba bean (*Vicia faba* L.) protein. *Journal of Food Science and Technology*, 55(3), 935–943. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-3001-1>
- Alsmeyer, R. H., Cunningham, A. E., & Happich, M. L. (1974). Equations predict PER from amino acid analysis. *Undefined*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Equations-predict-PER-from-amino-acid-analysis-Alsmeyer-Cunningham/2eaac3e44cac29249254d7ff7a5ba918a7be1960>
- Alves, A. C., & Tavares, G. M. (2019). Mixing animal and plant proteins: Is this a way to improve protein techno-functionalities? *Food Hydrocolloids*, 97, 105171. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.06.016>
- AOAC. (1980a). *Official Method 7.056* (16th Ed.). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL.
- AOAC. (1980b). *Official Method 14.003* (16th Ed.). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL.
- AOAC. (1990a). *Official Method 14.006* (15th Ed.). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL.

- AOAC. (1990b). *Official Method 962.09* (15th Ed.). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL.
- AOAC. (2005). *Official Method 992.23* (18th Ed.). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL.
- AOAC International. (2019). *Official Methods of Analysis, 21st Edition (2019)*. AOAC INTERNATIONAL. <https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis-21st-edition-2019/>
- Berrazaga, I., Bourlieu-Lacanal, C., Laleg, K., Jardin, J., Briard-Bion, V., Dupont, D., Walrand, S., & Micard, V. (2020). Effect of protein aggregation in wheat-legume mixed pasta diets on their in vitro digestion kinetics in comparison to “rapid” and “slow” animal proteins. *PLOS ONE*, *15*(5), e0232425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232425>
- Bio-Rad Laboratories. (2014). *Mini-PROTEAN 3 Cell*. Instruction Manual.
- Bornhorst, G. M., Gouseti, O., Wickham, M. S. J., & Bakalis, S. (2016). Engineering Digestion: Multiscale Processes of Food Digestion. *Journal of Food Science*, *81*(3), R534–R543. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13216>
- Boye, J., Wijesinha-Bettoni, R., & Burlingame, B. (2012). Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *British Journal of Nutrition*, *108*(S2), S183–S211. <https://doi.org/10.1017/S0007114512002309>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, *14*(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Bühler, J. M., Dekkers, B. L., Bruins, M. E., & van der Goot, A. J. (2020). Modifying Faba Bean Protein Concentrate Using Dry Heat to Increase Water Holding Capacity. *Foods*, *9*(8), 1077. <https://doi.org/10.3390/foods9081077>
- Çalışkantürk Karataş, S., Günay, D., & Sayar, S. (2017). In vitro evaluation of whole faba bean and its seed coat as a potential source of functional food components. *Food Chemistry*, *230*, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.037>
- Camacho Espinoza, M. K., Peinado Guevara, L. I., López Valenzuela, J. Á., Valdez Ortiz, Á., Salinas Pérez, R. A., Moreno Herrera, C. G., & Medina Godoy, S. (2010). Caracterización

proteómica de granos de frijol azufrado (*Phaseolus Vulgaris*) cultivados en el estado de Sinaloa. *Ra Ximhai*, 23–36. <https://doi.org/10.35197/rx.06.01.2010.04.mc>

Căpriță, R., Căpriță, A., & Crețescu, I. (2010). *Protein Solubility as Quality Index for Processed Soybean*. 43(1).

Carbonaro, M., Maselli, P., & Nucara, A. (2012). Relationship between digestibility and secondary structure of raw and thermally treated legume proteins: A Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study. *Amino Acids*, 43(2), 911–921. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1151-4>

Carbonaro, M., Maselli, P., & Nucara, A. (2015). Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food Research International*, 76, 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.007>

Castillo, F., González, D. R., & Moore-Carrasco, R. (2019). Effects of *Phaseolus vulgaris* Extract on Lipolytic Activity and Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes into Mature Adipocytes: A Strategy to Prevent Obesity. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2019, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2019/5093654>

Chapagain, T., & Riseman, A. (2015). Nitrogen and carbon transformations, water use efficiency and ecosystem productivity in monocultures and wheat-bean intercropping systems. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 101(1), 107–121. <https://doi.org/10.1007/s10705-014-9647-4>

