

INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO SOBRE LA CALIDAD DE LA PROTEÍNA DEL GUISANTE

Influence of enzymatic treatment on the pea protein quality

M^a.L. Vidal-Guevara*, **M^a.J. Periago⁺**, **G. Ros⁺**

*Investigación, Calidad y Desarrollo, Hero España, S.A., Avenida de Murcia 1, 30.820 Alcantarilla, Murcia, España

⁺Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo 30.071, Murcia, España

Correspondencia a: María Luisa Vidal Guevara

Tel. 968898900; Fax: 968898952; E-mail: marisa.vidal@hero.es

RESUMEN

Se ha estudiado la calidad de la proteína del guisante tras una hidrólisis enzimática con proteasa de *Aspergillus saitoi*. Dicho tratamiento se ha llevado a cabo con el objeto de mejorar su valor nutritivo, aumentar su digestibilidad y disminuir la presencia de antinutrientes propios del guisante. Para ello se ha analizado el contenido en proteína total, aminoácidos esenciales, inhibidor de la tripsina y se ha obtenido una imagen electroforética de la proteína. El tratamiento enzimático no varió significativamente el contenido de proteína total y aminoácidos esenciales, ni tampoco aumentó su digestibilidad *in vitro*. Sin embargo, redujo el contenido en inhibidor de la tripsina y mostró un mayor número de fracciones proteicas en su imagen electroforética, sobre todo cuando se adicionó 2-mercaptoetanol.

Palabras clave: calidad, proteína, tratamiento enzimático, guisante, electroforesis, digestibilidad, aminoácidos esenciales.

SUMMARY

Pea protein quality after enzymatic hydrolysis by *Aspergillus saitoi* protease has been studied. This treatment has been carried out with the aim to improve the nutritive value, increasing the digestibility and decreasing antinutritive factors. Total protein, essential amino acids and trypsin inhibitor content have been determined, and electrophoretic image has been obtained. Enzymatic treatment did not modified total protein

and essential amino acids content and did not increase in vitro digestibility. However, trypsin inhibitor content was reduced and a higher number of electrophoretic protein fractions was observed, mainly when 2-mercaptoethanol was added.

Key words: protein quality, enzymatic treatment, pea, electrophoresis, digestibility, essential amino acids.

INTRODUCCIÓN

Las leguminosas constituyen una buena fuente de proteína, proporcionando el 10 % del consumo total de proteína dietética en el mundo, siendo su valor nutritivo dos o tres veces superior al de los cereales (Savage y Deo, 1989; Giacco y Ricardi, 1991). Sin embargo, pese a su alto contenido en proteína, su utilización es limitada por ser deficientes en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) (Chang y Satterlee, 1981), hecho que repercute en un bajo índice de digestibilidad. Igualmente, presentan en su composición inhibidores de proteasas, principalmente el inhibidor de la tripsina, que se ha visto relacionado negativamente con la digestibilidad (Periago, 1993; Martínez *et al.*, 1996).

La reducida presencia de aminoácidos azufrados en el guisante fue observada por Chang y Satterlee (1981) y, aunque la digestibilidad, tanto de la harina como del concentrado y aislado proteico de guisante, es alta (81-90 %), similar a la caseína (Bhatty y Christison, 1984), presentan una limitación nutritiva en su composición aminoacídica, ya que los valores de PER y del Coeficiente Proteico Neto (CPN) en los tres productos oscila de 0,75 a 1,18 y de 0,25 a 0,73, respectivamente, valores muy bajos al comparar con los de la caseína (FAO, 1973). Según la FAO (1982), existe una alta correlación positiva entre el contenido en aminoácidos azufrados de diferentes leguminosas y el coeficiente proteico neto relativo, lo que sugiere que el total de aminoácidos azufrados puede ser utilizado para predecir la calidad proteica de las leguminosas. El guisante satisface los requerimientos humanos de aminoácidos esenciales, excepto en

aminoácidos azufrados (Holt y Sosulski, 1979). El perfil aminoacídico del guisante complementa al de los cereales, puesto que las leguminosas poseen una deficiencia notable en metionina y un exceso en lisina, mientras que en contraste, el arroz, el maíz y la avena contienen una gran proporción de metionina y pequeña de lisina (Rockland y Radke, 1981). Si se compara el perfil aminoacídico del guisante frente al del haba y el de la soja, se ha observado que ésta presenta un mayor contenido en histidina, isoleucina, leucina y fenilalanina que los dos primeros, siendo los perfiles aminoacídicos del guisante y haba similares (Fernández-Quintela *et al.*, 1997).

Cómputo de aminoácidos en función de la digestibilidad de la proteína

El valor nutritivo de una proteína se basa principalmente en el aporte de nitrógeno y aminoácidos requeridos para satisfacer las necesidades del organismo. Un método útil para valorar la calidad de la proteína es el **Cómputo de aminoácidos**. Este método combina los métodos biológicos, enzimáticos y químicos tradicionales. Para ello se utiliza como patrón de comparación el establecido por la FAO (1992), que establece los requerimientos de aminoácidos esenciales para cada grupo de edad. El aminoácido con un cómputo más bajo se designa como el aminoácido limitante. Sólo el triptófano, la treonina, la lisina y la metionina más la cisteína necesitan ser calculados, debido a que uno de ellos es usualmente el aminoácido limitante en la mayoría de los alimentos comunes. La fórmula para calcular el cómputo de aminoácidos de una proteína, coincide con el

concepto de marcador aminoacídico (M.A.) citado posteriormente por Henley y Kuster (1994), y es igual al cociente entre mg/g de proteína de aminoácido esencial y los requerimientos humanos en mg/g proteína del mismo aminoácido.

Sin embargo, el contenido de aminoácidos determinado químicamente exigiría una corrección en función de la digestibilidad o disponibilidad biológica. La digestibilidad de una proteína se ve influida por características inherentes a la naturaleza de la proteína (configuración de la proteína, unión de aminoácidos), por la presencia de compuestos no proteicos con influencia en la digestibilidad (fibra de la dieta, taninos y fitatos), por la presencia de inhibidores de enzimas (inhibidor de la tripsina, de la quimotripsina y de carbohidrasas), o por las condiciones de elaboración, que pueden interferir en los procesos enzimáticos de liberación de aminoácidos de las proteínas (FAO/OMS, 1985).

El Cómputo de Aminoácidos o Marcador Aminoacídico Corregido en función de la Digestibilidad de la Proteína se calcula multiplicando el M.A. del aminoácido limitante por la digestibilidad real de la proteína que, según bibliografía científica, para la proteína de guisante es de un 88 %, obtenida mediante el método del balance en rata (Eggum, 1973; McDonough *et al.*, 1990a). Según la FAO/OMS (1992), el cómputo de aminoácidos corregido en función de la digestibilidad de la proteína se define como un método sencillo y científicamente válido para la evaluación de rutina de la calidad de las proteínas de los alimentos, proporcionando información acerca de la posible suplementación y complementación de una fuente de proteínas. El cálculo de los cómputos permite identificar fácilmente el aminoácido limitante de una dieta o fuente de proteínas (Pellett y Young, 1980), y puede ser de gran utilidad como factor adicional de corrección en los procedimientos de evaluación, atentos a la vez a la cantidad y a la calidad de las proteínas. Para calcular este cómputo pueden emplearse valores de digestibilidad de proteínas ya publicados.

