

# **TRANSFORMACIÓN Y MEJORA DEL VALOR NUTRITIVO DE LA HARINA DE GUISANTE MEDIANTE LA ADICIÓN DE ENZIMA FITASA**



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE FARMACIA**  
Departamento de Fisiología

**Elena Gómez-Villalva Pelayo**



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**TRANSFORMACIÓN Y MEJORA DEL VALOR NUTRITIVO  
DE LA HARINA DE GUISANTE MEDIANTE  
LA ADICIÓN DE ENZIMA FITASA**

**ELENA GÓMEZ-VILLALVA PELAYO**

**2005**

A mis padres y Beatriz por  
animarme

A Francisco por ...  
soportarme... y alegrarme  
cada día.

## **AGRADECIMIENTOS:**

Quiero aprovechar para dar las gracias a todas aquellas personas que han colaborado en la realización de esta Tesis Doctoral, y en especial:

A la Dra. Gloria Urbano Valero, por sus constantes orientaciones y certeros consejos.

A la Dra. Pilar Aranda Ramírez, por que sin su permanente estímulo e ilusión este proyecto no hubiese alcanzado el final. Gracias Pilar, por tu ánimo constante.

A la Dra. María López-Jurado, por tu amable trato y tu gran ayuda en todas las fases de este trabajo. Gracias por tu apoyo.

A Jesús Porres, por encontrar siempre un momento para ayudarme y por su estimable consejo sin el cual no habría podido culminar este trabajo.

A Rosi, por conseguir sacarnos cada día una sonrisa y por esa alegría que transmite en todo momento. Gracias Rosi, eres genial.

A todos los componentes del Departamento de Fisiología que se han visto involucrados en este proyecto.

A mis padres, por ser los que más empeño han tenido y ser el mejor ejemplo en mi formación personal y profesional. Gracias por vuestro constante optimismo.

A Beatriz, por tu ánimo, tus consejos y consuelos. Gracias hermanita hay poca gente como tú.

A Francisco, por tu cariño, apoyo y consejo. De nuevo hemos conseguido superar una meta juntos.

# ÍNDICE

<b>I. OBJETIVO</b> .....	9
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	12
<b>2.1. Importancia de las leguminosas</b> .....	12
2.1.1. <u>Origen de las legumbres</u> .....	13
2.1.2. <u>La familia Fabacea</u> .....	15
2.1.2.1. Descripción Botánica del guisante .....	15
2.1.3. <u>Cultivo y Consumo de las legumbres</u> .....	16
<b>2.2. Composición cuantitativa y cualitativa de <i>Pisum sativum</i> L. Utilización nutritiva</b> .....	18
2.2.1. <u>Proteínas</u> .....	22
2.2.1.1. Composición .....	22
2.2.1.2. Fracciones y Caracterización .....	23
2.2.1.3. Composición Aminoacídica .....	24
2.2.1.4. Utilización Nutritiva .....	25
2.2.2. <u>Hidratos de Carbono</u> .....	28
2.2.2.1. Composición Química .....	28
2.2.2.2. Clasificación Nutricional .....	31
2.2.2.3. Valor Nutritivo .....	35
2.2.3. <u>Fibra Dietética</u> .....	39
2.2.4. <u>Lípidos</u> .....	46
2.2.5. <u>Vitaminas</u> .....	48
2.2.6. <u>Minerales</u> .....	49
2.2.6.1. MAGNESIO .....	50
2.2.6.1.1. Aspectos generales .....	50
2.2.6.1.2. Absorción, transporte y eliminación .....	52
2.2.6.1.3. Ingesta Recomendada .....	56
2.2.6.2. CINC .....	57
2.2.6.2.1. Aspectos generales .....	57
2.2.6.2.2. Absorción, transporte y eliminación .....	58

2.2.6.2.3. Ingesta recomendada y toxicidad .....	66
2.2.6.3. HIERRO .....	67
2.2.6.3.1. Aspectos generales .....	67
2.2.6.3.2. Absorción, transporte y eliminación .....	69
2.2.6.3.3. Fuentes alimentarias .....	77
2.2.6.3.4. Ingesta recomendada y toxicidad .....	78
2.2.7. <u>Factores No Nutritivos</u> .....	79
2.2.7.1. Inhibidores de la Actividad Tripsina .....	80
2.2.7.2. $\alpha$ -Galactósidos .....	83
2.2.7.3. Ácido Fítico .....	87
2.2.7.3.1. Empleo de enzimas comerciales en la industria alimentaria .....	91
2.2.7.3.1.1. ¿Qué son las enzimas alimentarias? .....	92
2.2.7.3.1.2. Clasificación de enzimas .....	92
2.2.7.3.1.2.1. ¿Porqué son necesarias las enzimas alimentarias? .....	92
2.2.7.3.1.2.2. La enzima Fitasa .....	93
2.2.7.3.1.2.2.1. Localización de la fitasa .....	95
2.2.7.3.1.2.2.2. Propiedades catalíticas de la fitasa .....	98
2.2.7.3.1.2.2. 3. Hidrólisis del fítico a través de la fitasa .....	98
<b>III. HARINAS FUNCIONALES DE GUISANTES MEDIANTE LA ADICIÓN DE FITASA COMERCIAL</b> .....	101
<b>3.1. Material</b> .....	101
3.1.1. <u>Diseño experimental</u> .....	101
3.1.2. <u>Desarrollo de los Experimentos</u> .....	102
<b>3.2. Técnicas analíticas</b> .....	104
3.2.1. <u>Humedad (materia seca)</u> .....	104
3.2.2. <u>Nitrógeno total</u> .....	104
3.2.3. <u>Nitrógeno insoluble y nitrógeno soluble proteico y no proteico</u> .....	105
3.2.4. <u>pH</u> .....	105
3.2.5. <u>Azúcares solubles disponibles y <math>\alpha</math>-Galactósidos</u> .....	105

3.2.6. <u>Almidón Total y Almidón Utilizable</u> .....	105
3.2.7. <u>Vitaminas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub></u> .....	106
3.2.8. <u>Minerales Totales (Cenizas)</u> .....	106
3.2.9. <u>Magnesio, Hierro y Cinc</u> .....	106
3.2.10. <u>Fibra alimentaria</u> .....	106
3.2.11. <u>Actividad Inhibidora de la Tripsina</u> .....	106
3.2.12. <u>Inositoles fosfatos</u> .....	107
<b>3.3. Parámetros e Índices Biológicos Utilizados</b> .....	107
<b>3.4. Tratamiento Estadístico</b> .....	109
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	110
<b>4.1. Composición Química de las Dietas Ensayadas</b> .....	110
4.1.1. <u>Análisis Químicos</u> .....	110
4.1.2. <u>Análisis Biológicos</u> .....	115
4.1.2.1. Ingesta de Nutrientes y Factores No Nutritivos .....	115
4.1.2.2. Utilización Digestiva y Metabólica de Nitrógeno .....	120
4.1.2.3. Utilización Digestiva y Metabólica de Magnesio .....	122
4.1.2.4. Utilización Digestiva y Metabólica de Cinc .....	124
4.1.2.5. Utilización Digestiva y Metabólica de Hierro .....	126
4.1.2.5.1. Análisis Hematológicos .....	128
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	130
<b>5.1. Análisis Químico de las Dietas Ensayadas</b> .....	130

<b>5.2. Valoración Biológica</b> .....	141
5.2.1. <u>Ingesta</u> .....	141
5.2.2. <u>Utilización Digestiva y Metabólica de la Proteína e Hidratos de Carbono</u> .....	142
5.2.3. <u>Utilización Digestiva y Metabólica del Magnesio</u> .....	148
5.2.4. <u>Utilización Digestiva y Metabólica de Cinc</u> .....	153
5.2.5. <u>Utilización Digestiva y Metabólica de Hierro</u> .....	157
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	161
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	162

## I. OBJETIVO

El interés nutricional de las leguminosas se basa en su alto contenido en nutrientes. Las semillas de guisantes son pobres en grasa y son una excelente fuente de proteína (alrededor de un 25% de proteína cruda), almidón (35-45%), fibra dietética y una variedad de micronutrientes y compuestos bioactivos (minerales, vitaminas y antioxidantes) (Paul y Southgate, 1988; Hedley, 2001; Alonso y col., 2000; Salgado y col., 2002). El consumo de legumbres puede tener efectos beneficiosos para reducir la incidencia de ciertos cánceres (Lamartiniere, 2000; Williams y col., 1999), proteger frente la osteoporosis (Messina, 1999), reducir el colesterol sérico (Duane, 1997) o disminuir la acumulación lipídica corporal (Pusztai, 1998), entre otros.

Como contrapartida a su alto contenido en nutrientes, el guisante posee una cierta cantidad de factores no nutritivos como inhibidores de tripsina,  $\alpha$ -galactósidos, ácido fítico, taninos, inhibidores de amilasa, lectinas (Gupta, 1987; Adsule y Kadam, 1989; Liener, 1989; Gatel y Grosjean, 1990; Hedley, 2001). Todo ello provoca un empobrecimiento de la calidad nutritiva de la semilla, limitándose su consumo y empleo en la industria alimentaria humana y animal (Periago y col., 1998).

Por ello se han desarrollado múltiples estudios para encontrar procesos o metodologías capaces de descender o eliminar totalmente estos factores no nutritivos con el mínimo deterioro de los nutrientes, tales como: germinación, descascarillado, remojo, cocción, tostado, autoclave, fermentación, extrusión, suplementación con enzimas, irradiación, extracción de oligosacáridos  $\alpha$ -galactósidos (Gazy, 1990; Kim y Barbeau, 1991; Urbano y col., 1995, 2005a, b y c; Frias y col., 1996b, 2000, 2001 y 2003b; Fernández y col., 1997; Alonso y col., 2000c y 2001; Fredrikson y col., 2001; Khalil, 2001; Vidal-Valverde y col., 2002a y b; Martín-Cabrejas y col., 2003; Nestares y col., 2003; Aranda y col., 2004; Porres y col., 2005).

Alrededor de los últimos veinte años, el empleo de enzimas en la industria de procesado del alimento se ha extendido rápidamente (Faergeman, 1994). La adición de fitasa ha sido identificada como un método efectivo, económica y productivamente, para mejorar la calidad de las legumbres (Fredrikson y col., 2001).

El objetivo principal de este trabajo ha sido la obtención de harina funcional de

guisantes (*Pisum sativum*, L. var. *Esla*) con elevada calidad nutritiva para utilizarla en nutrición humana y animal.

Para alcanzar dicho objetivo se ha realizado un proceso enzimático, adicionando a la harina de guisante enzima fitasa en condiciones óptimas de actuación tratando de disminuir la cantidad de factores no nutritivos, en especial de inositoles fosfato, y aumentar la biodisponibilidad de los minerales sin detrimento de la calidad del resto de los nutrientes.

En la harina de guisantes sin procesar (guisante crudo) y procesados (harina de guisante remojado a pH 5.5 y temperatura de 37°C durante 60 minutos y harina de guisante tratada de igual forma que la anterior y adicionada de fitasa) se ha realizado un estudio químico y biológico en ratas Wistar en crecimiento que comprende:

- Estudio del contenido en nutrientes (proteína, monosacáridos, disacáridos, almidón total y disponible, vitamina B<sub>1</sub>, vitamina B<sub>2</sub>, minerales totales (fósforo, magnesio, cinc y hierro) y factores no nutritivos (oligosacáridos  $\alpha$ -galactósidos, inhibidores de la tripsina y ácido fítico) de *Pisum sativum*, L. var. *Esla*.
- Valoración en ratas de la calidad nutritiva de la proteína juzgada por su utilización digestiva y metabólica.
- Valoración en ratas de la biodisponibilidad de magnesio, cinc y hierro juzgada por su utilización digestiva y metabólica.
- Estudio en ratas de la calidad nutritiva de la harina funcional obtenida, mediante el incremento de peso de los animales, Coeficiente de Eficacia en Crecimiento de la Proteína, Índice de Transformación de los hidratos de carbono utilizables e Índice de Transformación del alimento, así como el depósito de nitrógeno, magnesio, cinc y hierro en distintos órganos y tejidos (fémur, esternón, riñón, corazón, hígado y sangre).

Este trabajo se enmarca en una línea de investigación desarrollada en colaboración con el Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC y financiada por diferentes fondos del Plan Nacional de I+D+I. En concreto, esta Tesis Doctoral está incluida en los proyectos de investigación financiados por la CICYT:

**ALI 97-0636:** "Transformación y mejora del valor nutritivo de leguminosas

mediante adición de enzimas”.

**AGL 2002-02905 ALI:** "Procesos biotecnológicos para incrementar la capacidad antioxidante de leguminosas”.

Parte de los resultados presentados se incluyen en la siguiente publicación:

© Urbano G, Aranda P, Gómez-Villalva E, Frejnagel S, Porres J, Frias J, Vidal-Valverde C, López-Jurado M. 2003. Nutritional evaluation of pea (*Pisum sativum* L.) protein diets after mild hydrothermal treatment and with and without added phytase. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2415-2420.

## II. INTRODUCCIÓN

### 2.1. IMPORTANCIA DE LAS LEGUMINOSAS

El incremento de las necesidades de proteína en el mundo ha estimulado a los científicos y agrónomos a buscar nuevas fuentes de proteína.