Chatterjee, C., Gleddie, S., & Xiao, C.-W. (2018). Soybean Bioactive Peptides and Their Functional Properties. *Nutrients*, 10(9), 1211. <https://doi.org/10.3390/nu10091211>

Chauhan, V., & Kanwar, S. S. (2020). Bioactive peptides. En *Biotechnological Production of Bioactive Compounds* (pp. 107–137). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64323-0.00004-7>

Ciechanover, A. (2017). Intracellular protein degradation: From a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 30(4), 341–355. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2017.09.001>

Coda, R., Kianjam, M., Pontonio, E., Verni, M., Di Cagno, R., Katina, K., Rizzello, C. G., & Gobbetti, M. (2017). Sourdough-type propagation of faba bean flour: Dynamics of microbial consortia

and biochemical implications. *International Journal of Food Microbiology*, 248, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.009>

Colca Stelman, J. W. (2014). *Efecto del tratamiento térmico sobre la solubilidad proteica, el índice de ureasa y la composición química del haba (Vicia Faba L.)*.

Corrochano, A. R., Cal, R., Kennedy, K., Wall, A., Murphy, N., Trajkovic, S., O'Callaghan, S., Adelfio, A., & Khaldi, N. (2021). Characterising the efficacy and bioavailability of bioactive peptides identified for attenuating muscle atrophy within a Vicia faba-derived functional ingredient. *Current Research in Food Science*, 4, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.crf.2021.03.008>

Duc, G., Bao, S., Baum, M., Redden, B., Sadiki, M., Suso, M. J., Vishniakova, M., & Zong, X. (2010). Diversity maintenance and use of Vicia faba L. genetic resources. *Field Crops Research*, 115(3), 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.10.003>

El Fiel, H. E. A., El Tinay, A. H., & Elsheikh, E. A. E. (2002). *Effect of nutritional status of faba bean (Vicia faba L.) on protein solubility*. 76, 219–223.

FAO. (1993). *Manual de Técnicas para Laboratorio de Nutrición de Peces y Crustáceos*. <http://www.fao.org/3/ab489s/ab489s03.htm>

FAOSTAT. (2018). *Producción de haba*. <http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QC>

Fei Fang, E., Abd Elazeem Hassanien, A., Ho Wong, J., Shui Fern Bah, C., Saad Soliman, S., & Bun Ng, T. (2011). Isolation of a New Trypsin Inhibitor from the Faba Bean (Vicia faba cv. Giza 843) with Potential Medicinal Applications. *Protein & Peptide Letters*, 18(1), 64–72. <https://doi.org/10.2174/092986611794328726>

Felix, M., Romero, A., Carrera-Sanchez, C., & Guerrero, A. (2019). Assessment of interfacial viscoelastic properties of Faba bean (Vicia faba) protein-adsorbed O/W layers as a function of pH. *Food Hydrocolloids*, 90, 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.036>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (Ed.). (2013). *Dietary protein quality evaluation in human nutrition: Report of an FAO expert consultation, 31 March-2 April, 2011, Auckland, New Zealand*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Frazier, R. A., Deaville, E. R., Green, R. J., Stringano, E., Willoughby, I., Plant, J., & Mueller-Harvey, I. (2010). Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. *Journal of*

*Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 490–495.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.05.035>