El segundo factor que afecta al valor nutritivo y calidad de la proteína ya mencionado con anterioridad, es la presencia de antinutrientes. Las semillas de las leguminosas contienen gran variedad de compuestos que producen efectos adversos en la actividad de determinadas enzimas fisiológicas, afectando a la digestibilidad del alimento y, por tanto, a la absorción de los mismos (Elkowicz y Sosulski, 1982; Cantoral *et al.*, 1995). Estos componentes son los inhibidores de las proteasas, el inhibidor de amilasa, el ácido fítico, los taninos y otros compuestos fenólicos. Los inhibidores de proteasas son de naturaleza proteica e interfieren sobre la actividad de sistemas enzimáticos del aparato digestivo. Inhiben específicamente a proteasas, que hidrolizan los enlaces peptídicos como paso previo para la asimilación de proteínas. Esta inhibición se traduce *in vivo* en una reducción de la digestibilidad de la proteína (Partearroyo *et al.*, 1995), ya que al disminuir la actividad de la tripsina pancreática, se reduce la disponibilidad de la proteína a lo largo del intestino. Los principales inhibidores de proteasas son el Inhibidor de la Tripsina (IT) y el Inhibidor de la Quimotripsina pancreática, presentando ambos un modo de acción similar (Annapurna y Prasad, 1991). Aunque la presencia de estos factores antinutritivos parece tener una función específica en la planta (Bond y Smith, 1989; Huisman *et al.*, 1992), su papel fisiológico no está claro, ya que se desconoce si su acción está dirigida fundamentalmente a proteasas endógenas o exógenas. Se han propuesto tres posibles funciones, como son almacenamiento de proteínas, agente regulador de la actividad de proteasas endógenas y protección del ataque de agentes nocivos (Liener y Kakade, 1980). Sin embargo, lo que sí se conoce con claridad es su papel de antinutriente, causando una disminución del crecimiento, hipertrofia pancreática y aumento de la síntesis y excreción de enzimas pancreáticas, lo que incrementa la demanda de aminoácidos azufrados que van a formar parte de estos enzimas y disminuye su biodisponibilidad para

el crecimiento de los tejidos (Liener, 1976, 1979; Hellsper *et al.*, 1993). El guisante posee 5.700-11.700 TIU (unidades de inhibidor de la tripsina)/g en las variedades de invierno, observándose una disminución en las variedades de verano (277-5.500 TIU/g) (Valdebouze *et al.*, 1980; Savage y Deo, 1989). El IT está formado por ocho péptidos conocidos, con un peso molecular entre 12.000 y 15.000 Daltons (Gaborit y Delort-Laval, 1989). En cuanto a la composición aminoacídica del IT, posee altos niveles de lisina, prolina, ácido aspártico y glutamina (Tomé y Gaborit, 1989).

El inhibidor de la tripsina, así como las demás fracciones de que se compone la proteína del guisante, pueden ser visualizadas mediante electroforesis. El fundamento de la electroforesis es la separación de las proteínas mediante la aplicación de un campo eléctrico, que será el responsable de su migración a través del gel, en el cual se deposita la muestra. Probablemente, la técnica más utilizada para analizar mezclas de proteínas es la electroforesis con dodecil sulfato sódico en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). En esta técnica, las proteínas se recubren con un detergente aniónico, el SDS, para formar complejos cargados negativamente. Mediante la electroforesis se pueden observar las fracciones que componen la proteína del guisante. La composición polipeptídica de la fracción albúmina y globulina fue comparada por Murray (1979) según las condiciones descritas por Weber y Osborn (1969). Fox *et al.* (1982) observaron mediante sistema no disociante de electroforesis en disco con buffer discontinuo, un total de veinticuatro bandas en la albúmina del guisante, probablemente debido a que la proteína utilizada se encontraba desnaturalizada o contaminada por otras. El uso de un agente disociante o detergente, como el SDS, y sobre gel de poliacrilamida, reduce el número de bandas electroforéticas a diez en este mismo alimento (Grant *et al.*, 1976; Murray, 1979), número que se puede incluso ver reducido a tan solo siete bandas si no se utilizan agentes disociantes

(Lásztity *et al.*, 1986). En cuanto a la relación albúmina:globulina en guisante, los datos bibliográficos son variables, ya que Beevers y Poulson (1972) observaron una relación de 1:1,5, Murray (1979) una de 1:1 y Schroeder (1982, 1984), sin embargo, de 1:3.

Con el objeto de mejorar las propiedades nutricionales, funcionales y sensoriales de la harina de guisante, para su uso en suplementación o enriquecimiento de otros productos, se han aplicado varios tratamientos tecnológicos, entre los que se encuentra el tratamiento térmico y la hidrólisis química. Sin embargo, existe una creciente demanda de los consumidores por alimentos considerados "naturales", y la industria alimentaria ha mostrado un gran interés por la utilización de enzimas naturales, frente a la utilización de la hidrólisis química, que mejoran las propiedades funcionales para la producción de ingredientes alimenticios, tales como emulsificadores, estabilizadores y agentes gelificantes (Roller y Swinton, 1990; Gunther Products, 1992). El enzima que ha demostrado mejor comportamiento en cuanto a velocidad de reacción y resultados de la misma, ha sido la preparación denominada comercialmente "Molsin", proteasa microbiana producida por *Aspergillus saitoi* (Fujimaki *et al.*, 1968). Los hidrolizados proteicos resultantes de la acción enzimática presentan numerosas aplicaciones en el campo de la nutrición especial. Algunos ejemplos son las fórmulas para niños con alergia alimentaria a la ingesta de proteína, cuya finalidad es disminuir la alergenicidad de las proteínas de la leche de vaca (Tormo, 1993), las fórmulas nutricionales especializadas para adultos con alto contenido en proteínas, en dietas especiales para personas de la tercera edad que generalmente tienen poco apetito, pero sus necesidades en nitrógeno y aminoácidos son las mismas que cuando eran jóvenes, aunque sus necesidades diarias de energía sí son más reducidas (Young, 1992), o en dietas para deportistas, donde los requerimientos proteicos aumentan durante y tras la realización del ejercicio,

necesitando tomar péptidos como componentes de bebidas refrescantes justo al terminar el esfuerzo (Frokjaer, 1994), para evitar balances negativos de nitrógeno además de mejorar la resíntesis de glucógeno muscular (Zawadzki, 1992), o como preparados dietéticos ricos en péptidos con alto valor biológico y pocas calorías en forma de bebidas, para dietas adelgazantes que no cumplen con las cantidades de proteína diarias recomendadas (Frokjaer, 1994). Otras posibilidades de utilización de estos hidrolizados son en *suplementos de dietas destinadas a una nutrición clínica*, como fosfopéptidos aislados a partir de hidrolizados de caseína, que actúan como sustancias potenciadoras de la absorción intestinal de calcio (Kitts y Yuan, 1992), o como suplementación proteica para proveer de nitrógeno fácilmente asimilable a algunas dietas, en casos de enteropatías hipoproteínemicas, tanto en niño como en adulto (Mahmoud, 1994).

MATERIAL Y MÉTODOS

Harina de guisante

Para la realización del presente estudio hemos utilizado guisantes (*Pisum sativum* L.) cultivado en Malpica de Tajo (Toledo), bajo la supervisión del Departamento de Agricultura de Hero España. El tipo de guisante estudiado fue de color verde oscuro y de semilla rugosa, en la variedad Warindo, clasificado comercialmente según el diámetro del grano entre 8,3-8,8 mm y denominado de calibre fino en función del mismo.

Tratamiento enzimático de la harina de guisante

El tratamiento enzimático de la harina se realizó con proteasa ácida de *Aspergillus saitoi* (Molsin), para mejorar el valor nutritivo y las propiedades funcionales de la misma. La técnica que se utilizó fue una modificación del método utilizado por Fujimaki *et al.* (1968) para la

proteína de soja. Las condiciones de temperatura, tiempo, pH y concentración enzima/substrato utilizadas fueron las siguientes: 40 °C, 1 hora y media, pH de 2,8 y 10 % de enzima (p/v), de acuerdo a los estudios previos realizados por Periago (1993). Transcurrido el tiempo de tratamiento se inactivó el enzima aumentando el pH hasta 6 con NaOH 1N y la temperatura a 100 °C durante 10 min. Posteriormente se procedió a una modificación de la técnica descrita por Periago (1993), liofilizando la harina con la fase líquida utilizada en la digestión, recuperando todos los compuestos solubles resultantes tras el proceso de hidrólisis enzimática.