Desde la antigüedad el hombre ha sabido seleccionar e incorporar las leguminosas a su alimentación y hoy están formando parte de la dieta tradicional de una amplia población mundial. Las legumbres son consideradas como una buena fuente de proteínas, carbohidratos, fibra, minerales y vitaminas hidrosolubles. Se emplean ampliamente en nutrición animal y humana. En los países en desarrollo son la principal fuente proteica y energética, por ello, frecuentemente nos referimos a ellas como el alimento del hombre pobre (la mayoría contiene unos 600 g/Kg de carbohidratos, principalmente almidón) (Reddy y col, 1984; Wiserman y Cole, 1988; Wiryawan y Dingle, 1995).

En muchos países las leguminosas se encuentran extensamente cultivadas para obtener suplementos proteicos buenos y baratos con el fin de alimentar a animales y humanos (Duke, 1983; Savage y Deo, 1989).

Las proteínas son los principales componentes de la semilla de las leguminosas. Sus propiedades funcionales y nutritivas afectan la calidad global de la semilla y a su comportamiento tecnológico (Duranti y Gius, 1997). A menudo representan un suplemento necesario para otras fuentes proteicas. El contenido en leguminosas de proteínas es de dos a tres veces superior al de los cereales. A escala mundial, los 2/3 del consumo de proteínas provienen de las leguminosas y los cereales (Salunkhe y Kadam, 1989), de lo que se deduce el papel tan importante que juegan este grupo de alimentos en la población mundial (Singh y Singh, 1992). Por otra parte en los países desarrollados, las proteínas vegetales pueden ser actualmente consideradas como ingredientes funcionalmente versátiles o como componentes activos biológicamente más que como nutrientes esenciales. Esta evolución hacia salud y funcionalidad es debido, en primer lugar, a las demandas de consumidores y profesionales de la salud en sustituir parcialmente los alimentos de origen animal por

legumbres para así mejorar los status nutricionales generales, ya que estas son consideradas buenas para la salud debido a su compatibilidad con los cereales y sus propiedades en prevención de enfermedades de tipo cardiovascular, diabetes tipo 2, obesidad y, posiblemente, cáncer de colon (Guillon y Champ, 1996) y en segundo lugar, a las necesidades de la industria alimentaria (Duranti y Gius, 1997). Las legumbres más comunes para consumo humano son judías, lentejas, guisantes, garbanzos y habas. La mayoría de las legumbres se consumen después de un simple procesado o tras su cocción en forma de ensaladas, menestras, sopas o cremas (Guillon & Champ, 2002).

Así pues desde el punto de vista cuantitativo las leguminosas se consideran como buena fuente de proteínas pero con limitaciones desde el punto de vista cualitativo debido a su bajo contenido en aminoácidos azufrados y la presencia de inhibidores de proteasas que, aunque son destruidos parcialmente durante el cocinado, disminuyen la digestibilidad de la proteína considerablemente. Estos valores dependen tanto de la variedad de leguminosa como de la zona de producción, pero en general, el contenido en proteínas de las semillas de leguminosas para consumo humano es de dos a tres veces más que el de los cereales (MAPA, 1984; McPhee and Muehlbauer, 2002). El valor biológico de la proteína de las leguminosas es algo inferior al de las proteínas de origen animal, debido a que, aunque contiene lisina, es deficitaria en triptófano y aminoácidos azufrados: metionina y cisteína (Gatel, 1994), como hemos comentado anteriormente. La gastronomía tradicional ha sabido salvar este problema mezclando las leguminosas con cereales (alimentos ricos en aminoácidos azufrados y pobres en lisina), obteniendo una combinación con un excelente balance en aminoácidos y consiguiéndose así mejorar la calidad proteica.

A pesar de ser una importante fuente de macro y micronutrientes, su composición varía entre las distintas especies de leguminosas, pudiendo encontrarse incluso dentro de la misma especie diferencias notables entre las distintas variedades o genotipos, según las diferentes condiciones edafoclimáticas y las prácticas de cultivo (Singh, 1985; Mosse y col., 1987).

### **2.1.1. ORIGEN DE LAS LEGUMBRES**

Las legumbres han desempeñado un papel vital en casi todas las culturas y civilizaciones antiguas que conocemos hoy en día.

El uso de las legumbres como dieta básica puede remontarse a más de 20.000 años en algunas culturas orientales.

Son múltiples las indicaciones sobre su cultivo, preparación y consumo: desde las tumbas reales del antiguo Egipto hasta la Iliada de Homero en la antigua Grecia, e incluso en el Antiguo Testamento.

El hallazgo de restos carbonizados en la Cuenca del Mediterráneo nos indican que guisantes, lentejas y garbanzos fueron cultivados junto con cereales 7000 años A.C. (McPhee and Muehlbauer, 2002). Además el guisante fue hallado en tumbas egipcias y en palafitos suizos y se sabe que se comía en la época romana, aunque no era un alimento prestigiado. La lenteja aparece citada en la Biblia.

Se encontraron almortas en estudios arqueológicos realizados en el Turkestan. Las judías (fríjoles, entre los mejicanos) se encontraron en las cuevas de Ocampo, en Méjico, con una antigüedad de más de cuatro mil años. El cacahuete llegó a Europa traído por los españoles después del Descubrimiento.

La soja es una leguminosa cuyas referencias datan 2800 años a.C., en los escritos del emperador Shen Nung, donde habla de los cinco cultivos sagrados de la China: arroz, soja, trigo, cebada y mijo. Los chinos preparaban con la soja requesón, queso, salsas, etc. Entre los occidentales para ser aceptada como alimento necesita un alto tratamiento industrial.

La alubia común, la alubia de lima y la alubia pinta se cultivaron por primera vez en las primeras civilizaciones mejicanas y peruanas hace más de 5.000 años, y eran populares tanto en la cultura Azteca como en la Inca. Aunque los historiadores no están seguros de sí las alubias fueron introducidas por primera vez en Europa tras el descubrimiento de América, lo cierto es que su cultivo data de esas fechas.

Estas culturas antiguas ya sabían que el secreto de las legumbres estaba en su diversidad y su inmenso valor nutritivo.

Por ello, el escritor y académico italiano Umberto Eco sostiene que : “el cultivo de alubias en Europa durante la Edad Media desempeñó un papel monumental "salvando" a los europeos de un aún más triste destino de desnutrición y posible extinción...” (McPhee and Muehlbauer, 2002).

## 2.1.2. LA FAMILIA FABACEA

Las leguminosas se incluyen dentro de la familia botánica *Fabaceae*, rica en especies y enormemente difundida, que se desarrolla preferentemente en terrenos calcáreos y secos, aunque también, como en el caso de los altramuces, requieren suelos ácidos. Se caracterizan, fundamentalmente, porque sus frutos se encuentran encerrados entre dos vainas denominadas legumbres. Su interés no solo se centra en la superficie mundial que se dedica a su cultivo y su producción como pienso para alimentación animal, sino como hemos dicho, por ser fuente de nutrientes destinados al consumo humano y animal. Las legumbres más utilizadas son los garbanzos (*Cicer arietinum*), las lentejas (*Lens culinaris*), las alubias (entre las que se encuentran diversas variedades del género *Phaseolus*), los Guisantes (*Pisum sativum*), las habas (*Vicia faba*), y algunas variedades del género *Vigna*.

### 2.1.2.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL GUISANTE

El guisante (*Pisum sativum* L.) pertenece a la familia Fabacea. Debido a la evidencia citogenética y a los cruces entre las distintas especies, se ha generado la reducción del número de especies con los genes *Pisum* a dos, viz., *Pisum sativum* y *Pisum fulvum* (Janoria, Gour y Singh, 1984). *Pisum sativum* incluye las siguientes subespecies: (1) *P. sativum* ssp. Guisante *hortens* ó jardín, (2) *P. sativum* ssp. Guisante *arvens* o de campo, (3) *P. sativum* ssp. Guisante *macrocarpum* o podado-aremolinado, (4) *P. sativum* ssp. *elatius* (antigua *P. elatius* Beib), y (5) *P. sativum* ssp. *syriacum* (antigua *P. humile* Boiss y Noe). Las dos últimas especies son las formas silvestres de *P. sativum*. Sobre 1000 variedades de guisante se diferencian en altura, periodo de maduración, talla de la vaina, tipo y características de la semilla (Gentry, 1971). Los guisantes cultivados en la actualidad son de dos tipos, guisantes de jardín y de campo (Daniel, Sundarraj y Thulsidas, 1957). Los guisantes de jardín (*P. sativum* ssp. *hortens*) tienen las semillas grises, lisas ó arrugadas cuyas jóvenes semillas verdes normalmente son usadas como un vegetal ó para enlatar. Las semillas de los guisantes de campo (*P. sativum* ssp. *arvens*) son pequeñas y redondeadas ó con hoyuelos. Las semillas maduras son usadas como un grano de legumbre. Las semillas jóvenes verdes e inmaduras también son usadas como un vegetal.

### 2.1.3. CULTIVO Y CONSUMO DE LAS LEGUMBRES

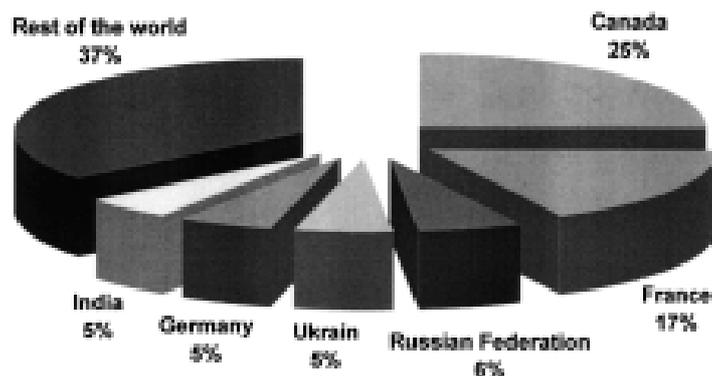
A pesar del déficit en materiales ricos en proteínas dentro de diversos países de la Unión Europea, desde los últimos años las legumbres no juegan el papel importante que deberían, ni en España ni en los otros países de UE; aproximadamente dos terceras partes de las proteínas son importadas, principalmente del norte y el sur de América. Si en Europa el consumo medio de leguminosas es aproximadamente de 1.4 Kg/año/habitante en un país en vías de desarrollo se puede transformar en 16 Kg/año/habitante, como es el caso de Brasil.

Actualmente en la Unión Europea el primer país productor de legumbres es Francia (2.622.000t) MAPA (2001).

En España la producción de legumbres se redujo a partir de 1999 y, como ocurre en el resto de los países de la UE, la principal razón de su cultivo es que el ser una alternativa ideal para la rotación de cereales además de su capacidad de retención de nitrógeno y enriquecimiento mineral del suelo (Pahl, 2001; Funk y col., 2001). Sin embargo, la implantación de una dieta más vegetariana, la cual ya ha empezado en el norte de Europa, podría permitirnos desear una resurrección del consumo de legumbres en toda Europa (Gatel y Champ, 1998).

Actualmente, los europeos que consumen grandes cantidades de judías son los británicos, mientras que los españoles y los italianos son grandes importadores de guisantes, judías, lentejas y garbanzos. Estas legumbres proceden principalmente de países no europeos, por ejemplo, los Estados Unidos exportan la mitad de las judías consumidas en Europa, Canadá es el principal exportador de lentejas y guisantes a Europa, China es con diferencia el principal exportador de judías y finalmente, Turquía es el que exporta todos los garbanzos a Europa (FAO, 2001).

Dentro de la producción mundial de legumbres alimentarias el guisante ocupa el cuarto rango, por debajo de la soja, el cacahuete y la judía. La producción total de guisante seco en el año 2000 fue exactamente de 11.704.701 m.t. (FAO, 2000)



**Figura 1.** Producción mundial de guisante seco [Total: 11 704 701 m.t.]  
(FAO, 2000).

Como indica la figura 1 los guisantes son producidos en casi todos los países del mundo. Canadá es el principal productor (aproximadamente el 25% de la producción total mundial) y el principal exportador (40% de las exportaciones totales mundiales) de guisantes secos en el mundo. Mas de la mitad de toda la producción de guisante de Canadá es exportada como semilla sin someterla a ningún procesado. Alrededor del 10% es empleado como semilla para los cultivos, las semillas enteras o rajadas son utilizadas para guisos, sopas o alimentos enlatados, la cubierta se adiciona a panes ricos en fibra, aunque la mayor parte es destinada para la alimentación animal (Agriculture and Agri-Food Canada, 2000). El amplio uso del guisante seco en Europa y Norte América es en la composición de la industria alimentaria, donde las semillas enteras son molidas y mezcladas con harinas de cereales para producir alimentos. El principal uso de esta legumbre en Asia y América del Sur es para el consumo humano, donde las semillas enteras o rajadas son hervidas y después ingeridas. La proporción mundial de guisante seco que es procesado en fracciones de proteína, almidón y fibra es muy pequeña en estos momentos (Ratnayake y col., 2002).

Las principales razones por las que las legumbres de consumo humano se emplean tan poco en la mayoría de los países europeos son:

- ☛ La mala imagen que ha sufrido este alimento desde hace mucho tiempo.

-  Necesitan mucho tiempo para ser cocinados, lo que no es compatible con el estilo de vida actual.
-  La mayoría son una fuente de flatulencia, lo cual no está muy bien aceptado en la sociedad urbana del mundo occidental.