- García, M. C., Puchalska, P., Esteve, C., & Marina, M. L. (2013). Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta*, 106, 328–349. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.041>
- García-Mora, P., Frias, J., Peñas, E., Zieliński, H., Giménez-Bastida, J. A., Wiczowski, W., Zielińska, D., & Martínez-Villaluenga, C. (2015). Simultaneous release of peptides and phenolics with antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. Pinto) proteins by subtilisins. *Journal of Functional Foods*, 18, 319–332. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.07.010>
- Gaucín, D. (2016, junio 16). *Producción y consumo de legumbres (II)*. El Economista. <https://www.economista.com.mx/opinion/Produccion-y-consumo-de-legumbres-II-20160616-0006.html>
- Gewehr, M. C. F., Silverio, R., Rosa-Neto, J. C., Lira, F. S., Reckziegel, P., & Ferro, E. S. (2020). Peptides from Natural or Rationally Designed Sources Can Be Used in Overweight, Obesity, and Type 2 Diabetes Therapies. *Molecules*, 25(5), 1093. <https://doi.org/10.3390/molecules25051093>
- Gilani, G. S., & Sepehr, E. (2003). Protein Digestibility and Quality in Products Containing Antinutritional Factors Are Adversely Affected by Old Age in Rats. *The Journal of Nutrition*, 133(1), 220–225. <https://doi.org/10.1093/jn/133.1.220>
- Giménez, M. A., González, R. J., Wagner, J., Torres, R., Lobo, M. O., & Samman, N. C. (2013). Effect of extrusion conditions on physicochemical and sensorial properties of corn-broad beans (*Vicia faba*) spaghetti type pasta. *Food Chemistry*, 136(2), 538–545. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.068>
- Girón-Calle, J., Vioque, J., Pedroche, J., Alaiz, M., Yust, M. M., Megías, C., & Millán, F. (2008). Chickpea protein hydrolysate as a substitute for serum in cell culture. *Cytotechnology*, 57(3), 263–272. <https://doi.org/10.1007/s10616-008-9170-z>
- González-Espinosa de los Monteros, L. A., Ramón-Gallegos, E., Torres-Torres, N., & Mora-Escobedo, R. (2011). Effect of Germinated Soybean Protein Hydrolysates on Adipogenesis and Adipolysis in 3T3-L1 Cells. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(4), 355–362. <https://doi.org/10.1007/s11130-011-0263-z>

- Grossi, G. V., & Ohaco, E. H. (2010). *Determinación de fibra dietética total, soluble e insoluble en hongos comestibles de cultivo*. 19.
- Hernández-García, J. I., Orozco-Villafuerte, J., Cuenca-Mendoza, F., Pérez-Alonso, C., Carrillo-Navas, H., & Guadarrama-Lezama, A. Y. (2016). *Extracción, caracterización física y térmica de aislados de proteína de haba (vicia faba)*. 1, 41–46.
- Hidalgo, M., Rodríguez, V., & Porras., O. (2018). Una mirada actualizada de los beneficios fisiológicos derivados del consumo de legumbres. *Revista chilena de nutrición*, 45, 32–44. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182018000200032>
- Hsieh, C.-C., Chou, M.-J., & Wang, C.-H. (2017). Lunasin attenuates obesity-related inflammation in RAW264.7 cells and 3T3-L1 adipocytes by inhibiting inflammatory cytokine production. *PLOS ONE*, 12(2), e0171969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171969>
- Hsu, H. W., Vavak, D. L., Satterlee, L. D., & Miller, G. A. (1977). A Multienzyme Technique for Estimating Protein Digestibility. *Journal of Food Science*, 42(5), 1269–1273. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb14476.x>
- Ijaz, U., Adhikari, K. N., Stoddard, F. L., & Trethowan, R. M. (2018). Rust resistance in faba bean (*Vicia faba* L.): Status and strategies for improvement. *Australasian Plant Pathology*, 47(1), 71–81. <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0528-6>
- Istvan, L. (2021). *GelAnalyzer*. <http://www.gelanalyzer.com/>
- Jakubczyk, A., Karaś, M., Złotek, U., Szymanowska, U., Baraniak, B., & Bochnak, J. (2019). Peptides obtained from fermented faba bean seeds (*Vicia faba*) as potential inhibitors of an enzyme involved in the pathogenesis of metabolic syndrome. *LWT*, 105, 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.009>
- Jenkins, D. J. A., Kendall, C. W. C., Augustin, L. S. A., Mitchell, S., Sahye-Pudaruth, S., Blanco Mejia, S., Chiavaroli, L., Mirrahimi, A., Ireland, C., Bashyam, B., Vidgen, E., de Souza, R. J., Sievenpiper, J. L., Coveney, J., Leiter, L. A., & Josse, R. G. (2012). Effect of Legumes as Part of a Low Glycemic Index Diet on Glycemic Control and Cardiovascular Risk Factors in Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Controlled Trial. *Archives of Internal Medicine*, 172(21), 1653. <https://doi.org/10.1001/2013.jamainternmed.70>
- Joye, I. (2019). Protein Digestibility of Cereal Products. *Foods*, 8(6), 199. <https://doi.org/10.3390/foods8060199>