Análisis del valor nutritivo

Determinación de Proteína Total

Para la determinación de la proteína Total (PT) se siguió la técnica de micro-Kjeldahl, método 955.04 de la AOAC (1990).

Determinación de aminoácidos totales

Se siguió el procedimiento descrito por Moore y Stein (1963) y Beilstein *et al.* (1991) para la determinación de aminoácidos, usando un analizador de aminoácidos LKB Alpha Plus (Pharmacia LKB Biochrom Ltd., Cambridge, Inglaterra).

Determinación de triptófano

Para la determinación del triptófano se siguió la técnica de hidrólisis básica seguida de cuantificación colorimétrica descrita por Sastry y Tumuru (1985).

Determinación de la digestibilidad in vitro de la proteína (DIVP)

Se determinó según el procedimiento descrito por Satterlee *et al.* (1982), comparándola con una muestra patrón de caseína. Una canti-

dad de muestra con un contenido en nitrógeno de 10 mg se mezcló con 10 ml de agua destilada desionizada, agitando durante 1 hora hasta la obtención de una dispersión homogénea. La muestra fue sometida a una doble digestión enzimática: la primera a 37 °C durante 10 min con una solución enzimática a base de tripsina pancreática porcina (17,46 mg/10 ml), quimotripsina pancreática bovina (46,5 mg/10 ml) y peptidasa intestinal porcina (10,40 mg/10 ml); la segunda digestión se realizó a 55 °C durante 9 min con pronasa bacteriana "P" o "E" (16,25 mg/10 ml). La digestibilidad *in vitro* se valoró en función de la variación del pH de las muestras medido a 37 °C, a los 20 min. Los valores obtenidos fueron comparados con un patrón de caseína, con la que se debe obtener un pH final de $6,42 \pm 0,05$. El porcentaje de DIVP es obtenido aplicando la ecuación $DIVP (\%) = 234,84 - 22,56 X$, donde X es el pH medido a los 20 min de finalizar la digestión enzimática.

Determinación de la actividad del inhibidor de la tripsina (IT)

La actividad del inhibidor de la tripsina fue determinada mediante el procedimiento de Bacon *et al.* (1995). 30 mg de muestra disueltos en

3 ml de HCl 0,009 M fueron agitados durante 1 hora a 20 °C. Posteriormente se centrifugó a 10.000 g durante 20 min a 20 °C y se recogió el sobrenadante, del cual se prepararon las siguientes disoluciones: solución de Tripsina (10 mg de tripsina bovina y 500 ml de HCl 0,001 M), solución de sustrato sintético del enzima o solución BAPNA [1 ml de una solución de 400 mg de BAPNA (Sigma nº B4875) y 20 ml de dimetilsulfóxido, disueltos en 50 ml de CaCl₂ 20 mM y Tris-HCl 50 mM pH 8,2, durante 30 minutos], y por último, ácido acético al 30 %. El desarrollo de la técnica se muestra en el cuadro 1.

Electroforesis

Se determinó siguiendo un procedimiento modificado de la técnica descrita por Weber y Osborn (1969) y Laemmli (1970). Se aplicaron las siguientes condiciones: gel de separación al 10 %, constituido por 1,036 ml de agua desionizada, 1,134 ml de la solución de acrilamida y bisacrilamida, 0,852 ml de tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 0,340 ml de SDS al 1 %, 0,036 ml de persulfato amónico y 0,002 ml de TEMED. Transcurridos 30 min se incorporó el gel de carga al 4 %, constituido por 0,4 ml de

Cuadro 1. Esquema del desarrollo de la determinación de IT

ml	T1*	T2	T3	T4	T5	Bm	Bo
Sobrenadante	0	0.5	1	1.5	2	2	-
Agua	2	1.5	1	0.5	0	-	2
Sol. Tripsina	2	2	2	2	2	-	-
BAÑO a 37 °C/10 min							
Sol. BAPNA	5	5	5	5	5	5	5
BAÑO a 37 °C/10 min							
Ac. Acético 30 %							
Sol. Tripsina							

*T1, T2, T3, T4 y T5 son diferentes disoluciones para la obtención de una recta patrón, Bm es el blanco de la muestra y Bo es el autocero.

agua desionizada, 0,267 ml de solución de acrilamida y bisacrilamida, 1 ml de tampón Tris HCl 125 mM pH 6,8, 0,2 ml de SDS, 0,135 ml de persulfato amónico y 0,005 ml de TEMED. Voltaje constante a 180 V y 40 mA, durante 40-50 min. El patrón utilizado para determinar los pesos moleculares de las proteínas problema de las muestras fue un marcador de bajo peso molecular (en Daltons): lactoalbúmina 14.400 D, inhibidor de la tripsina de soja 20.100 D, anhidrasa carbónica 30.000 D, ovoalbúmina 43.000 D, albúmina sérica bovina 66.000 D y fosforilasa b 94.000 D. 3 mL de este patrón se inyectaron en el primer pocillo excavado en el gel de acrilamida. La cantidad de proteína necesaria para obtener una buena definición es de 6 mg. Cada muestra fue inyectada por sí sola en un pocillo y disuelta en 2-mercaptoetanol en otro pocillo, con el objeto de observar si este agente disociante permite una mejor definición de las fracciones proteicas. Finalmente, se procedió a la tinción de las proteínas en una solución de azul Coomassie (40 ml de metanol, 10 ml de ácido acético glacial, 50 ml de agua desionizada y 0,1 g de azul de Coomassie) durante 30 minutos en agitación, y posterior lavado en solución de destinción (idéntica composición excepto azul de Coomassie) durante otros 30 min. Para el cálculo del peso molecular de las bandas electroforéticas se representó el logaritmo decimal de los PM del estándar frente a su movilidad relativa ($R_f = \text{distancia total del gel de separación y la distancia a cada banda, en cm}$), obteniendo una curva patrón. Mediante su ecuación de regresión calculamos los PM de todas las proteínas problema presentes en el gel. La ecuación de la curva patrón fue $y = 0,19275 + 0,047438x$ ($R^2 = 0,997$).

Estudio estadístico

Para el estudio estadístico de los resultados obtenidos se realizó en primer lugar un análisis de varianza unifactorial (ANOVA) empleando intervalos de confianza del 95 %, 99 % y 99,9%,

con el fin de verificar la presencia de diferencias significativas entre los valores medios obtenidos como resultado de los parámetros estudiados en la harina de guisante sin y con tratamiento. Una vez rechazada la hipótesis de igualdad entre medias para las distintas muestras, se realizó un test de separación de medias con intervalos de confianza al 95 %, según la técnica de Tuckey. Para el análisis de la relación existente entre las distintas variables se efectuó un análisis de correlación de Pearson. El paquete estadístico utilizado fue SYSTAT para Windows versión 5.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del tratamiento enzimático sobre las proteínas de la harina de guisante

Valor nutritivo

El tratamiento enzimático aplicado fue determinante ($p < 0,001$ o $p < 0,05$) en todos los parámetros, excepto para la Proteína Total en donde no se apreciaron diferencias significativas (Cuadro 2). Los valores de PT analizados fueron 23,87 y 26,94 % en las harinas tratada y sin tratar, respectivamente. En general, la proteína total en guisantes varía en función de la variedad, el tamaño y factores genéticos y medioambientales (Savage y Deo, 1989; Ros y Rincón, 1990). Los valores obtenidos en este estudio coinciden con los observados por Periago *et al.* (1996) para el guisante crudo, variando en función del cultivo y calibre de las muestras analizadas (desde 26,23 % para el cultivo Warindo calibre extrafino, hasta 30,61 % para el cultivo Citrina calibre muy fino).