Al contrario que para la nutrición humana donde las legumbres pueden ayudar a la diversificación de las proteínas de origen vegetal, en nutrición animal las legumbres tienen que competir con otros ingredientes, en un mercado relativamente abierto. La formulación con mínimos costes es empleada ampliamente para elaborar dietas animales. Esto significa que al igual que para cualquier ingrediente crudo, las legumbres se emplean en la alimentación de diferentes especies animales de acuerdo a sus precios en el mercado y a su valor nutricional (principalmente valor energético). Los guisantes son con diferencia los más utilizados en nutrición animal (aproximadamente el 90%) seguido de judías. La cantidad de legumbre añadida en una dieta para animales es del 4.4%. Excepto en España que importa la mayoría de sus legumbres de países no Europeos, las legumbres consumidas en Europa son principalmente de origen europeo, Francia, Reino Unido, Alemania y Dinamarca son los principales productores. Las legumbres europeas representan alrededor del 5.3% del total de proteína empleada en alimentación animal, aunque este porcentaje varía mucho entre los distintos países europeos (Gatel y Champ, 1998). Su empleo en alimentación animal se encuentra limitado por una serie de condicionantes:

-  Precios diferentes entre legumbres y otros ingredientes crudos disponibles.
-  Valores nutricionales requeridos en la formulación de la dieta.
-  Niveles máximos de inclusión.

## **2.2. COMPOSICIÓN CUANTITATIVA Y CUALITATIVA DE *PISUM SATIVUM* L. UTILIZACIÓN NUTRITIVA**

Como ya comentamos anteriormente, el guisante es una fuente rica de

proteínas, carbohidratos y ciertos minerales (tabla 1).

**Tabla 1.** Composición aproximada de la semilla de guisante crudo desecado (g Kg<sup>-1</sup> de sustancia seca) (Savage and Deo, 1989; NRC, 1994; 1998; Periago y col., 1996; Igbasan and Guenter, 1997; Zdunczyk y col., 1997; Caribe y col., 1997b,c; Gelencsér y col., 1998a; Gouveia et Davies, 1998; Fontinhas-Fernandes y col., 1999; Grala y col., 1999; Alonso y col., 2000a; Booth y col., 2001; Cruz-Suarez y col., 2001; Ereifej and Haddad, 2001; Guillon y Champ, 2002; Habiba, 2002; Mariscal-Landín y col., 2002; McPhee and Muehblauer, 2002; Wang y Daun, 2004)

Nutriente	Contenido
Proteína	156 - 347
Extracto de nitrógeno libre	566 - 740
Grasa	8 - 61
Carbohidratos	474 - 713
Fibra	10-210
Minerales	22-41
Humedad	66-113
Valor energético (MJ Kg <sup>-1</sup> )	12-83

La semilla de guisante está constituida por tres componentes principales: cotiledón (89%), embrión (1%) y cubierta (10%), los cuales difieren significativamente en su composición química; los cotiledones son los componentes mayoritarios de la semilla y su reserva de nutrientes, ya que contribuyen a la mayor proporción de proteínas (96%), grasa (90%), carbohidratos (77%) y minerales (89%); por ello el descascarillado y la eliminación del embrión no afectarían en gran medida a la concentración de nutrientes de la semilla (tablas 2 y 3). La cubierta de la semilla contiene la mayoría de los carbohidratos no digeribles y es rica en calcio y fósforo. El germen tiene una elevada concentración de proteínas y minerales pero su contribución a toda la semilla es insignificante en un peso total base (Lynch y col., 1959; Rodriguer y col., 1979).

**Tabla 2.** Composición química de las partes de la semilla del guisante seco (Singh y col., 1968).

<b>Nutriente</b>	<b>Cubierta</b>	<b>Cotiledón</b>	<b>Embrión</b>
Sustancia Seca <sup>a</sup>	10.00	89.28	1.26
Proteína <sup>a</sup>	3.1	30.1	47.9
Extracto de éter <sup>a</sup>	0.4	3.3	10.2
Fibra cruda <sup>a</sup>	46.9	1.2	2.6
Extracto N-libre <sup>a</sup>	47.2	62.6	35.3
Cenizas <sup>a</sup>	2.42	2.83	4.03
Fósforo <sup>b</sup>	14	311	814
Hierro <sup>b</sup>	6.1	4.9	19.2
Calcio <sup>b</sup>	900	181	461

<sup>a</sup> g/100g de sustancia seca

<sup>b</sup> mg/100g

La humedad es el mayor componente de los guisantes verdes, se encuentra de un 74 a un 81% (Pruthi, Saxena y Manan, 1980). En las semillas desecadas, la humedad es de un 16% (Gopalan, Ramasastry y Subramanian, 1982). Para un almacenamiento duradero, los guisantes deben ser desecados hasta una humedad inferior del 7% (Lynch, Mitchell y Casimir, 1959).

La harina de guisante, procedente de la molienda de las semillas, es una buena fuente de proteínas (alrededor del 30% de la composición total) (Periago y col., 1996a). Además contiene elevadas cantidades de polisacáridos no amiláceos o fibra dietética y almidón resistente (Periago y col., 1994, 1996b) (Tabla 4).

**Tabla 3.** Porcentaje de distribución de los constituyentes químicos en la semilla de legumbre (Singh y col., 1968).

<b>Nutriente</b>	<b>Cubierta</b>	<b>Cotiledón</b>	<b>Embrión</b>
Proteína	1	96	2
Extracto de éter	1	90	3
Fibra cruda	80	17	0,5
Extracto N-libre	8	92	0,6
Cenizas	9	89	1,7
Fósforo	0,5	97,1	3,5
Hierro	18	84,3	4,6
Calcio	35	62	2,2

Establecer los requerimientos para un nutriente en particular es complicado debido a las numerosas interacciones entre los diversos componentes del alimento y teniendo en cuenta que el defecto o exceso de uno de los nutrientes puede afectar a la biodisponibilidad de otros relacionados con él. Estas interacciones serán comunes en las leguminosas debido a su alto contenido en la mayoría de los nutrientes esenciales para el organismo. Además la composición proteica y mineral así como el valor nutritivo del guisante dependen de diferentes factores tales como condiciones de cultivo, talla, condiciones climáticas y del suelo durante el crecimiento de la planta (Geervani and Devi, 1988; Savage and Deo, 1989; Ros and Rincón, 1990). Periago y col. (1996) concluyeron que la composición química, el valor nutritivo de la proteína, la composición mineral y de factores no nutritivos de los guisantes dependía del desarrollo de la semilla y el tipo de cultivo cuando eran estudiados bajo las mismas condiciones de crecimiento. Así pues las semillas inmaduras contenían elevadas cantidades de nitrógeno no proteico y aminoácidos libres y pequeños niveles de proteína, almidón, fibra, minerales, ácido fítico e inhibidores de la actividad de la tripsina que las semillas maduras.

**Tabla 4.** Composición proteica de la harina del guisante crudo (% sustancia seca) (Periago y col., 1998)

<b>Nutriente</b>	<b>Contenido</b>
Nitrógeno total (%)	4.18±0.05
Proteína cruda (%)	26.1±0.29
Nitrógeno proteico (%)	3.12±0.31
Proteína verdadera (%)	19.5±0.43
Nitrógeno no proteico (%)	1.00±0.02
Aminoácidos libres (%)	0.28±0.01
Digestibilidad in vitro de la proteína (%)	82.3±0.55

### **2.2.1. PROTEÍNAS**

Las legumbres son una importante fuente de proteínas desde un punto de vista nutricional y económico (Anon, 1975; Orr, 1978; Wiserman y Cole, 1988).

El consumo de proteína de origen vegetal disminuye considerablemente los niveles de colesterol circulante al contrario de la proteína de origen animal que aumenta estos niveles. Independientemente de la presencia de otros factores hipocolesterionemiantes en la proteína vegetal, parece existir una relación entre la fracción lisina/arginina (menor en las proteínas vegetales que en las animales) de la proteína y los bajos niveles de colesterol plasmático que se obtienen tras su consumo (Giese, 1994).

#### **2.2.1.1. Composición**

Las semillas de las legumbres acumulan grandes cantidades de proteínas durante su crecimiento (Duranti y Gius, 1997). El contenido proteico de los guisantes verdes es de 6.3% según Salunkhe y col. (1974). Los guisantes secos contienen entre

un 23% y un 31% de proteína (Bajaj y col., 1971; Guillon & Champ, 2002; Urbano y col., 2003). Baudet y col. (1977) determinaron un mayor contenido proteico en los guisantes secos (21.5%-37.5%), mientras que Salgado y col. (2002) encontraron unos niveles significativamente inferiores (19,9%). El contenido en nitrógeno no proteico del guisante seco es pequeño, oscilando entre un 6 y un 9% (Savage y Deo, 1989; Urbano y col., 2003). Del mismo modo Periago y col. (1996a) establecieron que la harina de guisante, obtenida tras la molturación de la semilla, es una buena fuente de proteína (aproximadamente el 30% de su composición total).

### 2.2.1.2. Fracciones y Caracterización

La mayoría de las proteínas de las semillas de las legumbres están desprovistas de la actividad catalítica y juegan un papel no estructural en los tejidos cotiledónicos. Están almacenados en los orgánulos ligados a la membrana en las células parenquimatosas de los cotiledones, soportan la desecación en la semilla madura y aguantan igualmente, la hidrólisis y la germinación, de esta manera proporcionan amonio y esqueletos carbónicos a las cabezas en desarrollo. Las proteínas de las semillas que se comportan así son llamadas “**proteínas de almacenamiento**”. Sin embargo, debido a su insolubilidad en agua y solubilidad en soluciones salinas, estas proteínas de almacenamiento son denominadas también como **globulinas**, ambos términos son comúnmente utilizados.

En menor proporción, las semillas de las legumbres contienen proteínas catalíticas. La mayoría pertenece a la inmensa, aunque menos abundante, clase de las **albúminas** (solubles en agua), representadas principalmente por miles de enzimas diferentes necesarios para el metabolismo de las células cotiledónicas (Duranti y Gius, 1997) como inhibidores de la tripsina, lectinas, lipooxigenasa y ureasa, la cual es relevante en la calidad nutricional de la semilla.

El contenido en globulina y albúmina, expresado como porcentaje de la fracción proteica, es del 55-65% y 20-25%, respectivamente (Marzo y col., 1997; Crevieu-Gabriel y col., 1998).

Como otras proteínas de legumbres, las proteínas de los guisantes están fraccionadas en función a su solubilidad, así Boulter y Derbyshire (1978) las clasificaron conforme a esta propiedad: albúmina, 21%; globulina, 66%; glutelina, 12%.

Las globulinas constituyen entre el 65 y el 80% de las proteínas extraídas de los cotiledones de los guisantes (Gwiazda, Schwenke y Rutkowski, 1980; Boulter y Derbyshire, 1971; Millerd, Thompson y Ryall, 1979).

Las globulinas están generalmente clasificadas como proteínas 11S y 7S de acuerdo a sus coeficientes de sedimentación. Las bien estudiadas 11S y 7S proteínas del guisante son denominadas **legumina** y **vicilina**, respectivamente. Estas difieren entre sí en su tamaño, peso molecular, estructura de sus subunidades y su contenido sulfúrico (Varner y Schidlovsky, 1963; Thompson y col., 1978; Grant y Lawrence, 1979; Millerd y col., 1979; Gwiazda y col., 1980).

Las fracciones de albúmina contienen dos componentes polipeptídicos principales con pesos moleculares de 8.000 y 22.000. Estos dos polipéptidos constituyen el 34% de la fracción proteica de albúmina y son ricos en aminoácidos sulfurados (Murray, 1979; Schroeder, 1984). Las albúminas son generalmente consideradas como proteínas enzimáticas y metabólicas. No obstante, alguna de las albúminas puede comportarse como proteínas de almacenamiento durante la germinación, en concreto se trataría de la fracción que tiene un peso molecular de 8.000 (Bajaj y col., 1971a; Boulter & Derbyshire, 1971; Murray, 1979; Schroeder, 1984).

### **2.2.1.3. Composición Aminoacídica**

El perfil aminoacídico de una proteína alimentaria es importante ya que su utilización depende del contenido limitante de sus aminoácidos. La composición de aminoácidos de las proteínas de la semilla del guisante (Tabla 5) ha sido estudiada extensamente (Patwardhan, 1962; Bressani y Elias, 1974; Eppendorfer y Bills, 1974; Evans y Boulter, 1980; Gopalan y cols, 1982).

Las proteínas del guisante son deficientes principalmente en aminoácidos azufrados y triptófano, aunque entre las legumbres alimentarias son ellos los que tienen relativamente los mayores niveles de estos aminoácidos (Evans y Boulter, 1980), sin embargo, contienen niveles altos de lisina (Gatel, 1994). Distintas fracciones proteicas del guisante difieren en su composición aminoacídica. La fracción de la albúmina es relativamente rica en aminoácidos azufrados (Murray, 1979; Schroeder, 1984). La albúmina de los guisantes contiene más triptófano, treonina y metionina pero menos arginina, leucina y fenilalanina que la fracción de la globulina

(Holt y Sosulski, 1979). Las globulinas aisladas de la harina de guisante tienen un mayor contenido en ácido glutámico, ácido aspártico y arginina pero un menor contenido en aminoácidos azufrados que las albúminas (Gwiazda, Schwenke y Rutkowski, 1980).