- Kamran, F., & Reddy, N. (2018). *Bioactive peptides from legume: Functional and nutraceutical potential*. 17.
- Karaca, A. C., Low, N., & Nickerson, M. (2011). Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International*, 44(9), 2742–2750. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.012>
- Karkouch, I., Tabbene, O., Gharbi, D., Ben Mlouka, M. A., Elkahoui, S., Rihouey, C., Coquet, L., Cosette, P., Jouenne, T., & Limam, F. (2017). Antioxidant, antityrosinase and antibiofilm activities of synthesized peptides derived from *Vicia faba* protein hydrolysate: A powerful agents in cosmetic application. *Industrial Crops and Products*, 109, 310–319. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.025>
- Kaur, M., & Singh, N. (2007). Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 102(1), 366–374. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.029>
- Khalil, M. M. (2001). *Effect of soaking, germination, autoclaving and cooking on chemical and biological value of guar compared with faba bean*. 4, 5.
- Kimura, A., Fukuda, T., Zhang, M., Motoyama, S., Maruyama, N., & Utsumi, S. (2008). Comparison of physicochemical properties of 7S and 11S globulins from pea, fava bean, cowpea, and French bean with those of soybean—French bean 7S globulin exhibits excellent properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10273–10279. <https://doi.org/10.1021/jf801721b>
- Kosińska, A., Karamać, M., Penkacik, K., Urbalewicz, A., & Amarowicz, R. (2011). Interactions between tannins and proteins isolated from broad bean seeds (*Vicia faba* Major) yield soluble and non-soluble complexes. *European Food Research and Technology*, 233(2), 213–222. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1506-9>
- Kudre, T. G., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2013). Comparative study on chemical compositions and properties of protein isolates from mung bean, black bean and bambara groundnut: Protein isolates from mung bean, black bean and bambara groundnut. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(10), 2429–2436. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6052>
- Kuerban, A., Al-Ghafari, A. B., ALGhamadi, S. A., Syed, F. Q., Mirza, M. B., Mohammed, F. A., Abulnaja, K. O., Alshaibi, H. F., Alsufiani, H. M., Kumosani, T. A., Al-Malki, A. L., & Moselhy, S. S. (2020). Potential antiglycation, antioxidant and antiproliferative activities of *Vicia faba*



peptides. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(4), 2155–2162. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00462-9>

Kukić, D. V., Šćiban, M. B., Prodanović, J. M., Tepić, A. N., & Vasić, M. A. (2015). Extracts of fava bean (*Vicia faba* L.) seeds as natural coagulants. *Ecological Engineering*, 84, 229–232. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.09.008>

Kumar, A., Nidhi, Prasad, N., & Sinha, S. K. (2015). Nutritional and antinutritional attributes of faba bean (*Vicia faba* L.) germplasms growing in Bihar, India. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 21(1), 159–162. <https://doi.org/10.1007/s12298-014-0270-2>

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Langton, M., Ehsanzamir, S., Karkehabadi, S., Feng, X., Johansson, M., & Johansson, D. P. (2020). Gelation of faba bean proteins—Effect of extraction method, pH and NaCl. *Food Hydrocolloids*, 103, 105622. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105622>

Le Roux, L., Ménard, O., Chacon, R., Dupont, D., Jeantet, R., Deglaire, A., & Nau, F. (2020). Are Faba Bean and Pea Proteins Potential Whey Protein Substitutes in Infant Formulas? An In Vitro Dynamic Digestion Approach. *Foods*, 9(3), 362. <https://doi.org/10.3390/foods9030362>

León-Espinosa, E. B., Sánchez-Chino, X., Garduño-Siciliano, L., Álvarez-González, R. I., Dávila-Ortiz, G., Madrigal-Bujaidar, E., Téllez-Medina, D. I., & Jiménez-Martínez, C. (2016). Hypocholesterolemic and Anticarcinogenic Effect of *Vicia faba* Protein Hydrolyzates. *Nutrition and Cancer*, 68(5), 856–864. <https://doi.org/10.1080/01635581.2016.1180406>

Li, L., Liu, Y., Zou, X., He, J., Xu, X., Zhou, G., & Li, C. (2017). In vitro protein digestibility of pork products is affected by the method of processing. *Food Research International*, 92, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.024>

Lin, J., Teo, L. M., Leong, L. P., & Zhou, W. (2019). In vitro bioaccessibility and bioavailability of quercetin from the quercetin-fortified bread products with reduced glycemic potential. *Food Chemistry*, 286, 629–635. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.199>