Para conocer el valor nutritivo de la proteína es también necesario conocer en qué medida ésta es asimilable por el organismo. Para ello, se analizó la Digestibilidad *In Vitro* de la Proteína (DIVP) en las dos harinas, tratada y no tratada enzimáticamente, y que de forma gene-

ral se encuentra influida por constituyentes no proteicos que modifican su digestión y asimilación (fibra dietética, polifenoles, ácido fítico, inhibidor de la tripsina) (Nielsen, 1991). En los hidrolizados proteicos se consigue un mayor aprovechamiento de la proteína al liberarse péptidos de bajo peso molecular ($PM < 1.000$) y aminoácidos libres que son fácilmente asimilables por el organismo (López Hernández *et al.*, 1977; Amiot, 1979). Según datos recogidos en la bibliografía científica, Savage y Deo (1989) y Periago *et al.* (1996) observaron que la DIVP en el guisante crudo oscila entre 78,7 y 84,8 %, dependiendo de la variedad, el calibre y grado de madurez. Sin embargo, en nuestro estudio, la DIVP se vio afectada significativamente ($p < 0,05$) tras el tratamiento enzimático; disminuyendo desde un 82,3 % en la harina sin tratar, hasta un 71 % en la harina con tratamiento. Estos resultados pueden tener dos explicaciones: por un lado, que la fracción de proteína verdadera resultante de la hidrólisis fuera más resistente a la acción de las enzimas (tripsina, quimotripsina, peptidasa y pronasa) utilizadas en el ensayo de DIVP, y disminuya por tanto, la capacidad de asimilación de la proteína; o por otro lado, que la técnica en sí de DIVP consiste en la detección de una variación de pH desde básico a ácido tras la acción de las enzimas empleadas en el análisis, consecuencia de la liberación de grupos carboxilo ácidos que bajan el pH. Si la harina ya se encuentra hidrolizada, el pH de la harina tratada será de entrada más ácido que el de la no tratada, por lo que la diferencia de pH será menos evidente y también por tanto, menor el valor final de digestibilidad (ver técnica en apartado de Material y Métodos). Consecuencia de estos resultados, podemos concluir que, en el caso de los hidrolizados proteicos, quizás fuera más conveniente tener en cuenta la digestibilidad *in vivo*, o al menos comparar ambos métodos, debido a que los resultados de la DIVP pueden estar infravalorando la verdadera digestibilidad de los hidrolizados,

ya que cabe esperar un mayor aprovechamiento de la proteína al incrementar los péptidos, los dipéptidos y aminoácidos libres.

El inhibidor de la tripsina (IT) es el inhibidor mayoritario de las proteasas en el guisante y uno de los principales factores antinutritivos (Savage y Deo, 1989; Savelkoul *et al.*, 1992). Cuando la tripsina es inhibida, las proteínas no son digeridas adecuadamente y los aminoácidos no se encuentran disponibles para contribuir a las necesidades del crecimiento (Savage y Deo, 1989; Larralde y Martínez, 1989). Según della Gatta *et al.* (1987), el IT es el principal responsable de la baja digestibilidad de las leguminosas insuficientemente cocinadas, ya que el calor reduce la actividad del IT (Savage y Deo, 1989; Estévez *et al.*, 1991; Ros y Rincón, 1992; Carvalho y Sgarbieri, 1997; Saikia *et al.*, 1999). En la harina de guisante sin tratamiento de nuestro estudio, el contenido de IT fue de 4,54 UIT/mg, mientras que en la harina tratada enzimáticamente el IT fue sólo de 3,02 UIT/mg. Diferentes autores consideran que el IT no sólo está relacionado con la DIVP, sino que esta relación es negativa, pudiendo estar este antinutriente implicado en la reducción de la calidad nutritiva de la proteína de leguminosas (Owusu-Ansah y McCurdy, 1991; Martínez *et al.*, 1998). En cambio, Ros y Rincón (1991) y Periago *et al.* (1996) no observaron dicha correlación en el guisante. En nuestro caso, los resultados obtenidos coinciden con estos últimos autores, ya que se observó un coeficiente de correlación positivo de $r = 0,814$. La harina no tratada presentó contenidos mayores de DIVP y de IT que sus respectivos valores en la harina tratada, por lo que podemos concluir que el tratamiento enzimático influyó sobre la calidad de la proteína, reduciendo los factores antinutritivos, aunque también la digestibilidad, recordando, como se ha mencionado anteriormente, que la técnica *in vitro* quizá debería complementarse con la técnica *in vivo*.

Efecto sobre el perfil aminoacídico

Los aminoácidos esenciales y no esenciales del guisante antes y después del tratamiento se muestran en la Figura 1. El contenido de todos los aminoácidos analizados en nuestras muestras no se vio influenciado por el tratamiento enzimático ($p > 0,05$). En general, el guisante es un vegetal rico en aminoácidos, sobre todo en lisina, aunque, por el contrario, es deficiente en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y triptófano (Holt y Sosulski, 1979; FAO, 1982; FAO/OMS/ONU, 1985). Según Holt y Sosulski (1979) el contenido total de aminoácidos en el guisante aumenta cuando el porcentaje de nitrógeno total es mayor. En concreto, estos autores observaron que la arginina y el ácido aspártico son dos aminoácidos que aumentan conforme aumenta el nitrógeno total y que, sin embargo, disminuye el contenido en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína), isoleucina, alanina, lisina, treonina y glicina. En nuestro estudio, tras el tratamiento enzimático, que fue acompañado de una reducción del nitrógeno total, desde 4,31 % en la harina sin tratar y 3,81 % en la harina tratada enzimáticamente (datos no mostrados); se observó que los valores de los aminoácidos descritos anteriormente se mantuvieron prácticamente inalterados y las diferencias no fueron significativas ($p < 0,05$).

En relación al perfil de aminoácidos de la proteína de guisante recogido en la Figura 1 y desde un punto de vista cuantitativo, el ácido glutámico presentó netamente los contenidos más elevados, tanto en la harina sin tratamiento como con tratamiento enzimático (117,2 y 119,8 mg/g de proteína, respectivamente), coincidiendo estos resultados con los reportados por Lee *et al.*, (1982), seguido de la leucina (57,9 y 61,9 mg/g de proteína) y la lisina (53,0 y 56,6 mg/g). Los aminoácidos que presentaron contenidos más bajos fueron la histidina (8,5 y 10,0 mg/g de proteína para la harina sin tratamiento y con tratamiento, respectivamente) y los aminoácidos azufrados: metionina (9,8 y 1,3 mg/g de protei-

na) y cisteína (6,2 y 7,3 mg/g de proteína), que son los aminoácidos limitantes en las leguminosas. Es por ello que, según la FAO (1982), la incorporación de otros ingredientes en la dieta como los cereales, cobrarían importancia por su aporte en aminoácidos azufrados. De hecho, se ha comprobado que consumir cereales y leguminosas en la misma comida aumenta la calidad de la proteína. Nuestros resultados coinciden con los recogidos en la bibliografía científica por otros autores, que observaron que el perfil aminoacídico del guisante satisfacía los requerimientos humanos excepto en aminoácidos azufrados (Holt y Sosulski, 1979; Singh *et al.*, 1981b; Leterme *et al.*, 1990).