**Tabla 5.** Composición aminoacídica del guisante crudo (g Kg<sup>-1</sup> de sustancia seca) (Chen and Thacker, 1978; NRC, 1994; 1998; Igbasan and Guenter, 1997; Zdunczyk y col., 1997; Caribe y col., 1997a,c; Gelencsér y col., 1998a; Grala y col., 1999; Pérez-Maldonado, 1999; Booth y col., 2001; Mariscal-Landín y col., 2002)

Sustancia seca	859.8 – 913	Proteína	156 – 347
<b>Aminoácidos esenciales</b>		<b>Aminoácidos no esenciales</b>	
Arginina	11.13 - 28.24	Ácido aspártico	16.60 - 30.56
Histidina	4.20 - 6.67	Ácido glutámico	30.90 - 53.16
Lisina	13.00 - 19.87	Serina	7.30 - 13.00
Fenilalanina	9.70 - 13.18	Prolina	6.40 - 11.66
Leucina	13.40 - 21.10	Glicina	8.00 - 14.50
Isoleucina	6.20 - 12.50	Alanina	8.80 - 14.90
Valina	9.10 - 13.90	Cisteína	2.40 - 5.00
Metionina	1.60 - 3.70	Tirosina	6.10 - 9.31
Treonina	7.20 - 10.90		
Triptófano	1.80 - 3.60		

#### 2.2.1.4. Utilización Nutritiva

La calidad nutricional de las proteínas depende de su digestibilidad y de la biodisponibilidad de sus aminoácidos. La utilización neta de la proteína de los guisantes es del 34%, la cual es mayor que la de la soja pero inferior que la mayoría de los alimentos comunes. Las distintas fracciones de proteína del guisante, se diferencian en su perfil aminoacídico y en su calidad nutricional. Se ha demostrado que la albúmina existente en los cotiledones es nutricionalmente superior que la globulina (Boulter y Derbyshire, 1971; Murray, 1979; Bajaj y col., 1971b; Hurich y col., 1977; Chen & Thacker, 1978).

Todas las proteínas de las legumbres son pobres en aminoácidos azufrados, pero las cantidades de otros aminoácidos esenciales, como la lisina, es mucho mayor que en los cereales (Duranti y Gius, 1997). Por lo tanto, con respecto al contenido en lisina y aminoácidos azufrados, los cereales y las legumbres son nutricionalmente complementarios. El grado de suplementación debe también depender, sin embargo, de los contenidos de los segundos aminoácidos limitantes: treonina, en cereales y triptófano, en legumbres. Los bajos niveles de aminoácidos azufrados es la principal causa de su escaso valor biológico, se ha demostrado que a través de la adición de metionina a las dietas que contienen guisantes y otras legumbres se puede mejorar dicho valor (Patwardhan, 1962; Urbano y col., 1995).

Habiba (2002) observó que la digestibilidad *in vitro* de la proteína del guisante crudo era de 73.5%. Como ya hemos indicado anteriormente el guisante es una fuente excelente de proteínas, pero al igual que ocurre con el resto de las proteínas de origen vegetal tienen inferior calidad nutricional que las de origen animal, debido a su bajo contenido en aminoácidos azufrados (Sarwar y Peace, 1986), la estructura tan compacta de las proteínas (Hsu y col., 1977) y la presencia de factores no nutritivos, tales como inhibidores de las proteasas, taninos y ácido fítico (Savage & Deo, 1989; Nielsen, 1991; Bishnoi & Khetarpaul, 1994a; Chau & Cheng, 1997; Alonso y col., 2000a). Los taninos y el ácido fítico se acomplejan con proteínas e incrementan su resistencia a la degradación proteolítica y las enzimas inhibidoras (de tripsina y quimotripsina) interfieren la acción de las enzimas proteolíticas digestivas afectando la digestibilidad de las proteínas y su posterior absorción (Jaffe, 1950; Liener, 1979; Gwiazda y col., 1980; Evans y Boulter, 1980; Bressani y col., 1982; King and Puwastien, 1987; Huisman y col., 1990). De manera que la reducción o eliminación de dichos factores no nutritivos es importante para mejorar la utilización biológica de la proteína de las legumbres, incluyendo el guisante. Múltiples procesos tanto a escala industrial como casera han sido empleados para mejorar las propiedades nutricionales de la legumbre (Melcion and van der Poel, 1993; Campbell y Van der Poel, 1998), tales como, remojado (Vidal-Valverde y Frias, 1993a; Vidal-Valverde y col., 1994 y 1997), descascarillado (Davedy y col., 1998; Booth y col., 2001; Cruz-Suarez y col., 2001; Mariscal-Landín y col., 2002), molienda (Periago y col., 1998), germinación (Urbano y col., 1995; Wanasundara y col., 1999), fermentación, cocción (Abd el-Moniem y col., 2000; Habiba, 2002), extrusión (Fernández y col., 1996; Vidal-Valverde y col., 1997; Alonso y col., 2000a y b; Burel y col., 2000; Mariscal-Landín y col., 2002),

microondas (El-Adawy y Tarek, 2002; Abd El-Rahman y Abd El-Aleem, 1996; Habiba, 2002), tostado (Caribe y col., 1997a,c), fritura (Abd El-Moniem y col., 2000).

Sin embargo, la eficacia del procesado y sus efectos varían notablemente dependiendo de las técnicas y condiciones, incluyendo tiempo, temperatura, contenido en humedad y pH (Singh, 1985; Fernández y col., 1996; Nestares y col., 1996).

El procesado normalmente afecta a factores tales como el contenido en inhibidores de la actividad de la tripsina (TIA) y fitatos que al reducirse mejoran la biodisponibilidad de las proteínas y los minerales (Nestares y col., 1999). Giami y col. (1999) observaron que tras someter a un proceso de germinación a *Telfaria occidentales Hook* se incrementaba la digestibilidad de la proteína ya que la germinación conduce a una reducción del contenido en ácido fítico y polifenoles, y a un aumento de proteína cruda y de la solubilidad del nitrógeno. Habiba (2002) sugirió que la digestibilidad in vitro de la proteína del guisante incrementaba en los guisantes cocidos, en comparación con el guisante crudo, debido a la completa eliminación de los TIA (Gad y col., 1982), la reducción del contenido de taninos y ácido fítico (El-Shami, 1993), y también por el efecto del calor sobre la estructura tridimensional de las proteínas del guisante (Hsu y col., 1977; Chau & Cheung, 1997). Aunque no podemos olvidar que algunas proteínas, tales como las globulinas, son intrínsecamente más resistentes a la proteólisis (Chau & Cheung, 1997) incluso después del tratamiento térmico (Alonso y col., 2000a y b).

## **2.2.2. HIDRATOS DE CARBONO**

### **2.2.2.1. Composición Química**

Las leguminosas son una importante fuente de hidratos de carbono, que entran en su composición en una proporción del 24 al 68%. Esta incluye mono y oligosacáridos, almidón y otros polisacáridos (tabla 6). Las semillas de los guisantes contienen alrededor de un 60% de carbohidratos entre azúcares tales como mono-, di-, oligo- y polisacáridos, los últimos componentes del almidón y polisacáridos no amiláceos (NSP) (Daniel, D., Sundarraj, P., y Thulsidas, G., 1970-1957).

**Tabla 6.** Contenido de carbohidratos en el guisante crudo (g Kg<sup>-1</sup> de sustancia seca) (Reddy, N. R., 1984; NRC, 1994; 1998; Igbasan and Guenter, 1997; Caribe y col., 1997a,b; Periago y col., 1996; Frias y col., 1998; Gelencsér y col., 1998a; Grala y col., 1999; Alonso y col., 2000a; Booth y col., 2001; Guillon & Champ, 2002; Mariscal-Landín y col., 2002; Salgado y col., 2002; Wang y Daun, 2004)

Sustancia seca	859.8 – 913
Azúcares de bajo peso molecular	
Fructosa	ND - 1
Glucosa	ND
Sacarosa	7.0 – 39.0
Maltosa	ND
Melibiosa	ND
Oligosacáridos	52.8 – 75.8
α-galactósidos	22.9– 96.0
Rafinosa	3.0 – 23.0
Estaquiosa	3.0 – 42.0
Verbascosa	ND – 43.0
Azúcares solubles totales	35 – 138
Almidón	247 – 574

ND: No detectado.

El contenido de azúcares puede variar dependiendo de la variedad de guisantes, así Reddy y col (1984) estudiaron el contenido de azúcares del guisante de variedad lisa y rugosa observando significativas diferencias entre ambas (tabla 7), los guisantes arrugados contienen mayores cantidades de sacarosa y de alfa-galactósidos que los lisos. Sin embargo los guisantes arrugados tienen relativamente menos proporción de almidón que los lisos, coincidiendo con las determinaciones de McCready y col. (1950) en las que los niveles de almidón eran del 34% y del 42% en el guisante arrugado y liso respectivamente.

**Tabla 7.** Composición de carbohidratos en dos variedades del guisante (g 100g de semilla).

<b>Nutriente</b>	<b>Guisante liso</b>	<b>Guisante arrugado</b>
Azúcares totales	5.3-8.7	10.2-15.1
Sacarosa	2.3-2.4	2.3-4.2
Rafinosa	0.3-0.9	1.2-1.6
Estaquiosa	2.2-2.9	2.9-5.5
Verbascosa	1.7-3.2	2.2-4.2
Almidón	36.9-48.6	24.0-36.6
Celulosa	0.9-4.9	1.2-4.2
Hemicelulosa	1.0-5.1	0.9-6.6
Lignina	0.5-0.9	0.3-1.0
Carbohidratos totales	56.6	----

**a) Monosacáridos y disacáridos:**

Las semillas contienen sacarosa y oligosacáridos mientras que la proporción de monosacáridos es muy baja (Vose, J.R., Basterrechla, M.J., y col. 1976; Cerning-Beroard, J. y Filiatre, A., 1976). La proporción de sacarosa existente en los guisantes es de alrededor de un 3% que representa de un 22 a un 25% de los azúcares totales (Sosulski, F.W., Elkowicz., y col.,1982; Guillon & Champ, 2002).

**b) Oligosacáridos:**

Los principales oligosacáridos son de la familia de la rafinosa de  $\alpha$ -galactósidos, fructo-oligosacáridos procedentes de los vegetales, y malto-oligosacáridos derivados de los hidrolizados del almidón. Sucesivas uniones de una unidad de galactosil a sacarosa dá lugar a rafinosa, estaquiosa, verbascosa y ajugosa. En concreto estos derivados de la sacarosa, contienen de 1 a 4 unidades de

galactosa, unidas entre si a través de enlaces  $\alpha$ -1,6, y una molécula de sacarosa, unida en uno de los extremos mediante un enlace  $\alpha$ -1,4 (Guillon & Champ, 2002). Estos oligosacáridos de la familia de la rafinosa predominan en la mayoría de las legumbres (31.1-76%, Olson y col., 1981), en el guisante se encuentra en unas proporciones de 32 a 46 g/Kg (Bach Knudsen, 1997). La mayor presencia de un oligosacárido en particular parece depender del tipo de leguminosa. Guillon & Champ (2002) observaron que el contenido en  $\alpha$ -galactósidos del guisante (5.1-8.7%) era inferior a lupino (7.4-9.5%), similar al garbanzo (7.4-7.5%), lenteja (3.0-7.1), judía (2.6-6.6%) y soja (2-6%) e inferior al haba (3.1-4.2%). Vidal-Valverde y col. (1998a) dedujo la cantidad de dichos componentes en los guisantes verdes crudos: 0.6% de rafinosa, 2.27% de estaquiosa y 2.49% de verbascosa. Cada una tiene una molécula adicional de galactosa unida, empezando por una en el caso de la rafinosa, hasta tres en la verbascosa.

### c) Almidón:

El almidón es el principal hidrato de carbono presente en las leguminosas, representando al 45-60% de los mismos, los guisantes contienen alrededor de un 20 a un 50% (Guillon & Champ, 2002).

El almidón es un polisacárido presente en los gránulos amiláceos como mezcla de **amilasa** (no ramificada, soluble en agua) y **amilopectina** (ramificada, soluble en soluciones coloidales). El tamaño del gránulo es bastante variable (1-80 $\mu$ m) dependiendo de la leguminosa, en los guisantes tiene un diámetro de 40 $\mu$ . El tamaño medio de los gránulos de almidón es menor (30 $\mu$ ) en los guisantes lisos que en los arrugados (40 $\mu$ ). La mayoría de los gránulos son alargados, aunque se dan también gránulos esféricos, ovoidales, elípticos e irregulares, están envueltos por la pared celular, pudiendo estar también empaquetados en compartimentos con forma de saco y se encuentran en el tejido parenquimatoso de los cotiledones del guisante.

En las leguminosas en general, la amilosa puede constituir una porción significativa del almidón (10-66%), siendo los guisantes arrugados los que contienen niveles mas elevados (66-72%) (Guillon & Champ, 2002). La cantidad de amilosa en el almidón tiene influencia en su solubilidad, unión a los lípidos y otras propiedades funcionales. La amilopectina parece ser responsable de la solubilidad de los gránulos

de almidón, y junto con la amilosa es también responsable de la forma estructural del gránulo de almidón.

El grado de polimerización del almidón es variable (540-4.000), un alto grado de polimerización de la amilosa puede conferir estabilidad estructural al gránulo y ser parcialmente responsable de su resistencia a la  $\alpha$ -amilolisis *in vitro*.

El almidón de los guisantes está dividido en dos clases principalmente: pobres y ricos en amilosa. Las semillas de los guisantes lisos contienen bajos niveles de amilosa (29 a 35%) mientras que las de los guisantes arrugados llegan a tener elevadas cantidades de amilosa (66 a 99%) (McCready y col. 1950; Potter y col. 1953; Lynch y col. 1959; Greenwood, C.T. & Thomas, J., 1962; Biliaderis y col. 1980; Guillon & Champ, 2002). Potter y col. (1953) dedujeron el peso molecular medio de la amilosa y la amilopectina de los almidones del guisante: 125.000 y 200.000, respectivamente. El contenido proteico, la afinidad al yodo y el contenido en amilosa son relativamente más bajos en los guisantes lisos que en los arrugados. El almidón de los guisantes arrugados tiene unas inusuales propiedades físicas que le hacen gelatinizar de forma diferente al almidón ordinario, ya que forma una suspensión y no una pasta (Hilbert, G. E. & McMasters, M. M., 1946), lo cual se ha atribuido a su elevado contenido en amilosa. La temperatura de gelatinización del almidón de los guisantes lisos está entre los 55 y 65°C y en los guisantes arrugados está entre 55-125°C (Guillon & Champ, 2002). Comer y Fry dedujeron que la temperatura de gelatinización del almidón del guisante podía disminuirse mediante acetilación y cross-linking.