Liu, F., Kariluoto, S., Edelman, M., & Piironen, V. (2021). Bioaccessibility of folate in faba bean, oat, rye and wheat matrices. *Food Chemistry*, 350, 129259. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129259>

- Liu, K., Du, R., & Chen, F. (2019). Antioxidant activities of Se-MPS: A selenopeptide identified from selenized brown rice protein hydrolysates. *LWT*, *111*, 555–560. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.076>
- López Ibarra, C. (2018). *Evaluación de las características nutricionales y funcionales del concentrado proteico de Phaseolus acutifolius gray*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- López-Ibarra, C., Ruiz-López, F. de J., Bautista-Villarreal, M., Báez-González, J. G., Rodríguez Romero, B. A., González-Martínez, B. E., López-Cabanillas Lomelí, M., & Vázquez-Rodríguez, J. A. (2021). Protein Concentrates on Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius* Gray) as a Functional Ingredient: In silico Docking of Tepary Bean Lectin to Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Frontiers in Nutrition*, *8*, 661463. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.661463>
- Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2018). In vitro digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. *Food Research International*, *107*, 423–436. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.055>
- Luo, Y.-W., & Xie, W.-H. (2013). Effect of different processing methods on certain antinutritional factors and protein digestibility in green and white faba bean (*Vicia faba* L.). *CyTA - Journal of Food*, *11*(1), 43–49. <https://doi.org/10.1080/19476337.2012.681705>
- Lüscher, A., Mueller-Harvey, I., Soussana, J. F., Rees, R. M., & Peyraud, J. L. (2014). Potential of legume-based grassland-livestock systems in Europe: A review. *Grass and Forage Science*, *69*(2), 206–228. <https://doi.org/10.1111/gfs.12124>
- M., A.-A., Abdel-Hameed, S., & Latif, S. (2019). Effect of Soaking and Cooking on Nutritional and Quality Properties of Faba Bean. *Journal of Food and Dairy Sciences*, *10*(10), 389–395. <https://doi.org/10.21608/jfds.2019.62862>
- Macarulla, M. T., Medina, C., Diego, M. A. D., Chávarri, M., Zulet, M. Á., Martínez, J. A., Noël-Suberville, C., Higuieret, P., & Portillo, M. P. (2001). Effects of the whole seed and a protein isolate of faba bean (*Vicia faba*) on the cholesterol metabolism of hypercholesterolaemic rats. *British Journal of Nutrition*, *85*(5), 607–614. <https://doi.org/10.1079/BJN2000330>
- Mahan, L. K., & Raymond, J. L. (Eds.). (2017). *Krause's food & the nutrition care process* (Fourteenth edition). Elsevier.

- Mallikarjun Gouda, K. G., Gowda, L. R., Rao, A. G. A., & Prakash, V. (2006). Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide Derived from Glycinin, the 11S Globulin of Soybean (*Glycine max*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(13), 4568–4573. <https://doi.org/10.1021/jf060264q>
- Managa, M. G., Akinola, S. A., Remize, F., Garcia, C., & Sivakumar, D. (2021). Physicochemical Parameters and Bioaccessibility of Lactic Acid Bacteria Fermented Chayote Leaf (*Sechium edule*) and Pineapple (*Ananas comosus*) Smoothies. *Frontiers in Nutrition*, *8*, 649189. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.649189>
- Marcolini, E., Babini, E., Bordoni, A., Di Nunzio, M., Laghi, L., Macz , A., Picone, G., Szerdahelyi, E., Valli, V., & Capozzi, F. (2015). Bioaccessibility of the Bioactive Peptide Carnosine during in Vitro Digestion of Cured Beef Meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(20), 4973–4978. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01157>
- Martínez-Sánchez, S. M., Gabaldón-Hernández, J. A., & Montoro-García, S. (2020). Unravelling the molecular mechanisms associated with the role of food-derived bioactive peptides in promoting cardiovascular health. *Journal of Functional Foods*, *64*, 103645. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103645>
- Mathai, J. K., Liu, Y., & Stein, H. H. (2017). Values for digestible indispensable amino acid scores (DIAAS) for some dairy and plant proteins may better describe protein quality than values calculated using the concept for protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS). *British Journal of Nutrition*, *117*(4), 490–499. <https://doi.org/10.1017/S0007114517000125>
- Maya Oca a, K. (2009). *Caracterización física, nutricional y no nutricional de haba sometida a tratamiento térmico*. Instituto Politécnico Nacional.
- Ménard, O., Cattenoz, T., Guillemin, H., Souchon, I., Deglaire, A., Dupont, D., & Picque, D. (2014). Validation of a new in vitro dynamic system to simulate infant digestion. *Food Chemistry*, *145*, 1039–1045. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.036>
- Minekus, M., Almingier, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.*, *5*(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>