Determinación del cómputo de aminoácidos o marcador aminoacídico (M.A.) corregido en función de la digestibilidad de la proteína

Para la determinación de este cómputo son necesarios los datos de composición aminoacídica, digestibilidad de las proteínas y proteína total. En este estudio se utilizaron los datos analíticos de composición de aminoácidos esenciales de las dos muestras problema y de proteína total (Cuadro 2), los requerimientos humanos en proteína (Cuadro 3), mientras que para la digestibilidad se tomó nuestro dato analítico obtenido *in vitro* y el dato *in vivo* en ratas aportado por Mc Donough *et al.* (1990b) y Eggum (1973) (Cuadro 4). El M.A. se define como el cociente entre cantidad aminoácido esencial (mg) en 1 g de proteína de guisante y los requerimientos (mg) del mismo aminoácido. Se calculó el M.A. de los nueve aminoácidos esenciales, mediante la distribución de necesidades de aminoácidos de referencia propuesta para niños de 2-5 años (FAO/OMS/ONU, 1985; FDA, 1993; Henley y Kuster, 1994), ya que, aunque se trate de adultos, según el Comité del Codex sobre Proteínas Vegetales (CCVP) y la FAO/OMS (1992) es improbable que con la edad se produzca una disminución marcada de las necesidades de aminoácidos, así como es difícilmente

Cuadro 2. Valor nutritivo de la harina de guisante¹

Parámetros	Harina sin tratamiento	Harina con tratamiento
PT (%)	26,94 ± 0,30 ^a	23,87 ± 1,91 ^a
DIVP (%)	82,30 ± 0,70 ^a	71,00 ± 1,73 ^b
IT (TIU)	4,54 ± 0,07 ^a	3,02 ± 0,14 ^b

¹ Media ± desviación típica de tres determinaciones. Diferentes letras, dentro de la misma fila son estadísticamente significativas (p<0,05).

PT: Proteína Total

DIVP: Digestibilidad *In Vitro* de la Proteína

IT: Inhibidor de la Tripsina

Cuadro 3. Patrones de requerimientos de aminoácidos en adultos comparados con la composición de las proteínas de alta calidad

Aminoácidos	Patrón*		Composición (mg/g de proteína)			
	2-5 años	Adultos	Leche humana	Huevo de gallina	Leche de vaca	Carne de res
Hys	19	16	26	22	27	34
Ile	28	13	46	54	47	48
Leu	66	19	93	86	95	81
Lys	58	16	66	70	78	89
Met+cys	25	17	42	57	33	40
Phe+Tyr	63	19	72	93	102	80
Thre	34	9	43	47	44	46
Trp	11	5	17	17	14	12
Val	35	13	55	66	64	50
Total sin Hys	320	111	434	490	477	445

*Adaptado de FAO/OMS/ONU (1985) por Mahan y Escott-Stump (1998).

concebible que las necesidades de nitrógeno para mantenimiento varíen de forma sustancial (Cuadro 3). Cuando el marcador aminoacídico es igual a 1 o superior se considera que los requerimientos están cubiertos, mientras que cuando el valor obtenido es inferior a 1 se considera que no cubre totalmente las exigencias. El aminoácido que presente el menor M.A. es el aminoácido limitante de ese alimento. En nuestro caso, tanto para las harinas de guisante con o sin tratamiento enzimático, dicho aminoácido fue la histidina (Figura 1). La histidina es un

aminoácido sólo esencial para niños, no para adultos, por lo que para la población adulta los aminoácidos limitantes de esta proteína serían los azufrados (metionina y cisteína).

En relación con los datos de la FAO (1985) referentes a requerimientos humanos de aminoácidos que se muestran en el Cuadro 4, los contenidos en isoleucina, lisina (solo en la harina con tratamiento enzimático), triptófano y valina de las harinas problema se mostraron por encima del valor requerido. El guisante es una fuente importante de lisina (Kay, 1985), sin

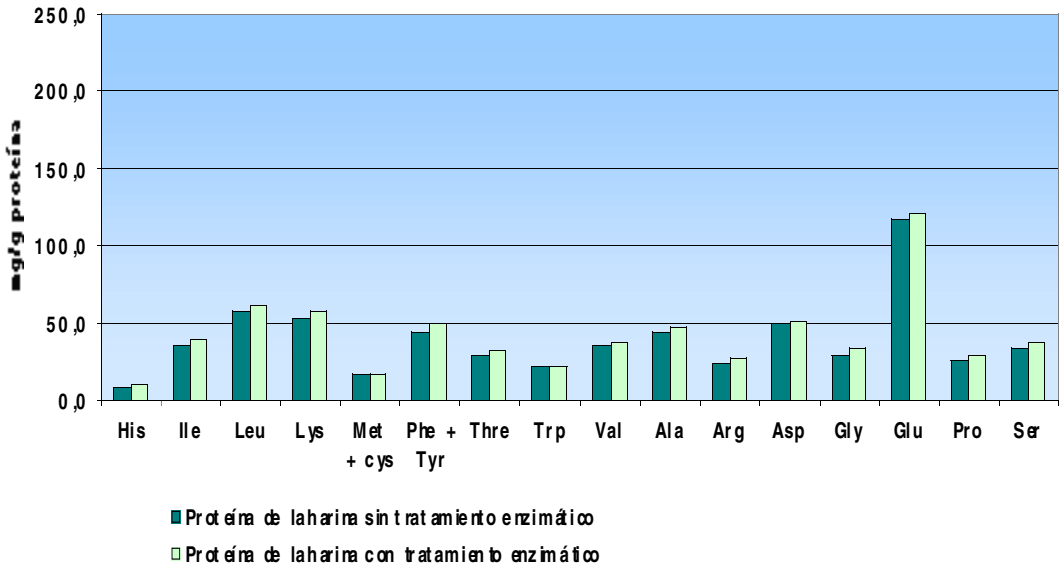


Figura 1. Perfil aminoacídico de la proteína de guisante de las harinas problema.

embargo, se muestra deficiente en histidina, leucina, azufrados, fenilalanina+tirosina y treonina. A pesar de que la bibliografía científica (Mossé *et al.*, 1987; Leterme *et al.*, 1990) nos muestra al triptófano como aminoácido limitante, en nuestro estudio no se observó tal deficiencia (Cuadro 4). Según estos resultados podemos decir que la proteína de guisante aporta cantidades suficientes de la mayoría de los aminoácidos esenciales requeridos por los humanos, a excepción de histidina, aminoácidos azufrados (metionina+cisteína) y fenilalanina+tirosina, cuyos marcadores, pese a estar próximos a 1, presentaron valores aún inferiores al contenido requerido.

Tal y como hemos mencionado al comienzo de esta sección, el Cómputo de Aminoácidos o Marcador Aminoacídico Corregido en función de la Digestibilidad de la Proteína se calcula multiplicando el M.A. del aminoácido limitante (g/100 g) por la digestibilidad real de la proteína. En nuestro caso los valores de histidina (0,6 g/100 g de proteína en HST, 0,7 g/100 g de

proteína en HCT) fueron multiplicados por la digestibilidad real de la proteína de las harinas de guisante (88 %), obtenida mediante el método del balance en rata (Eggum, 1973; McDonough *et al.*, 1990b). El Cómputo de Aminoácidos Corregido en función de la Digestibilidad en porcentaje puede observarse en la Cuadro 5. No se observaron diferencias en este cómputo entre la harina tratada y no tratada, debido a que el M.A. de la histidina fue similar en ambas muestras. Al hacer este mismo cálculo utilizando los resultados de digestibilidad *in vitro* obtenidos en este estudio, el Cómputo para cada tipo de harina sí mostró diferencias, al disponer de datos de DIVP para cada una de las muestras. El Cómputo de la muestra tratada resultó menor que el de la muestra sin tratamiento (6 %), debido a que la digestibilidad *in vitro* fue ligeramente inferior por los motivos ya explicados anteriormente. Sin embargo, si tenemos en cuenta que la histidina no es un aminoácido limitante en adultos, debemos calcular este Cómputo con el resultado obtenido

Cuadro 4. Contenido aminoacídico (mg/g de proteína) y Marcador aminoacídico (M.A.) de las harinas de guisante sin tratar y tratada

	Aminoácidos esenciales en HST**	Aminoácidos esenciales en HCT***	Requerimientos humanos*	M.A. en HST**	M.A. en HCT***
	His	8,5	10,0	19,0	0,5
Ile	36,0	39,0	28,0	1,3	1,4
Leu	58,0	62,0	66,0	0,9	0,9
Lys	53,0	57,0	58,0	0,9	1,0
Met+cys	16,2	17,0	25,0	0,6	0,7
Phe+tyr	44,0	50,0	63,0	0,7	0,8
Tre	29,0	32,0	34,0	0,9	0,9
Trp	22,6	22,7	11,0	2,1	2,1
Val	35,0	38,0	35,0	1,0	1,1

* FAO/OMS/ONU (2-5 años) (1985) aplicada según el CCVP a las necesidades de adultos y niños.