#### 2.2.2.2. Clasificación Nutricional

Hay que tener en cuenta el papel que juegan la función que tiene cada uno de los tipos de sacáridos: la energía necesaria para crecer (mono y disacáridos), el almacén de carbohidratos (oligosacáridos y almidón) y los componentes estructurales de las paredes celulares (polisacáridos no-celulósicos, pectinas, hemicelulosa y celulosa). Desde el punto de vista de la nutrición humana los sacáridos pueden ser clasificados en dos grupos: **carbohidratos utilizables**, los cuales son enzimáticamente digeridos en el intestino delgado y los **carbohidratos no utilizables**, los cuales son fermentados por la microflora del intestino grueso:

<b>Papel en la planta</b>	<b>Tipo de sacárido</b>	<b>Lugar de la digestión</b>	<b>Producto de la digestión</b>	<b>Clasificación fisiológica</b>
Fuente de energía para el crecimiento	Momo- y disacáridos	Intestino delgado (enzimático)	Mono- y disacáridos	<b>Carbohidratos Utilizables</b>
Almacén de polisacáridos	Almidón: - amilosa - amilopectina			
Almacén de oligosacáridos	$\alpha$ -galactósidos	Intestino grueso (microbial)	Acetato Propionato Butirato	<b>Carbohidratos No Utilizables</b>
Componentes Estructurales de la pared celular	Policacáridos no celulósicos Pectinas Hemicelulosa Celulosa		CO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> CH <sub>4</sub>	

La transformación de polisacáridos, oligosacáridos y disacáridos de la dieta en los monosacáridos correspondientes se realiza de forma secuencial en el tracto gastrointestinal, mediante procesos de hidrólisis glucosídicas. La acción es catalizada por una serie de enzimas hidrolíticas, que reciben conjuntamente el nombre de glucosidasas. El proceso se lleva a cabo por dos conjuntos de enzimas:  $\alpha$ -amilasas y oligosacaridasas (donde aquí incluimos las disacaridasas).

Dentro del grupo de los carbohidratos utilizables se encuentran los mono- y disacáridos, que son rápidamente absorbidos en el intestino delgado en grandes cantidades, a excepción de los individuos con déficit congénito de malabsorción a glucosa/galactosa. Mientras que la absorción de glucosa no depende de otros azúcares, la capacidad de absorción de la fructosa, sin embargo, va a depender de sí se ingiere sola, o de sí se realiza simultáneamente con glucosa o en forma de sacarosa.

Los disacáridos presentes en los alimentos son la sacarosa, que suele estar presente en cantidades considerables en los vegetales crudos y procesados, y la lactosa único disacárido de que se encuentra en los alimentos de origen animal. La sacarosa es hidrolizada a sus monosacáridos constituyentes por la sacarasa en la

superficie de la membrana del eritrocito.

Algunos animales de laboratorio se han usado como modelos extrapolares a humanos en el estudio de la digestión del almidón. Las ratas tienen muchas similitudes con los humanos en el proceso de digestión. El primer paso de la digestión ocurre en la boca por la acción de la  $\alpha$ -amilasa salivar, una endo-amilasa que rompe aleatoriamente los enlaces  $\alpha$  (1-4) de la amilosa y amilopectina. En contradicción con lo que tradicionalmente se ha aceptado sobre la limitada acción de dicha enzima debido a su rápida inactivación por las condiciones de acidez gástrica (Gray, 1992), la amilasa salivar parece que contribuye significativamente a la ruptura del almidón *in vivo* (Kurashi & Inomata, 1989). Posteriormente la digestión continúa en el lumen del intestino delgado, donde la amilasa pancreática sigue con la ruptura de los enlaces  $\alpha$ -(1-4), produciendo pequeñas cantidades de glucosa en mezcla con maltosa, maltotriosa y dextrinas, que incluyen ramificaciones con enlaces  $\alpha$ (1-6) de amilopectina. La ruptura final de di-, tri-, y oligosacáridos se lleva a cabo en los *villus* del borde en cepillo de las células de la mucosa del intestino delgado por enzimas de la membrana, las disacaridasas. La acción de este grupo de enzimas, que incluyen maltasa-sacarasa, maltasa-isomaltasa y maltasa-glucoamilasa (Dahlqvist & Semenza, 1985), permite la completa hidrólisis de los constituyentes del almidón a glucosa libre.

Normalmente, la mayoría de los almidones son completamente digeridos antes de alcanzar el íleon (Riensefd y col., 1980). Sin embargo, en época relativamente reciente diversos investigadores han observado bajos niveles de asimilación en almidones que tradicionalmente eran considerados como totalmente digeribles y asimilables (Asp, 1989; Southgate, 1989; Cummings y col., 1986). Las propiedades nutricionales del almidón en las comidas depende de su biodisponibilidad en la digestión y/o absorción en el tracto gastrointestinal (Björck & Asp, 1994). Desde este punto de vista Englyst y col. (1982a y b y 1987) proponen la siguiente clasificación nutricional del almidón:

☺ **Almidón rápidamente digerible:** almidón hidrolizado y absorbido en el intestino delgado con respuesta glucémica elevada. Fuente: alimentos ricos en almidón recientemente cocinados.

☹ **Almidón lentamente digerible:** almidón hidrolizado y absorbido en el intestino delgado con respuesta glucémica pequeña. Fuente: la mayoría de los

cereales crudos.

☹ **Almidón resistente:** almidón que no es hidrolizado y absorbido en el intestino delgado con respuesta glucémica nula. Fuente: granos y semillas parcialmente molidos, patata y plátano crudos, patata cocinada refrigerada, palomitas y pan.

La digestibilidad del almidón depende de la variedad de la semilla (la cual determina la composición y la estructura espacial de los polímeros de amilosa y amilopectina), y en la forma de prepararlo para su consumo, ya que durante los tratamientos tecnológicos (calentamiento, congelación, etc.), una parte del almidón es cristalizada y retrogradada. La retrogradación es una recristalización de las cadenas lineales de amilosa y, más tarde, de las ramificaciones de amilopectina. Como consecuencia, esta parte del almidón y el almidón no digerido en el intestino delgado por distintas razones, por ejemplo el corto periodo de duración de la actividad de las enzimas digestivas sobre los gránulos de almidón cubiertos con paredes celulares (Asp, 1989), pasan al intestino grueso en forma de almidón resistente donde serán fermentados por la microbiota existente (Noah y col., 1998).

Diferentes estudios reflejan el elevado contenido en almidón resistente, próximo al 15% del almidón total, en distintos alimentos, incluso un contenido superior fue determinado por Brighenti y col. (1998) en los granos de legumbres procesadas en distintas formas en la dieta italiana. Las semillas secadas, enlatadas y congeladas de judías, lentejas, guisantes y garbanzos contienen 116.0, 124.1, 114.4, 109.0 g/Kg de almidón resistente respectivamente, la media en las legumbres es 116.8 g/Kg, mientras que en cereales es 32.2 g/Kg y en patatas es 56.7 g/Kg. En los granos de legumbres el contenido en almidón resistente es incluso superior al 20% del almidón total (Brighenti y col., 1998).

Dentro del grupo de los carbohidratos no utilizables se encuentran aquellos carbohidratos que alcanzan el tracto final del intestino delgado sin hidrolizar y es en el colon donde son fermentados por la microflora microbiana. En este tipo de carbohidratos se incluyen los  $\alpha$ -galactósidos y los componentes de la fibra alimentaria.

Shurpalekar y col. (1979), así como Geervani y Theophilus (1981) observan que no existe correlación entre la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* de los carbohidratos.

Estas diferencias pueden deberse a la inhibición de la reacción enzimática por parte del producto de la amilólisis *in vitro* a la situación de los productos y la reacción en la pruebas *in vivo*, donde pueden actuar otras enzimas a parte de la  $\alpha$ -amilasa.

La menor digestibilidad de los carbohidratos procedentes de la leguminosa parece ser debida a la presencia de otros carbohidratos además del almidón. Los almidones procedentes de leguminosas reducen la digestibilidad de la caseína en un 3-4% (Fleming, 1982) y el procesado por desecación y calentamiento no parece aumentar la digestibilidad.

### 2.2.2.3. Valor Nutritivo

La respuesta glucémica desencadenada tras el consumo de ambos, azúcares y almidones, depende del tipo de azúcar presente y de la forma del almidón. Los carbohidratos complejos necesariamente no producen una menor o inferior respuesta glucémica que los azúcares.

Los carbohidratos que son digeridos y absorbidos lentamente dan lugar a una repuesta postprandial de glucosa más prolongada y menos elevada que aquellos que se digieren y absorben rápidamente, que producen aumentos significativos en los niveles de glucosa en sangre, necesitando una mayor respuesta de insulina (Jenkins y Wolever, 1981). La liberación de cantidades elevadas de insulina parece llevar a una disminución de la sensibilidad de los receptores de esta y a una resistencia relativa a la misma, un factor que puede ser crucial en la aparición de diabetes y obesidad. También se la ha relacionado con un aumento en los niveles séricos de triglicéridos (Albrink y col., 1979), lo cual es considerado por algunos como un factor de riesgo cardiovascular en individuos susceptibles (Bottinger y Carlson, 1980). Los alimentos que producen un bajo nivel de glucosa sanguínea postprandial y una baja secreción de insulina pueden, por tanto, ser efectivos en el control de la diabetes y la hiperlipemia (Wolever, 1990).

Las leguminosas producen una baja respuesta glucémica, ya que la fracción de almidón que es digerida en el intestino delgado es pequeña. En comparación con los cereales, las leguminosas se digieren más lentamente y causan menor respuesta glucídica sanguínea, así como menor secreción de insulina.

Con respecto al almidón de las legumbres, la naturaleza de la baja respuesta glucémica tras su consumo, parece ser debida a:

- ✘ La baja disponibilidad del almidón debido a su elevado contenido en amilosa, lo cual aumenta la posibilidad de retrogradación del almidón..
- ✘ La disminuida accesibilidad física del almidón debida a que este se encuentra atrapado en las paredes celulares de los cotiledones.
- ✘ Las posibles interacciones de las enzimas amilolíticas con los compuestos no nutritivos, como los inhibidores de la  $\alpha$ -amilasa se inactivan durante el cocinado.
- ✘ En las semillas crudas es más resistente que la mayoría de los almidones de los cereales debido a su elevada cristalización.
- ✘ La posible gelatinización incompleta del almidón durante el cocinado debido al grosor y la resistencia mecánica de las paredes celulares, ya que para que la gelatinización sea total necesita de temperaturas muy elevadas.
- ✘ Después de una cocción adecuada tiene una mayor capacidad de retrogradación que la mayoría de los almidones con menor contenido en amilosa.

Por otra parte, con respecto a los carbohidratos considerados como poco digeribles, tales como, fibra dietética (pectinas, celulosa, inulina), almidón resistente, oligosacáridos (fructo y galactooligosacáridos,  $\alpha$ -galactósidos), polioles (xilitol, solbitol) y azúcares raros (lactulosa, isomaltosa) (Livesey, 2001) se ha demostrado que al ser resistentes a las enzimas endógenas del intestino delgado alcanzan el intestino grueso donde van a ser fermentados por las enzimas producidas por la flora intestinal, principalmente por *Bifidobacteria* y *Lactobacilli*, pero no por *Clostridium* y *Enterobacteriaceae* (Chesson, 1995), generando ácidos grasos volátiles de cadena corta (SCFA) (acetato, propionato, butirato) y L-lactato, que reducen el pH del medio, así como, gases tales como, metano, dióxido de carbono e hidrógeno, responsables de la reducida tolerancia a estos nutrientes (Cummings, 1985; Boret, 1994; Anderson y col., 1999; Van Dokkum y col., 1999; Ahmed y col., 2000; Topping y Clifton, 2001).

En términos generales los efectos positivos de estos carbohidratos poco digeribles según Livesey (2001) son:

PROPIEDADES FISIOLÓGICAS	EFECTO POSITIVO
Bajo valor energético	Ayuda frente a la obesidad
Escasa acidificación oral	Prevención de la caries dental
Modificación de los niveles plasmáticos lípidos	Enfermedades coronarias
Capacidad de aumentar de tamaño al hidratarse	Saciedad
Aumento del bolo fecal	Efecto laxante, reducción del riesgo de cáncer de colon y del síndrome de colon irritable
Producción de butirato y acidificación del colon	Salud del colon
Baja respuesta glucémica	Diabetes tipo II
Aumentan la biodisponibilidad de minerales ( $\text{Ca}^{+2}$ , $\text{Mg}^{+2}$ , $\text{Fe}^{+2}$ )	Osteoporosis
Efecto prebiótico	Estimulación de <i>Bifidobacteria</i> y <i>Lactobacilli</i>

La mala absorción de estos nutrientes representa una pérdida calórica, ya que no se podrá obtener de ellos la energía que generan cuando son metabolizados en nuestro organismo.