- Mitchell, H. H., & Block, R. J. (1946). Some relationships between the amino acid contents of proteins and their nutritive values for the rat. *The Journal of Biological Chemistry*, 163, 599–620.
- Mohammadi-Sartang, M., Bellissimo, N., Totosy de Zepetnek, J. O., Brett, N. R., Mazloomi, S. M., Fararouie, M., Bedeltavana, A., Famouri, M., & Mazloom, Z. (2018). The effect of daily fortified yogurt consumption on weight loss in adults with metabolic syndrome: A 10-week randomized controlled trial. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 28(6), 565–574. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2018.03.001>
- Möller, J. (2014). *Comparación de los métodos para la determinación de fibra en pienso y en los alimentos*.
- Müller, J. (2017). *Dumas or Kjeldahl for reference analysis? Comparison and considerations for nitrogen/Protein analysis of food and feed*. 5.
- Multari, S., Stewart, D., & Russell, W. R. (2015). Potential of Fava Bean as Future Protein Supply to Partially Replace Meat Intake in the Human Diet: Fava bean as future protein supply.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), 511–522. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12146>
- Ndez-Quintela, A. F., Macarulla, M. T., Barrio, A. S. D., & MARTÍNEZ, J. A. (1997). *Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain*. 12.
- Nosworthy, M., Medina, G., Franczyk, A., Neufeld, J., Appah, P., Utioh, A., Frohlich, P., & House, J. (2018). Effect of Processing on the In Vitro and In Vivo Protein Quality of Beans (*Phaseolus vulgaris* and *Vicia Faba*). *Nutrients*, 10(6), 671. <https://doi.org/10.3390/nu10060671>
- Ohanenye, I. C., Tsopmo, A., Ejike, C. E. C. C., & Udenigwe, C. C. (2020). Germination as a bioprocess for enhancing the quality and nutritional prospects of legume proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 101, 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.003>
- Olu, M., & Edeiran, A. E. (2015). Protein Evaluation of Foods. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 4(6), 700. <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20150406.26>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2016). *Legumbres, semillas nutritivas para un futuro sostenible*. FAO. <http://www.fao.org/3/a-i5528s.pdf>

- Oseguera Toledo, M. E., Gonzalez de Mejia, E., Sivaguru, M., & Amaya-Llano, S. L. (2016). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein-derived peptides increased insulin secretion, inhibited lipid accumulation, increased glucose uptake and reduced the phosphatase and tensin homologue activation in vitro. *Journal of Functional Foods*, 27, 160–177. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.09.001>
- Perales-Vázquez, G. D. C., Mercado-Mercado, G., De la Rosa, L. A., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2020). Bioaccesibilidad y cinética de liberación in vitro de compuestos fenólicos en algunas salsas de la cocina mexicana. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.205>
- Prabhu, S., & Rajeswari, D. (2018). *Nutritional and Biological properties of Vicia faba L.: A perspective review*. 1332–1340.
- Puruncajas Panta, Y. C. (2017). *Método de secado en frío (liofilización) y secado en calor (spray dryer) para la obtención de concentrados proteicos de haba (Vicia faba)*. Universidad Técnica de Ambato.
- Rahman, M. M., Refat, B., Zhang, H., Zhang, W., & Yu, P. (2019). Detect molecular spectral features of newly developed *Vicia faba* varieties and protein metabolic characteristics in ruminant system using advanced synchrotron radiation based infrared microspectroscopy: A preliminary study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 206, 413–420. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.08.022>
- Rao, S., Chinkwo, K., Santhakumar, A., & Blanchard, C. (2018). Inhibitory Effects of Pulse Bioactive Compounds on Cancer Development Pathways. *Diseases*, 6(3), 72. <https://doi.org/10.3390/diseases6030072>
- Rho, S. J., Lee, J.-S., Chung, Y. I., Kim, Y.-W., & Lee, H. G. (2009). Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from fermented soybean extract. *Process Biochemistry*, 44(4), 490–493. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.12.017>
- Rosa-Sibakov, N., Re, M., Karsma, A., Laitila, A., & Nordlund, E. (2018). Phytic Acid Reduction by Bioprocessing as a Tool To Improve the In Vitro Digestibility of Faba Bean Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(40), 10394–10399. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02948>
- Rui, X., Fu, Y., Zhang, Q., Li, W., Zare, F., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M. (2016). A comparison study of bioaccessibility of soy protein gel induced by magnesiumchloride, glucono- $\delta$ -