**HST: Harina de guisante Sin Tratamiento.

***HCT: Harina de guisante Con Tratamiento.

Cuadro 5. Marcador Aminoacídico Corregido en función de la Digestibilidad (HST: Harina de guisante Sin Tratamiento. HCT: Harina de guisante Con Tratamiento)

		MACDP		
	Aminoácido Limitante	M.A.	<i>In vivo</i> *	<i>In vitro</i> **
HST	His	0,5	44 %	41 %
HCT	His	0,5	44 %	35 %
HST	Met + Cys	0,6	52,8 %	49,2 %
HCT	Met + Cys	0,7	61,6 %	50,2 %

*MACDP obtenido con datos de digestibilidad *in vivo*.

** MACDP obtenido con datos de digestibilidad *in vitro*.

para aminoácidos azufrados. En este caso, el Cómputo resultó superior en la muestra con tratamiento (8,8 %) lo que nos permite afirmar que la proteína de la harina tratada presentó una calidad mayor que la proteína de la harina no tratada. Utilizando los resultados de DIVP obtenidos en este estudio, observamos que el resultado es muy similar, en el sentido de que el cómputo de la muestra tratada continúa siendo ligeramente mayor (1 %) al de la no tratada. Podemos considerar por tanto que, aunque el Cómputo obtenido con datos de DIVP fue infe-

rior al obtenido con datos de Digestibilidad *in vivo*, es un método válido para utilizar en la determinación de dicho Cómputo y en la evaluación de la calidad de la proteína.

Caracterización electroforética de las harinas

En la Figura 2 aparecen las bandas electroforéticas representativas de la proteína de las harinas problema comparadas con el patrón estándar. El pocillo A corresponde al patrón estándar, encontrándose a continuación los per-

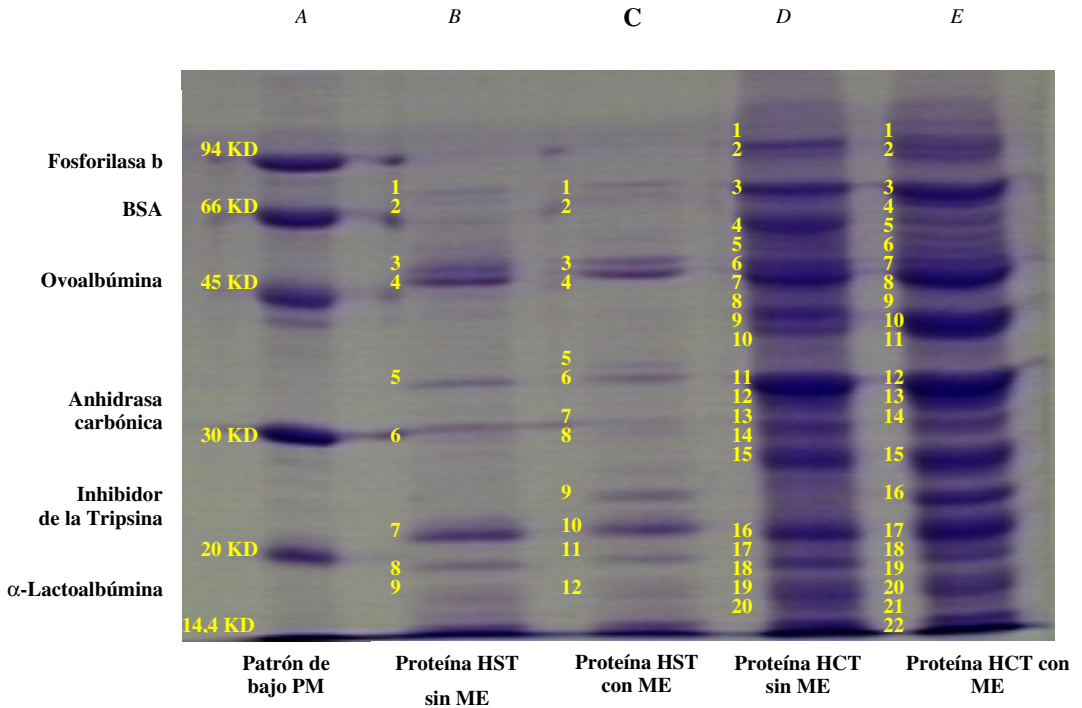


Figura 2. Imagen electroforética de la proteína de las harinas problema. HST: harina de guisante sin tratamiento enzimático. HCT: harina de guisante con tratamiento enzimático. ME: 2-Mercaptoetanol.

files electroforéticos de la proteína del guisante obtenidos con el método SDS-PAGE. Las seis bandas que incluye este patrón son seis proteínas de bajo peso molecular, desde 14,4 hasta 94 kD. En los pocillos B y C se inyectó proteína de guisante sin tratamiento enzimático, sin y con 2-mercaptoetanol (ME), respectivamente, y en los pocillos D y E se situó la harina tratada enzimáticamente (HCT), sin y con ME. Las muestras problema de este estudio incluyen SDS como agente disociante, ya que el método SDS-PAGE permite la estimación del peso molecular de polipéptidos y péptidos en el hidrolizado de la proteína (Kim y Barbeau, 1991). En las proteínas sin tratamiento enzimático (pocillos B y C), las bandas observadas fueron nueve y doce, respectivamente, pero no coincidieron todas a la misma altura, lo que indica que presentaron

diferentes pesos moleculares y, por tanto, que se trata de diferentes fracciones proteicas. Las diferencias empiezan a observarse en la banda nº 5 de la proteína HST sin ME, ya que la proteína HST con ME presentó dos bandas en esa zona, correspondiéndose con un peso molecular de 38 y 36 kD. Algo similar ocurrió con la banda nº 6 del pocillo B, de 31 kD, mientras que en el pocillo C hay dos bandas de 31 y 30 kD. La proteína HST con ME presenta otra banda, la nº 9 de PM 24 kD, que no presenta la proteína de HST sin ME. A la altura del inhibidor de la tripsina de la soja (IT) en el patrón (20 kD), observamos que en los pocillos B y C aparecen desdobladas dos bandas del mismo peso molecular. Esto podría explicarse debido a la acción del ME, que rompe las proteínas a nivel de los puentes disulfuro en péptidos

más pequeños, dando lugar a un mayor número de bandas.

En cuanto a la harina tratada enzimáticamente, el número de bandas que se puede observar aumenta hasta veinte en la harina sin ME (pocillo D) y a veintidós en la harina con ME (pocillo E). Con el efecto de la proteasa de *Aspergillus saitoi* y el ME se consigue una imagen electroforética con mayor número de bandas, ya que se suma la acción de ambas sobre las proteínas, siendo el desdoblamiento superior, obteniendo polipéptidos caracterizados independientemente. Es evidente el efecto que ejerce el ME como agente disociante, ya que aumentó el número de bandas observadas de nueve a doce en la harina sin tratamiento enzimático y de veinte a veintidós en la harina tratada. Clemente *et al.* (2000) observaron una relación positiva entre la acción del ME y el aumento de la digestibilidad *in vitro* de la proteína. De cualquier forma, el tratamiento enzimático de la harina de guisante en sí produce un fraccionamiento de las proteínas, duplicando prácticamente el número de bandas total en la imagen electroforética.