Estos efectos potenciales frente el cáncer colon-rectal y enfermedades infecciosas en el intestino grueso pueden deberse por una parte, a la estimulación de los colonocitos, ya que los ácidos grasos de cadena corta son su principal fuente energética, y por otra, a la inactivación de las bacterias putrefactas (*Clostridium perfringens*) y patogénicas (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria* sp y *shigella*) del colon, como consecuencia de la proliferación selectiva de *Bifidobacteria* y *Lactobacilli* y la acidificación del medio (Guillon & Champ, 2002).

La posibilidad de la mejora del metabolismo de lípidos ha ganado peso desde que se observó como los fructooligosacáridos provocaban una supresión del triacilglicerol hepático y de la síntesis de VLDL en animales, resultando una reducción

en los niveles de triacilglicerol y, en menos cantidad, de colesterol (Taylor & Williams, 1998).

Los minerales que se encuentran fuertemente ligados a las paredes celulares de los vegetales, almidón resistente y oligosacáridos pueden quedar liberados gracias a la rotura microbiana de estos complejos polisacáridos en el intestino grueso. Por ello es importante considerar la contribución del colon a la absorción total de los minerales ligados a estos compuestos. De hecho, el efecto de los carbohidratos fermentables y el ácido fólico en la biodisponibilidad de los minerales son controvertidos porque la microflora digestiva puede expresar una actividad fitasa (Miyazawa y col., 1996, Wise y Gilbert, 1982, Yoshida y col., 1985) y las fermentaciones microbianas pueden aumentar la solubilidad de los cationes divalentes en el intestino grueso el cual mejoraría su absorción (Delzenne y col. 1995, Schulz y col. 1993, Trinidad y col. 1993; Delzenne y Roberfroid, 1994; Behall y col., 2002). Así pues, es posible desplazar la zona de absorción desde el intestino delgado hasta el grueso, con una mejora potencial en la disponibilidad de absorción, sobretodo del calcio y magnesio (Younes y col. 1996). Este desplazamiento puede superar los negativos efectos quelantes de la fibra y el ácido fólico (López y col., 1998).

Los carbohidratos poco digeribles han sido identificados como agentes prebióticos. Gibson y Roberfroid (1995) definen a un prebiótico como “ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al huésped por la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de uno o un número limitado de bacterias en el colon, que pueden mejorar la salud del huésped”. Actualmente en Europa, los principales prebióticos empleados son inulina y fructooligosacáridos.

Por otra parte, la estimulación de *Bifidobacteria* puede tener múltiples beneficios para la salud humana (O’Sullivan, 1996):

- ✘ Protección frente a infecciones entéricas.
- ✘ Reducción del pH intestinal.
- ✘ Supresión de la flora putrefacta y patogénica del colon.
- ✘ Estimulación del sistema inmune.
- ✘ Reducción de los niveles plasmáticos de amonio y colesterol.
- ✘ Estimulación de la función intestinal.
- ✘ Favorece la digestión y absorción de los alimentos.

✘ Producción de vitaminas.

De esta forma pueden mejorar el balance y la población microbiana, beneficiando la salud y el crecimiento del individuo ya que promueven unas condiciones idóneas en el colon y reducen el riesgo de padecer cáncer de colon al normalizar el tránsito del bolo intestinal y reducir los niveles del potencial carcinógeno N-nitrosamina (Koo & Rao, 1991; Rowland y col., 1998; Van Loo, 1998).

Estos potenciales efectos beneficiosos de los carbohidratos poco digeribles han sido ampliamente estudiados en humanos (Roberfroid, 1997 y 1998; Grizard & Barthomeuf, 1999; Anderson y col., 1999; Topping y Clifton, 2001). Van Loo y col. (1999) identificó a los  $\alpha$ -galactósidos como agentes prebióticos. Gulewicz y col. (2002) demostraron como los  $\alpha$ -galactósidos del guisante no eran tóxicos en las ratas y estimulaban significativamente en el crecimiento de las bifidobacterias en el colon, así como reducían la población de coliformes en el mismo.

### 2.2.3. FIBRA DIETÉTICA

La fibra alimentaria es un componente importante de los alimentos vegetales que procede de las paredes y tejidos de frutas, hortalizas, cereales y leguminosas.

La fibra alimentaria procede principalmente de la pared celular de los vegetales, donde se encuentra una mezcla de polisacáridos con una compleja distribución. Los componentes mayoritarios de la fibra alimentaria son celulosa, hemicelulosa, pectinas, lignina, carragenatos, alginatos, gomas y mucílagos. Además, otros componentes de las células vegetales están presentes en pequeñas cantidades en las fracciones de fibra alimentaria y pueden ser de importancia fisiológica. Entre estos se encuentran las proteínas de la pared celular, polifenoles de alto peso molecular, ceras, cutinas, ácido fítico, ésteres de ácido acético, minerales y almidón resistente.

Hasta hace poco tiempo, la fibra alimentaria estaba considerada como un componente secundario de los alimentos debido a su escaso valor nutritivo y su nulo aporte calórico. Sin embargo, su presencia en la dieta ha ido adquiriendo importancia

a partir de 1973, cuando Burkitt sugiere la existencia de una relación entre la carencia de fibra alimentaria en la dieta con el desarrollo de diferentes enfermedades y trastornos fisiológicos, siendo estos más frecuentes en los países industrializados, caracterizados por dietas ricas en alimentos refinados. El consumo diario de fibra alimentaria en Europa es aproximadamente de 12-25g (Cummings, 1993). Continuas y fuertes recomendaciones han sido realizadas por las autoridades sanitarias para doblar o triplicar la ingesta actual entre la población.

En 1972, Trowell introduce el nombre de fibra dietética o fibra alimentaria. Este término engloba la porción de alimento constituida por restos esqueléticos de las células vegetales que son resistentes a la hidrólisis por los enzimas digestivos del hombre. Esta denominación es posteriormente aceptada por la FAO (1982), e incluye celulosa, hemicelulosas, sustancias pécticas, gomas, mucílagos y lignina. Posteriormente, Englyst y col. (1987) definen el término fibra dietética para indicar los materiales presentes en las paredes vegetales de los alimentos, estos materiales son principalmente polisacáridos no almidónicos (NSP).

Las leguminosas son un alimento especialmente rico en fibra alimentaria, presentando cantidades que oscilan entre un 11% y un 25% (Reddy y col., 1984) de lo que se deduce que las dietas ricas en leguminosas constituyen un importante aporte de fibra alimentaria, que puede ayudar a paliar ciertas patologías asociadas al bajo consumo de este componente vegetal. El contenido en fibra alimentaria existente en el guisante crudo se refleja en la siguiente tabla (Tabla 8).

Cerning-Beroard & Filiatre (1976) aseguran que las semillas de los guisantes arrugados son más ricas en hemicelulosa. La cantidad de pentosanos liberados por HCl 0.7 N es mayor en los guisantes arrugados (1.93%) que en los lisos (0.81%). La misma tendencia se observó con las pentosas liberadas por H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> siendo 1.16 y 0.93% respectivamente. Las pentosas se encuentran en un principio asociadas a la celulosa. La fibra cruda está concentrada en la pared de la semilla ó en la cáscara de la semilla del guisante que constituye alrededor del 8.2% de la semilla y contiene más o menos un 55.2% de celulosa y un 23.1% de hemicelulosa (Vose y col., 1976). Los azúcares hidrolizados durante la hidrólisis ácida acuosa de la cáscara demuestra la existencia de xilosa y arabinosa, pequeñas cantidades de glucosa, galactosa y ramnosa y trazas de fructosa y ácido urónico.

**Tabla 8.** Composición química de la fibra alimentaria del guisante crudo (valores expresados en g Kg<sup>-1</sup>) (Reddy, N. R., 1984; NRC, 1994; 1998; Periago y col., 1996; Igbasan and Guenter, 1997; Caribe y col., 1997a,b; Frias y col., 1998; Gelencsér y col., 1998a; Grala y col., 1999; Pérez-Maldonado, 1999; Alonso y col., 2000a; Bruno-Soares y col., 2000; Kozłowska y col., 2000; Booth y col., 2001; Mariscal-Landín y col., 2002; Salgado y col., 2002; Wang y Daun, 2004).

<b>NSP</b>	64 – 204	<b>NCP</b>	
NDF	77 – 256.0	Rhamnosa	0.9 - 4
ADF	ND - 127.3	Fructosa	0.4 – 0.6
ADL	0.35 – 22.0	Arabinosa	19.4 - 40
Hemicelulosa	10 – 124	Xilosa	7.3 - 14
Celulosa	9 – 133	Mannosa	0.9 – 4.9
		Galactosa	8 - 21.5
		Glucosa	0,5 – 59.7
		Ácido urónico	15.0 - 27
Sustancias pécticas		1 – 37	
Saponina		1.1 – 1.6	
<b>SDF</b>		81 – 100	
<b>IDF</b>		91 – 116	
<b>TDF</b>		61.2 – 275	

NSP: polisacáridos no amiláceos; NDF: fibra detergente neutra; ADF: fibra detergente ácida; NCP: Polisacáridos no celulósicos; TDF: fibra total; SDF: fibra soluble; IDF: fibra insoluble.

Existen en la literatura científica varias metodologías para la determinación del contenido de fibra en los alimentos. Van Soest (1980) introdujo una clasificación basándose en la distinta solubilidad de los componentes de la fibra en soluciones detergentes neutras o ácidas. Propone los términos de fibra detergente neutra (FDN) que incluye almidón resistente, celulosa, hemicelulosa y lignina y fibra detergente ácida (FDA) que es la suma de celulosa y lignina. Estas definiciones son bastante utilizadas en la literatura especializada. Cabe señalar que en este método no se

incluyen las sustancias pécticas.

El método descrito por Prosky y col. (1988) clasifica la fibra dietética según su solubilidad en agua como fibra soluble e insoluble, ambas fracciones con efectos fisiológicos completamente distintos. La fibra dietética soluble incluye pectinas, gomas, mucílago y ciertos tipos de hemicelulosas solubles y polisacáridos de reserva de la planta. La fibra dietética soluble se caracteriza porque gran parte de ella sufre un proceso bacteriano de fermentación en el colon con producción de hidrógeno, metano, dióxido de carbono y ácidos grasos de cadena corta que son absorbidos y metabolizados. Los efectos fisiológicos de esta fracción de fibra se asocian generalmente con la disminución del colesterol en sangre y con el control de la glucosa en sangre.

La fracción de fibra dietética insoluble incluye celulosa, lignina y algunas fracciones de hemicelulosa (Martín-Cabrejas y col., 2003). Apenas sufre procesos fermentativos en el intestino grueso y tiene un efecto más marcado en la regulación del tránsito intestinal y aumento de la excreción fecal. Habitualmente, en la literatura científica se registran los contenidos de polisacáridos y ligninas, su composición en monosacáridos y ácidos urónicos, así como su proporción relativa de fibra soluble e insoluble.

La fibra cruda no puede ser digerida completamente por el sistema digestivo del hombre. Por consiguiente, nutricionalmente, la fibra cruda es considerada como la porción de la comida menos significativa. La celulosa es el menos digerible y tiene un efecto directo en la utilización de otros nutrientes (Ali y col., 1981), principalmente proteínas (Wogcik & Delrome, 1982). Sin embargo la importancia de la fibra alimentaria en las dietas de los países desarrollados ha sido reconocida en los últimos años (Ali y col., 1981; Wogcik & Delrome, 1982; Soni y col., 1979; Soni y col., 1982; Graude y col., 1965; Mathur y col., 1964; Kritchovsk & Storey, 1974; Singh y col., 1983).

El almidón no digerido y la arquitectura celular intacta pueden llegar a ser más importantes que la fibra dietética normalmente definida. Además, una dieta rica en almidón y paredes celulares intactas puede tener otros beneficios como su riqueza en micronutrientes y potasio y su baja concentración en grasa, azúcar y sodio. Tal dieta combina virtualmente todas las guías internacionalmente aceptadas para una

alimentación adecuada.

Numerosos estudios experimentales y epidemiológicos atribuyen a la fibra propiedades diversas como las de regulador intestinal, actuando como laxante, factor preventivo del cáncer de colon, adsorbente de ácidos biliares, retardador de la absorción intestinal de grasa y glucosa y factor que favorece la disminución de colesterol en sangre.

Periago y col. (1993) han propuesto un esquema sencillo de las distintas fracciones de fibra dietética (FD) y sus fracciones soluble (FDS) e insoluble (FDI), describiendo sus efectos fisiológicos beneficiosos para la salud.