lactone and microbial transglutaminase. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 234–242.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.032>

Sair, L. (1959). *Proteinaceous soy composition and method of preparing* (Patent Núm. 2,881,076).

Samaei, S. P., Ghorbani, M., Tagliazucchi, D., Martini, S., Gotti, R., Themelis, T., Tesini, F., Gianotti, A., Gallina Toschi, T., & Babini, E. (2020). Functional, nutritional, antioxidant, sensory properties and comparative peptidomic profile of faba bean (*Vicia faba*, L.) seed protein hydrolysates and fortified apple juice. *Food Chemistry*, 330, 127120.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127120>

Sánchez-Chino, X., Jiménez-Martínez, C., Dávila-Ortiz, G., Álvarez-González, I., & Madrigal-Bujaidar, E. (2015). Nutrient and Nonnutrient Components of Legumes, and Its Chemopreventive Activity: A Review. *Nutrition and Cancer*, 67(3), 401–410.  
<https://doi.org/10.1080/01635581.2015.1004729>

Sarwar, G., & Peace, R. W. (1986). Comparisons between True Digestibility of Total Nitrogen and Limiting Amino Acids in Vegetable Proteins Fed to Rats. *The Journal of Nutrition*, 116(7), 1172–1184. <https://doi.org/10.1093/jn/116.7.1172>

Scopes, R. K. (1974). Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. *Analytical Biochemistry*, 59(1), 277–282. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(74\)90034-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(74)90034-7)

Sengul, H., Surek, E., & Nilufer-erdil, D. (2014). *Investigating the effects of food matrix and food components on bioaccessibility of pomegranate (Punica granatum) phenolics and anthocyanins using an in-vitro gastrointestinal digestion model*. 41.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.055>

Serrano-Sandoval, S. N., Guardado-Félix, D., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2019). Changes in digestibility of proteins from chickpeas (*Cicer arietinum* L.) germinated in presence of selenium and antioxidant capacity of hydrolysates. *Food Chemistry*, 285, 290–295.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.137>

Sha, Z., Zhao, J., & Goldberg, A. L. (2018). Measuring the Overall Rate of Protein Breakdown in Cells and the Contributions of the Ubiquitin-Proteasome and Autophagy-Lysosomal Pathways. En T. Mayor & G. Kleiger (Eds.), *The Ubiquitin Proteasome System* (Vol. 1844, pp. 261–276). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8706-1\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8706-1_17)

Sharan, S., Zanghelini, G., Zotzel, J., Bonerz, D., Aschoff, J., Saint-Eve, A., & Maillard, M.-N. (2021). Fava bean (*Vicia faba* L.) for food applications: From seed to ingredient processing

and its effect on functional properties, antinutritional factors, flavor, and color. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 401–428. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12687>

Singh, A. K., Bharati, R. C., Manibhushan, N. C., & Pedpati, A. (2013). *An assessment of faba bean (Vicia faba L.) current status and future prospect.* 8 (50), 8. <https://doi.org/10.5897/AJAR2013.7335>

Singhal, A., Stone, A. K., Vandenberg, A., Tyler, R., & Nickerson, M. T. (2016). Effect of genotype on the physicochemical and functional attributes of faba bean (*Vicia faba L.*) protein isolates. *Food Science and Biotechnology*, 25(6), 1513–1522. <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0235-z>

Tahir, N. A.-R. (2015). Identification of genetic variation in some faba bean (*Vicia faba L.*) genotypes grown in Iraq estimated with RAPD and SDS-PAGE of seed proteins. *INDIAN J BIOTECHNOL*, 6.