CONCLUSIONES

El valor nutritivo de la proteína de guisante no se vio afectado cuantitativamente por el tratamiento enzimático, aunque sí cualitativamente. El contenido en proteína total y aminoácidos esenciales no varió tras la hidrólisis, sin embargo el inhibidor de la tripsina, antinutriente propio del guisante, se vio reducido significativamente, lo que mejora la calidad de la proteína. Sin embargo, la digestibilidad *in vitro* no aumentó como cabría esperar según muestran estudios *in vivo*, sino que disminuyó, probablemente debido al fundamento en sí de la técnica. La imagen electroforética de la harina hidrolizada muestra un aumento de las fracciones proteicas de menor peso molecular, sobre todo en aquéllas con 2-mercaptoetanol, por lo que sería interesante determinar el efecto de la

adición de este agente disociante sobre la digestibilidad de la proteína.

AGRADECIMIENTOS

A Hero España, S.A., por el suministro de las muestras y su colaboración para la obtención de la Beca de Investigación de Movilidad de Investigadores y Tecnólogos concedida por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MT-1999-229010415).

BIBLIOGRAFÍA

- Amiot J. 1979. Contribution a l'étude de la cinétique de digestion des protéines alimentaires d'origine animale et végétale. Thèse de Doctorat. Université Laval, Québec, Canada.
- Annapurna S.S., Prasad D.S. 1991. Purification of trypsin/chymotrypsin inhibitor from jack fruit seed. J. Sci. Food Agric. 54: 399-411.
- A.O.A.C. (1990). Official methods of analysis (14th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C., U.S.A.
- Bacon J.R., Wanigatunga J.A., Fenwick G.R. 1995. A microassay for the analysis of trypsin inhibitor activity in peas. Food Chem. 52: 77-80.
- Beevers L., Poulson R. 1972. Protein synthesis in cotyledons of *Pisum sativum* L. I. Changes in cell-free amino acid incorporation capacity during seed development and maturation. Plant Physiol. 49: 476-481.
- Beilstein M.A., Whanger P.D., Yang G.Q. 1991. Chemical forms of selenium in corn and rice grown in a high selenium area of China. Biomed. Environ. Sci.: 392-398.
- Bhatty R.S., Christison G.I. 1984. Composition and nutritional quality of peas (*Pisum sativum* L.), faba bean (*Vicia faba* L. spp. *Minor*) and lentil (*Lens culinaris* Medik.) meals, protein concentrates and isolates. Qual. Plantarum- Plant Food Hum Nutr. 34: 41-51

- Bond D.A., Smith D.E. 1989. Recent advances in antinutritional factors in legume seeds, Pudoc. Wageningen. Holanda.
- Cantoral R., Fernández-Quintela A., Martínez A., Macarulla T. 1995. Estudio comparativo de la composición y el valor nutritivo de semillas y concentrados de proteína de leguminosas. Arch. Lat. Nutr. 3 (45): 242-248.
- Carvalho M.R., Sgarbieri V.C. 1997. Heat treatment and inactivation of trypsin-chymotrypsin inhibitors and lectins from beans (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Food Chem. 21 (3): 219-233.
- Chang K.C., Satterlee L.D. 1981. Isolation and characterization of the major protein from great northern beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Food Sci. 46: 1368-1372.
- Clemente A., Vioque J., Sánchez-Vioque R., Pedroche J., Bautista J., Millán F. 2000. Factors affecting the in vitro digestibility of chickpea albumins. J. Sci. Food Agric. 80: 79-84.
- della Gata C., Piergiovanni A.R., Perrino P. 1987. An improved method for the determination of trypsin inhibitor levels legumes. Lebensm-Wiss. Technol. 21: 315-318.
- Egumm B.O. 1973. A study of certain factors influencing protein utilization in rats and pigs. Pub. 406, Nat. Inst. Anim. Sci., Copenhagen.
- Elkowicz K., Sosulski F.W. (1982). Antinutritive factors in eleven legumes and their air-classified protein and starch fractions. J. Food Sci. 47: 1301-1304.
- Estévez A.M., Castillo E., Figuerola F., Yáñez E. 1991. Effect of processing on some chemical and nutritional characteristics of pre-cooked and dehydrated legumes. Plant Food Hum. Nutr. 41 (3): 193-201.
- FAO/OMS. 1973. Energy and protein requirements OMS. FAO Nutritional Meeting Report Series n° 52. Technical Report Survey, n° 522.
- FAO. 1982. Las leguminosas en la nutrición humana. FAO, Roma: Estudio FAO, Alimentación y Nutrición, 20.
- FAO/OMS/ONU. 1985. Energy and proteins requirements. Report of a Joint FAO/OMS/ONU Expert Consultation. Technical Report Series 724. Geneva, World Health Organization.
- FAO/OMS. 1992. Evaluación de la calidad de las proteínas. Informe de una consulta FAO/OMS de expertos en evaluación de la calidad de las proteínas. Roma: Estudio FAO, Alimentación y Nutrición.
- FDA. 1993. Food Labeling; General Provisions; Nutrition Labeling; Label Format; Nutrient and Content Claims; Health Claims; Ingredient Labeling; State and Local Requirements and Exemptions; Final Rules. Food and Drug Administration, Fed. Reg. 58 (3): 2101-2106.
- Fernández-Quintela A., Macarulla M.T., del Barrio A.S., Martínez J.A. 1997. Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. Plant Food Hum. Nutr. 51: 331-342.
- Fox P.F., Morrisey P.A., Mulvihill D.M. 1982. Chemical and enzymatic modification on Food proteins. En: "Developments in food proteins-1". Ed. Applied Science Publishers LTD. Essex, Inglaterra, pp. 1-60.
- Frokjaer S. 1994. Use of hydrolysates for protein supplementation. Food Technol. 48 (10): 86-88.
- Fujimaki M., Kato H., Arai S., Tamaki E. 1968. Applying proteolytic enzymes on soybean. 1. Proteolytic enzyme treatment of soybean protein and its effect on the flavor. Food Tech 7: 77-81.
- Gaborit T., Delort-Laval J. 1989. Trypsin inhibitors from *Pisum sativum* L. exhibit identical epitopes. J. Sci. Food Agric. 48: 15-27.
- Giacco A., Ricardi G. 1991. Comparison of current eating habits. En: The Mediterranean