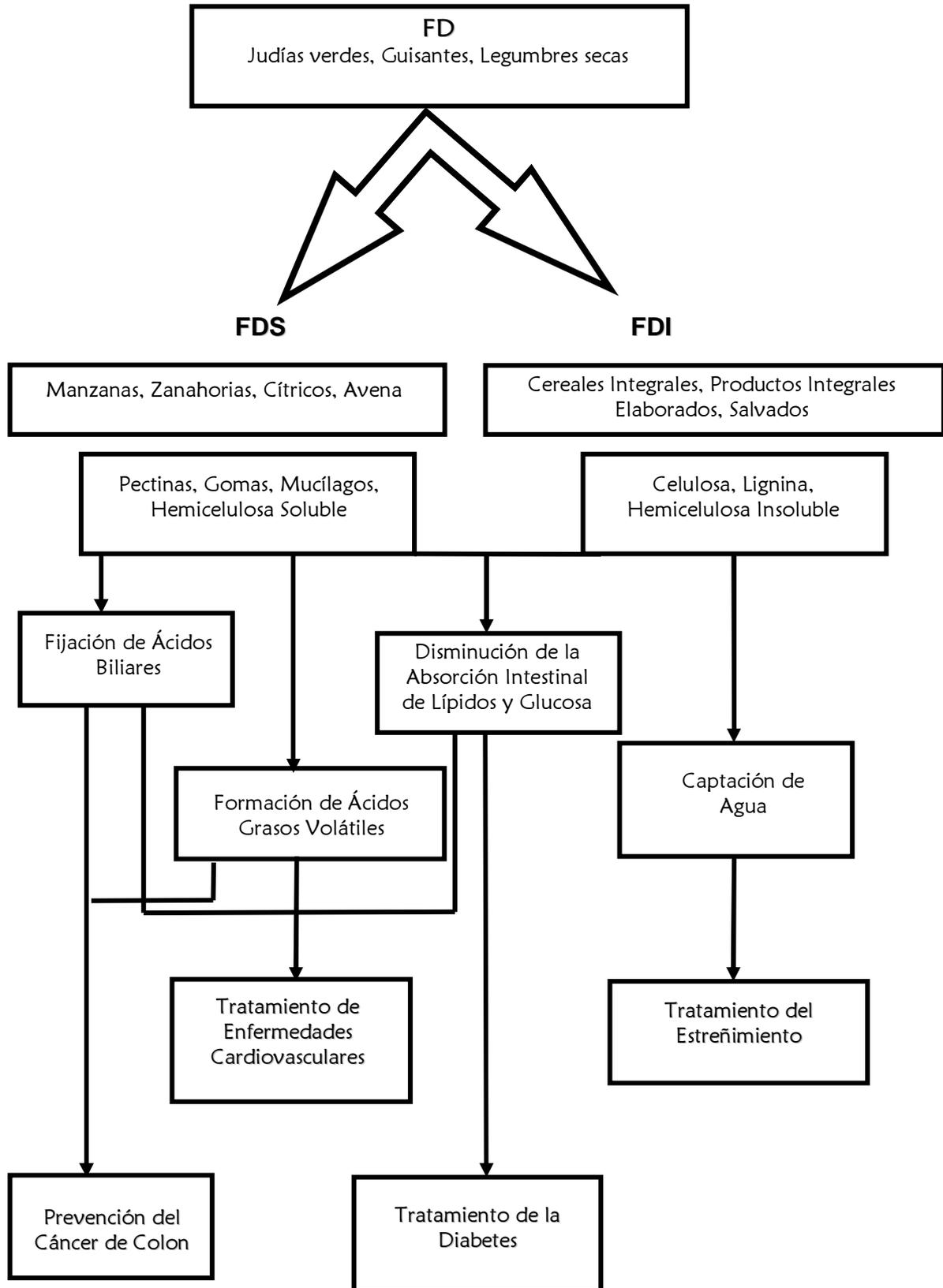
Los beneficios para la salud derivados del consumo de la fibra de las legumbres, principalmente soja y guisantes, están siendo estudiados en la actualidad (Guillon & Champ, 2002), de los que se puede deducir las siguientes tendencias:

- ✘ El consumo de fibra de guisante o soja mejoraría la tolerancia a la glucosa.
- ✘ Algunos estudios indican el efecto positivo en la colesteronemia y/o triglicerinemias postprandiales, pero otros no demuestran ningún efecto.
- ✘ Aumento en el peso del bolo fecal tras el consumo de aproximadamente 20g/d de fibra de soja o guisante.

Parte de los efectos fisiológicos de estas fibras podría explicarse por la fermentación que sufren al llegar al intestino grueso, siendo el acetato el ácido graso producido en mayor cantidad, seguido de propionato y después butirato (Guillon & Champ, 2002).

hierro y cobre después del consumo de dietas que contenía almidón resistente se debía a la fermentación intestinal de esta fracción de almidón. La alteración del pH luminal tiene un efecto estimulador en la utilización mineral, ya que reduce ampliamente los efectos inhibidores del ácido fítico.

Esquema. Composición y Efectos de las Distintas Fracciones de Fibra (tomado de Periago y col., 1993):



Sin embargo a pesar de la gran evidencia de los efectos beneficiosos de la fibra, uno de los inconvenientes nutricionales potenciales de la misma es el efecto adverso en la biodisponibilidad de micronutrientes, especialmente minerales y elementos traza. Estos efectos van a variar en función de la digestibilidad de la fibra y el tiempo de tránsito (Yiang, 1986). Algunos estudios han demostrado el efecto negativo de la fibra, procedente de los cereales, principalmente, en la absorción del calcio (Reinhold y col., 1976; Behall y col., 1987; Turnlund, 1987; Knox y col., 1991; Weaver y col., 1991 y 1996). Sin embargo, en otros estudios no se ha observado ningún efecto (Sandberg y col., 1982; Van Dokkum y col., 1982; Andersson y col., 1983; O'Brien y col., 1993). En estudios con ratas, López y col. (1998, 2000a y 2001) concluyeron que el incremento en la absorción mineral de calcio, magnesio, cinc,

Recientemente la atención se ha centrado en las preparaciones de fibra que son solubles o parcialmente solubles. Por ejemplo, Hara y col., (1996) sugirieron que la ingestión de goma guar hidrolizada y soluble, fibra alimentaria altamente fermentada, incrementaba aparentemente la absorción de Ca en las ratas. Harrington y col., (2001) observaron que tras alimentar a las ratas con una dieta que contenía la fracción de fibra TDF del trigo se reducía la absorción del Ca, esta reducción no se debía a la presencia de la fibra per se, si no más bien al contenido en fitatos de este cereal que acompleja a este mineral, impidiendo su absorción. La introducción de fructooligosacáridos a una dieta rica en ácido fítico contrarresta la capacidad quelante de este último mejorando la absorción de Ca, Mg, Fe, Zn y Cu (López y col., 2000b). Los efectos beneficiosos de estos carbohidratos se debe a las consecuencias derivadas de su fermentación por la microflora del colon, lo cual da lugar a:

- ✘ La formación de ácidos grasos, principalmente SCFA, los cuales forman ligandos solubles con el mineral, previniendo la formación de los complejos insolubles con el fítico. Además se produce una acidificación del medio que favorece la absorción de los minerales.
- ✘ Estimulan la hidrólisis del ácido fítico inducido por la fitasa microbiana derivada de la microflora del colon.

Son múltiples los estudios que ha observado el incremento de la absorción de Ca, Mg, Zn y Fe tras el consumo de inulina en humanos y animales (Levrat y col., 1991; Remesy y col., 1993; Delzenne y col., 1995; Ohta y col., 1995a; Younes y col., 1996; Coudray y col., 1997; López y col., 2000b). Este incremento de la absorción

tiene lugar principalmente en el intestino grueso (Baba y col., 1996; Ohta y col., 1995a) y da lugar a una mejora de la densidad mineral de los huesos.

Estudios realizados *in vivo* demuestran que la celulosa y las pectinas no afecta a la absorción de minerales mientras que la hemicelulosa disminuye ligeramente la absorción de Fe, pero no modifica la de otros minerales (Stephen and Cummings, 1980; Schlemmer, 1989).

A la lignina se le han atribuido en estudios *in vitro*, una alta afinidad por cobre, hierro y cinc, aunque esta afinidad disminuye en presencia de calcio y magnesio como consecuencia de la competitividad de estos cationes (Platt y Clydesdale, 1985).

## 2.2.4. LÍPIDOS

Por lo que se refiere al contenido lipídico, los guisantes tienen un bajo nivel en estos nutrientes (0.8 a 6.1%) (Tabla 9). Sin embargo, la energía bruta de los guisantes es similar a la del trigo y la cebada (Bhatty y Wu, 1974).

**Tabla 9.** Composición de ácidos grasos en el guisante crudo (g/100 g de ácidos grasos totales) (Chen y col., 1975; Savage & Deo, 1989)

	Semilla completa	Embrión y cotiledón
<b>Saturados</b>		
Palmítico (16:0)	8.6 – 26.2	28.0
Estearico (18:0)	2.3 – 10.0	1.0
<b>Insaturados</b>		
Oléico (18:1)	14.2 – 33.3	5.0
Linoléico (18:2)	18.6 – 60.9	60.0
Linolénico (18:3)	3.7 – 13.4	7.0

Podemos observar como en las distintas partes de la semilla el contenido lipídico varía, de tal forma que se encuentran localizados mayoritariamente en el cotiledón y embrión (principalmente se almacenan en los espereosomas). Sin embargo en la cubierta de la semilla (la testa) los niveles de lípidos son muy bajos (Griffiths, 1981). Aunque el embrión del guisante tiene una elevada concentración de lípidos, aproximadamente el 90% de los lípidos se encuentra en los cotiledones del guisante debido a la alta concentración de cotiledones en la semilla (Reichert y Mackenzie, 1982). De esta forma deducimos que el contenido graso de los guisantes es independiente del contenido proteico de los mismos (Reichert y Mackenzie, 1982). El ácido palmítico está significativamente correlacionado con el contenido graso. Sin embargo, no se ha observado correlación entre el peso del grano con el contenido graso.

Colonna y col. (1980) así como Coxon y Davis demostraron que los guisantes arrugados contienen entre 4.5 y 5.2% de lípidos totales mientras que las variedades lisas solo alcanzan a tener entre un 2.8 y 3.1% de lípidos totales, parece ser que el alto contenido en grasa está relacionado con los caracteres de la semilla de variedad arrugada. Coxon y Davies (1982) observaron que la proporción de lípidos neutros a fosfolípidos se incrementaba en las semillas arrugadas cultivadas y que la composición total de ácidos grasos y de lípidos neutros era muy similar entre los dos principales genotipos.

Miyazawa y col. (1975) dedujeron que las semillas de los guisantes contenían diez tipos diferentes de lípidos neutros, entre los cuales se encontraban los triglicéridos, colesterol libre y ésteres del colesterol principalmente. Monoglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres, ceras y ciertos pigmentos constituyen la fracción minoritaria. Reichert y Mackenzie (1982) afirman que aproximadamente entre el 50 y el 60% de los lípidos totales contenidos en los guisantes se encuentran en la fracción de lípidos neutros.

El contenido lipídico de los guisantes, desde un punto de vista cualitativo, tiene importancia nutricional pues son lípidos ricos en ácidos grasos insaturados (alrededor del 60%) de especial interés en fisiología humana. El ácido linoléico es el principal ácido graso de entre los lípidos del guisante. La importancia nutricional de estos ácidos grasos en la arteriosclerosis está documentada ampliamente (Salunkhe y col. 1982; Lamptey y Walker, 1976; FAO/WHO, 1977; Alfin-Slater, 1977).

### 2.2.5. VITAMINAS

Como la mayoría de las legumbres, las semillas de los guisantes son una buena fuente de vitaminas como tiamina, riboflavina y niacina. La concentración de tiamina es aproximadamente equivalente o ligeramente superior a la de los cereales. Las concentraciones de caroteno y ácido ascórbico son sin embargo pequeñas en las legumbres secas. El ácido ascórbico desaparece además tras un periodo de almacenamiento (tabla 10).

**Tabla 10.** Contenido de vitaminas en el guisante crudo ( $\text{mg Kg}^{-1}$  de sustancia seca) (Adsule, R.N., 1989; NRC, 1994; 1998)

Sustancia seca	890 - 900
Biotina	0.15 - 0.18
Niacina	31 - 34
Ácido pantoténico	10.0 - 18.7
Riboflavina	1.8 - 2.3
Tiamina	4.7
Vitamina B <sub>6</sub>	1.0
Vitamina B <sub>12</sub> ( $\text{mg } \mu\text{g}^{-1}$ )	ND
Vitamina E	0.2 – 3.0
Betacaroteno	1.0

A pesar de los factores genéticos y medioambientales, el procesado tiene una influencia considerable en el contenido vitamínico de los guisantes (Lynch, L.J., y col. 1959). El remojo y la cocción pueden provocar considerables pérdidas en vitaminas hidrosolubles debido a su elevada solubilidad y su inestabilidad termal (Edijala, 1980; Abdel-Hamid, 1983; El-Adawy, 2002; Prodanov y col., 2004).

## 2.2.6. MINERALES

Las leguminosas son una buena fuente de minerales tales como calcio, hierro, cobre, cinc y potasio (tabla 11), este último contribuye a un 25-30% del contenido mineral total de la leguminosa. El contenido de minerales en el guisante es de un 2.5% aproximadamente. Las legumbres son buenas fuentes de hierro, (7-10 mg/100g) y son considerablemente más ricas en calcio que la mayoría de los cereales. Así pues, pueden ser beneficioso incluirlo en las dietas de aquellos que toman diuréticos para controlar la hipertensión y que eliminan exceso de potasio por los fluidos corporales.

**Tabla 11.** Contenido de minerales en el guisante (mg Kg<sup>-1</sup> de Sustancia seca) (Adsule, R.N., 1989; NRC, 1994; 1998; Igbasan and Guenter, 1997; Alonso y col., 2000a; Booth y col., 2001; Sandberg, 2002a; Wang y Daun, 2004).

Calcio	680 -1.300
Fósforo	2.980 – 7.710
Hierro	28 – 201
Magnesio	780 – 1.710
Cobre	ND – 10,5
Sodio	77 – 204
Potasio	7.020 – 12.990
Sulfuro	ND - 2.000
Cinc	20 – 63
Manganeso	ND - 208
Selenio ♦	ND - 0.038

ND: No detectado.

♦ Los valores de selenio son muy variables en función de las características del suelo y otras variables.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, por regla general, los minerales procedentes de los vegetales son menos biodisponibles que los minerales procedentes de fuentes de origen animal (Sandberg, 2002a).