Tang, C.-H. (2008). Thermal denaturation and gelation of vicilin-rich protein isolates from three Phaseolus legumes: A comparative study. *LWT - Food Science and Technology*, 41(8), 1380–1388. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.08.025>

Tazart, K., Lamacchia, C., Zaidi, F., & Haros, M. (2016). Nutrient composition and in vitro digestibility of fresh pasta enriched with *Vicia faba*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 47, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.12.007>

Teixeira, C. M. M., Correa, C. N., Iwai, L. K., Ferro, E. S., & Castro, L. M. de. (2019). Characterization of Intracellular Peptides from Zebrafish (*Danio rerio*) Brain. *Zebrafish*, 16(3), 240–251. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1718>

Thermo Scientific. (2014). *A205 Custom Method for Protein and Peptide Quantification. Technical Note 52649*, 2.

Turco, I., Ferretti, G., & Bacchetti, T. (2016). Review of the health benefits of Faba bean (*Vicia faba L.*) polyphenols. *J. Food Nutr. Res.*, 55, 283–293.

United Nations. (2015). *World Population Prospects The 2015 Revision*.

U.S.D.A. (2019). *FoodData Central. Broadbeans (fava beans), mature seeds, raw.* <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/175205/nutrients>

- Vázquez-Ortiz, F. A., Caire, G., Higuera-Ciapara, I., & Hernández, G. (1995). High Performance Liquid Chromatographic Determination of Free Amino Acids in Shrimp. *Journal of Liquid Chromatography*, 18(10), 2059–2068. <https://doi.org/10.1080/10826079508013960>
- Vermeirssen, V., Augustijns, P., Morel, N., Van Camp, J., Opsomer, A., & Verstraete, W. (2005). In vitro intestinal transport and antihypertensive activity of ACE inhibitory pea and whey digests. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(6), 415–430. <https://doi.org/10.1080/09637480500407461>
- Vioque, J., Alaiz, M., & Girón-Calle, J. (2012). Nutritional and functional properties of Vicia faba protein isolates and related fractions. *Food Chemistry*, 132(1), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.033>
- Vogelsang-O'Dwyer, M., Petersen, I. L., Joehnke, M. S., Sørensen, J. C., Bez, J., Detzel, A., Busch, M., Krueger, M., O'Mahony, J. A., Arendt, E. K., & Zannini, E. (2020). Comparison of Faba Bean Protein Ingredients Produced Using Dry Fractionation and Isoelectric Precipitation: Techno-Functional, Nutritional and Environmental Performance. *Foods*, 9(3), 322. <https://doi.org/10.3390/foods9030322>
- Wang, H., Johnson, L. A., & Wang, T. (2004). Preparation of soy protein concentrate and isolate from extruded-expelled soybean meals. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(7), 713–717. <https://doi.org/10.1007/s11746-004-966-8>
- Wardlaw, G. M., Byrd-Bredbenner, C., Moe, G., Berning, J. R., & Kelley, D. S. (2016). *Wardlaw's perspectives in nutrition* (Tenth edition, updated with 2015-2020 dietary guidelines for Americans). McGraw-Hill Education.
- Warsame, A. O., Michael, N., O'Sullivan, D. M., & Tosi, P. (2020). Identification and Quantification of Major Faba Bean Seed Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(32), 8535–8544. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02927>
- Wilkinson, J. M., & Ahern, N. R. (2009). *Nutrición*. Pearson.
- Xing, G., Rui, X., Wang, D., Liu, M., Chen, X., & Dong, M. (2017). Effect of Fermentation pH on Protein Bioaccessibility of Soymilk Curd with Added Tea Polyphenols As Assessed by *in Vitro* Gastrointestinal Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(50), 11125–11132. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04456>



- Yang, J., Liu, G., Zeng, H., & Chen, L. (2018). Effects of high pressure homogenization on faba bean protein aggregation in relation to solubility and interfacial properties. *Food Hydrocolloids*, 83, 275–286. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.05.020>
- Ye, X. Y., & Ng, T. B. (2002). A new peptidic protease inhibitor from *Vicia faba* seeds exhibits antifungal, HIV-1 reverse transcriptase inhibiting and mitogenic activities. *Journal of Peptide Science*, 8(12), 656–662. <https://doi.org/10.1002/psc.425>