- diets in health and disease. Ed. G.A. Spiller. Van Nostrand Reinhold, Nueva York, 3-9.
- Grant DR, Summer AK, Johnson J. 1976. An investigation of pea seed albumins. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 2 (9): 84-91.
- Gunther Products, Inc. 1992. Technical brochure, chemistry and characteristics of enzyme-modified whipping proteins. Gunther Products, A.E. Staley Manufacturing Co., Galesburg, III.
- Hellsper J.P.F., Hoogendijk J.M., Norel A., Burguer-Meyer K. 1993. Antinutritional factors in faba beans (*Vicia faba* L.) as affected by breeding toward the absence of condensed tannins. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1058-1061.
- Henley E.C., Kuster J.M. 1994. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino acid scoring. *Food Technol.* 4: 74-77.
- Holt N.W., Sosulki F.W. 1979. Amino acid composition and protein quality of field peas. *Can. J. Plant Sci.* 61: 515-523.
- Huisman J., Tolman G. 1992. Recent advances in animal nutrition. Ed. Butterworth-Heinemann. Elsevier Science/Harcourt, 200 Wheeler Road, Burlington MA 01803, USA.
- Kay D.E. 1985. Legumbres Alimenticias. Ed. Acibria, S.A. Zaragoza, España, pp. 299-327.
- Kim Y.A., Barbeau W.E. 1991. Evaluation of SDS-PAGE method for estimating protein digestibility. *J. Food Sci.* 56 (4): 1082-1086.
- Kitts D.D., Yuan Y.V. 1992. Caseinophosphopeptides and calcium bioavailability. *Trends Food Sci. Tech.* 3: 31-35.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Larralde J., Martínez J.A. 1989. A reappraisal of the nutritional utilization of legumes. *Rev. Esp. Fisiol.* 45 (suppl): 225-232.
- Lásztity R., El Morsi Ea., Abd-El Samei Mb., El Sayed Ae., Ismaeil Ha. 1986. Fractionation and characterization of *Pisum sativum* globulins. *Acta Alimentaria* 3 (15): 165-174.
- Lee C.Y., Parsons G.F., Downing D.L. 1982. Effects of processing on amino acid and mineral contents of peas. *J. Food Sci.* 47: 1034-1035.
- Leterme P., Monmart T., Baudart E. 1990. Amino acid composition of pea (*Pisum sativum*, L.) proteins and protein profile of pea flour. *J. Sci. Food Agr.* 53: 107-110.
- Liener I.E. 1976. Legume toxins in relation to protein digestibility: a review. *J. Food Sci.* 41: 1076-1081.
- Liener I.E. 1979. Significance for humans of biologically active factors in soybeans and other food legumes. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56: 121-129.
- Liener I.E., Kakade M.L. 1980. Protease inhibitors. En: "Toxic Constituents of Plant Foodstuff, 2ª ed". Eds. I.E. Liener, New York, Academic press.
- López Hernández J., Paz H., Adris J. 1977. Enzymatic hydrolysis of soybean protein using papaina. *Rev. Agro. Nor. Arg.* 14: 161-174.
- Mahan L.K., Escott-Stump, S. 1998. Nutrición y Dietoterapia, de Krause. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. México.
- Martínez C., Ros G., Periago M.J., López G., Ortuño J., F. Rincón. 1996. El ácido fítico en la alimentación humana. *Food Sci. Tech. Int.* 2: 201-209.
- Martínez C., Ros G., Periago M.J., Ortuño J., López G., Rincón F. 1998. In vitro protein digestibility and mineral availability of green beans (*Phaseolus vulgaris* L) as influenced by variety and pod size. *J. Sci. Food Agr.* 77: 414-420.
- Mossé J., Huet J., Baudet A. 1987. Changement de la composition en acides aminés des grains de pors en fonction de leur taux d'azote. *Sci. Alim.* 7: 301-324.
- McDonough F.E., Sarwar G., Steinke F.H., Slump P., Garcia S., Boisen S. 1990a. *In vitro* assay for protein digestibility: interlaboratory study, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73: 622-625.

- McDonough F.E., Steinke F.H., Sarwar G., Eggum B.O., Bressani R., Huth P.J., Barbeau W.E., Mitchell G.V., Phillips J.G. 1990b. *In vivo* rat assay for true protein digestibility: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73: 801-805.
- Mahmoud M.I. 1994. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technol.*: 89-95.
- Moore S and Stein W H 1963 Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. En: *Methods Enzymol.* 6. Eds. Colwick S P y Kaplan N.O. New York. Academic Press. pp. 819 - 831.
- Murray D.R. 1979. A storage role for albumins in pea cotyledons. *Plant Cell Environ.* 2: 221-226.
- Nielsen S.S. 1991. Digestibility of legume proteins. *Food Technol.* 45: 112-114.
- Owusu-Ansah Y.J., McCurdy S.M. 1991. Pea proteins: a review of chemistry, technology of production and utilization. *Food Rev. Int.* 7: 103-134.
- Partearroyo M.A., Fernández-Quiniela A., Cid C. 1995. Sustancias antinutritivas en alimentos de origen vegetal. Su significado en la alimentación humana. *Alimentaria* 267: 115-120.
- Pellet P.L., Young V.R. 1980. Nutritional evaluation of protein foods. The United Nations University, Tokio, Japan.
- Periago M.J. 1993. Efectos del procesado enzimático sobre las propiedades nutritivas y funcionales de la harina de guisante. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. Murcia, España.
- Periago M.J., Ros G., Martínez M.C., Rincón F., López G., Ortuño J., Ros F. 1996a. *In vitro* estimation and mineral availability in green peas as affected by antinutritive factors and maturity. *Lebensm-Wiss. Technol.* 29: 481-488.
- Roller S., Swinton S. 1990. Enzymes and the food industry: the role of the Leatherhead Food Research Association. *Food Sci. Tech. Today* 4: 111-114.
- Ros G., Rincón F. 1990. Indices of quality and maturity for different commercial sizes of pea seed for canning. *Food Chem.* 38: 1-10.
- Ros G., Rincón F. 1991. Size dependence of color, texture and nutritional qualities of canned pea (*Pisum sativum*, L.). *Lebensm-Wiss. Technol.* 24: 549-552.
- Ros G., Rincón F. 1992. Effect of commercial canning on SDS-PAGE patterns of the albumin fraction of four pea sizes. *Die Nahrung* 36 (2): 199-201.
- Rockland L.B., Radke T.M. 1981. Legume protein quality. *Food Technol.* 35 (3): 79-82.
- Saikia P., Sarkar C.R., Borua I. 1999. Chemical composition, antinutritional factors and effect of cooking on nutritional quality of rice bean (*Vigna umbellata* [Thunb; Ohwi and Ohashi]). *Food Chem.* 67: 347-352.
- Sastry C.P.S., Tummuru M.K. 1985. Spectrophotometric determination of tryptophan in proteins. *J Food Sci. Tech.* 22: 146-147.
- Satterlee L.D., Kendrick J.G., Marsahall H.F., Jewell D.K., Ali R.D., Heckman M.H., Stein F., Larson P., Philips R.D., Sawar G., Slump P. 1982. "In Vitro" assay for predicting protein efficiency ratio as measured by rat bioassay: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 65: 798-815.
- Savage D. P., Deo S. 1989. The nutritional value of peas (*Pisum sativum*, L₂). A literature review. *C.A.B. International* 59: 66-88.
- Savelkoul H.M.G., Boer H., Tamminga S., Van Oort M. 1992. Biotechnological degradation of lectins, tannins, and trypsin inhibitors in legumes. En: *Proceedings of the 1st European Conference on Grain Legumes*. Angers. pp. 397-398.
- Schroeder H.E. 1982. Quantitative studies on the cotyledonary proteins in the genus *Pisum*. *J. Sci. Food Agr.* 33: 623-633.

- Schroeder H.E. 1984. Major albumins of *Pisum* cotyledons. J. Sci. Food Agr. 35: 191-198.
- Singh U., Jambunathan R., Gurtu S. 1981b. Seed protein fractions and amino acid composition of some wild species of pigeon pea. J. Food Sci. Tech. 18: 83-85.
- Tomé D., Gaborit T. 1989. Amounts and electroforetic patterns of trypsin inhibitors seed of winter and spring pea (*Pisum sativum* L.) cultivars. Sci. Alim. 9: 763-768.
- Tormo R. 1993. Dieta en las enfermedades gastrointestinales. En: "Nutrición y Dietética". Eds. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Madrid, España, pp. 507-543.
- Valdebouze P., Bergeron E., Garobit T., Delort-Laval J. 1980. Content and distribution of trypsin inhibitors and hemagglutinins in some legume seeds. Can. J. Plant Sci. 60: 695-701.
- Weber K., Osborn M. 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Agr. Bio. Chem. 244: 4406-4412.
- Young V.R. 1992. Macronutrient needs in the elderly. Nutr. Rev. 50: 454-462.
- Zawadzki K.M., Yaspelkis I.B.B., Ivi J.L. 1992. Carbohydrate-protein complex increases the rate of muscle glycogen storage after exercise. J. App. Physiol. 72: 1854-1859.