La utilización de los minerales depende de múltiples factores incluyendo la digestibilidad del alimento que los contiene, la cantidad y forma química del mineral, los niveles dietéticos de otros nutrientes, la calidad de la proteína y el balance de aminoácidos, las interacciones entre nutrientes, la presencia de quelantes de minerales (promotores o inhibidores), el tamaño de partícula del alimento, y las condiciones de procesado al que se somete el alimento (crudo, cocinado, fermentado, malteado, remojado, etc.) (House, 1999). En concreto, la biodisponibilidad de los minerales de la leguminosa puede verse comprometida por la presencia de determinados factores no nutritivos como el ácido fítico, ácido oxálico, polifenoles y polisacáridos complejos que interaccionan con los minerales polivalentes tales como Cu, Zn, Co, Mn, Fe o Ca, formando complejos insolubles reduciendo su biodisponibilidad (Erdman, 1981; Harland and Oberleas, 1987; Morrow, 1991;). Otros quelantes en cambio, aumentan la biodisponibilidad de los minerales con su presencia en la dieta, tal es el caso del EDTA, cuya adición a la dieta contrarresta los efectos perjudiciales del fitato soluble sobre la biodisponibilidad del cinc, aumentando la absorción del cinc tanto en pollos (O'Dell y col., 1963) como en ratas (Oberleas y col., 1966). También existen otros potenciadores como la carne de origen animal, el ácido ascórbico, citratos, vitamina D, lactosa, fructosa así como algunos azúcares y aminoácidos (House, 1999).

### **2.2.6.1. MAGNESIO**

#### **2.2.6.1.1. Aspectos generales**

Este elemento es el cuarto catión más abundante en el organismo y, tras el potasio, el segundo en el espacio intracelular. El magnesio se encuentra ampliamente distribuido en el organismo. El hueso sirve como depósito de magnesio, allí se encuentra aproximadamente el 50-60% del total (20-28%), de manera que en situaciones de déficit es liberado para el mantenimiento de las concentraciones sanguíneas. Del resto, aproximadamente un 35% se distribuye en el músculo y los tejidos blandos y un 1% en el líquido extracelular (Cashman y Flynn, 1999).

La concentración de magnesio en el plasma esta en torno a 0.85 mmol/L y el nivel se mantiene de forma bastante constante en individuos sanos a través de homeostasis (Lowenstein y Stanton, 1986). Alrededor del 30% del Mg del suero se

encuentra ligado a la proteína y la mayor parte está en forma libre (53%) y ionizada (13) y filtra a través del riñón (De Rouffignac y col., 1991).

El magnesio es un mineral esencial que juega un papel fundamental en los principales procesos biológicos (Coudray y col., 2002). Actualmente en numerosos trabajos de investigación se ilustra la importancia del magnesio en la salud humana y en las enfermedades (Saris y col., 2000; Rayssiguier y col., 2001). Su papel fisiológico está principalmente ligado a acciones enzimáticas. Es esencial para muchos procesos biosintéticos, glucolisis, formación de AMP cíclico, transporte de membranas con consumo de energía y transmisión del código genético (Eichhorn y Marzilli, 1981; Wacker, 1980; Wester, 1987; Rude, 1998). Se sabe que activa más de 300 enzimas, incluyendo algunas de las participantes de la síntesis de ácidos grasos y en la de proteínas, mediante la interacción de cambios de conformación (Cashman y Flynn, 1999). Sus funciones son tantas y tan complejas que White y Hartzell (1989) propusieron que el magnesio debía estar cuidadosamente regulado, ya que sus alteraciones podrían originar efectos sobre la fisiología cardiaca, espasmos musculares, trastornos alimenticios, alteraciones nerviosas, desarrollo de aterosclerosis, infarto, arritmia, cálculos renales, hipertensión arterial, etc. Existen algunos estudios sobre el efecto beneficioso de la administración de magnesio a pacientes con infartos de miocardio agudo y arritmias (Shils, 1999).

Las concentraciones extracelulares de magnesio son fundamentales para mantener los potenciales eléctricos de las membranas nerviosas y musculares y para transmitir los impulsos a través de las uniones neuromusculares (Aikawa, 1981). En estos procesos, que dependen también del calcio, los dos cationes pueden actuar de forma sinérgica o antagónica (Iseri y French, 1984; Livingston y Wacker, 1976).

En resumen, de su importancia biológica podemos indicar que es necesario para la síntesis de compuestos ricos en energía, transportadores de electrones y enzimas y para el control de sus efectos. Es un regulador esencial del ciclo celular y tiene un papel importante en la coordinación del metabolismo. Es un agente estabilizador celular y subcelular necesario para la estabilidad de las membranas plasmáticas, integridad de las mitocondrias, lisosomas, polisomas y cromosomas, así como del DNA y RNAm y de los complejos de RNA. Por todo ello puede ser un importante eslabón entre los sistemas de transporte y el metabolismo y probablemente su concentración se encuentre regulada con precisión. Maguire (1982) indica que el

Mg puede tener un papel complementario como agente regulador “crónico”, al contrario que el Ca que sería “agudo”, ajustando la sensibilidad de la respuesta del sistema.

#### **2.2.6.1.2. absorción, transporte y eliminación**

Coudray y col. (2002) llevaron a cabo una extensa revisión de toda la información sobre la absorción del magnesio; En ella indican que existen mecanismos eficientes tanto en el tracto gastrointestinal como en el riñón que regulan la homeostasis de Mg (Rude, 1998). El riñón es el órgano que más detenidamente regula el metabolismo de Mg. Quamme y de Rouffignac (2000) describieron la existencia de un umbral de filtración de magnesio en el riñón por debajo del cual el Mg es ávidamente conservado, así como, cuando es superado el magnesio es excretado completamente. La mayoría de los autores (Chutkow, 1964; Brink y Beynen, 1992) aceptan que se absorbe más eficazmente en las partes distales del intestino y en menor proporción en intestino grueso.

El Mg es probablemente absorbido a través de un transporte activo y por difusión pasiva a través de la mucosa intestinal:

✘ Difusión pasiva: la fuerza motriz es el gradiente químico de un lado a otro del epitelio intestinal, por tanto la absorción variará en función de la concentración existente de Mg (Fine y col., 1991; Shils, 1999). Normalmente se da a altas concentraciones de mineral.

✘ Transporte activo: mediante técnicas de perfusión intestinal *in vivo* se ha manifestado la existencia de este tipo de transporte saturable. La evidencia deriva de la observación de que la absorción de magnesio no es lineal con la concentración luminal de Mg y se reduce a altas concentraciones. Meneely y col. (1982) observaron que este tipo de transporte ocurre, fundamentalmente, en el intestino delgado y el colon descendente, puede ser estimulado por la vitamina D y es importante en ingestas bajas de magnesio.

Sin embargo, otros datos sugieren que la absorción de Mg ocurre principalmente por difusión pasiva y un mecanismo de arrastre de solvente bajo ingestas habituales de este mineral (Harwich y col., 1990; Karbach y col., 1991; Kayne y Lee, 1993).

El arrastre de disolvente se caracteriza por el movimiento del agua a través del epitelio intestinal tiene la capacidad de trasladar solutos en la misma dirección. Se conoce que existe una correlación positiva entre absorción total de agua y absorción neta de Mg, incluso se sospecha desde hace tiempo que esta vía de absorción es la que sucede en primer lugar, lo que no excluye es resto de mecanismos (Behar, 1975).

Para ingestas normales de Mg, la absorción tiene lugar predominantemente por mecanismos de difusión intercelular y de arrastre de disolvente (Meneely y col., 1982). Aunque aún existe todavía un gran incertidumbre en relación al mecanismo preciso de absorción intestinal de magnesio (Schweigel y Martens, 2000).

Diversos estudios metabólicos ponen de manifiesto que, en condiciones normales, el magnesio se absorbe en una proporción que oscila entre el 45 y 70%.

Entre los factores dietéticos más importantes que afectan la absorción del magnesio cabe destacar:

✘ **Ingesta:** es un factor fisiológico que tiene mucha importancia en la buena absorción del Mg, que decae a medida que aumenta la ingesta del mineral, debido al aumento de la excreción urinaria del mismo. En caso de bajo aporte dietético, se produce un aumento de la absorción, que irá acompañada de una menor eliminación urinaria (Wester, 1987; Brink y Beynen, 1992)

✘ **Proteína:** en dietas de alto contenido proteico se ha comprobado el incremento de la absorción aparente de Mg, seguida del incremento de la excreción urinaria, no sólo debida al exceso de absorción sino también al efecto de los aminoácidos sulfurados (Brink y Beynen, 1992).

✘ **Grasa:** el aumento de la ingesta lipídica favorece la absorción del Mg, aunque inicialmente podría pensarse lo contrario como consecuencia de la formación de jabones. El efecto depende de las concentraciones dietéticas de calcio y magnesio (Kaup y col., 1990).

✘ **Vitamina D:** Hardwick y col. (1991) afirman que las dosis farmacológicas de vitamina D elevan la absorción de Mg en animales, ya sean deficientes o no en esta vitamina, si bien, una cantidad considerable de Mg se absorbe independientemente de la vitamina D. Para otros autores el efecto del 1,25-dihidroxicolecalciferol es todavía contradictorio (Shils, 2002).

✘ **Carbohidratos:** tanto la lactosa y la lactulosa (Heijnen y col., 1993) como la fructosa (Vanderheijden y col., 1994) aumentan significativamente la absorción de Mg en el íleon y en el tracto colon rectal (Ohta y col., 1995a). El aumento podría estar relacionado con una mayor solubilidad del elemento como consecuencia del descenso del pH que producen estos oligosacáridos en el lumen.

✘ **Fibra:** las fuentes de fibra dietética, habitualmente cereales, han sido frecuentemente consideradas como secuestrantes de magnesio. La formación de estos complejos insolubles en el intestino originan un descenso en la absorción del mineral (Brink y Beynen, 1992). Sin embargo, en varias publicaciones (ver capítulo de fibra) se establece que los carbohidratos fermentables estimulan la absorción de Mg. López y col. (1998, 2000a y b, 2001) y, posteriormente, Yonekura y col. (2004) observaron que tras la introducción de fructooligosacáridos (inulina) o de almidón resistente en una dieta que contenía ácido fítico, se producía un incremento en la absorción de Mg así como un mejor estatus esquelético de Mg.

Idourene y col. (1995) observaron como la fibra procedente de las legumbres (incluyendo cacahuets y soja) parece ligar con más fuerza al Mg que los cereales (trigo, maíz y cebada).

✘ **Ácido Oxálico:** este ácido acompleja iones Mg, pudiendo afectar negativamente su absorción. Así por ejemplo, el consumo de espinacas, que son altamente ricas en este ácido, aumenta la excreción fecal de Mg (Noonan y Savage, 1999).

✘ **Ácido Fítico:** Brink y Beynen (1992) comprobaron que el ácido fítico disminuye la absorción de magnesio debido, probablemente, a la formación de un complejo intestinal ácido fítico-magnesio-calcio. Pallauf y col. (1998) y posteriormente Torsten y col. (2004) observaron un importante efecto inhibitor del ácido fítico sobre la absorción y retención de Mg, siendo esta reducción más significativa conforme se incrementan los niveles de fítico que se adiciona a una dieta de caseína-metionina en ratas en crecimiento. Sin embargo, Ekholm y col. (2003) observaron que el magnesio presenta una baja afinidad por el ácido fítico. Elhardallou y Walker (1999) establecieron que ácido fítico no parece causar una reducción significativa en la retención de Mg, ni en la concentración de este mineral en plasma y riñón. Wolters y col. (1993) publicaron que la biodisponibilidad de Ca, Fe y Zn se veía fuertemente

afectada por la presencia de ácido fítico en el alimento, sin embargo, este efecto era mucho menos patente en el caso del Mg.

✘ **Interacción con otros minerales:**

1.- **Calcio:** el procedimiento por el cual interaccionan calcio y magnesio es poco conocido. Se ha demostrado en ratas que una elevada ingesta de Ca puede disminuir la absorción aparente de Mg (Vanhoof y De Schrijver, 1996); este hecho era explicado por la creencia de que existía en el íleon un sistema de transporte común a ambos iones por el que competían, pero esto no llegó a confirmarse (Brink y Beynen, 1992). También se ha sugerido que la deficiencia de Mg moviliza el Ca del hueso (Wester, 1987). Estudios *in vitro* han demostrado que la absorción de Mg decrece por la formación de los complejos insolubles Ca-Mg-ácido fítico, bajo las condiciones de pH del intestino delgado (Cheryan y col., 1983; Champagne, 1988). Consecuentemente con los niveles dietéticos de Ca recomendados por la NRC de 5 g/Kg de dieta, el efecto del ácido fítico en la biodisponibilidad del Mg es menos dramática (Pallauf y col., 1998; Rimbach y Pallauf, 1999).

Por otro lado, el calcio puede afectar indirectamente la absorción de Mg a través de modificaciones en las concentraciones séricas de las hormonas reguladoras de Ca, tanto la 1,25-dihidroxicolecalciferol como la PTH, la cual aumenta la absorción tanto en humanos como en animales (Shils, 1999).

2.- **Fósforo:** Vanhoof y De Schrijver (1996) observaron en ratas que una ingesta excesiva de fósforo reduce la absorción intestinal de magnesio.

3.- **Potasio:** estudios en ratas indican que el potasio dietético no influencia la absorción de magnesio. En humanos, la suplementación con potasio durante 40 días causó un incremento de las pérdidas fecales del elemento (Fisler y Drenick, 1984).

4.- **Sodio:** estudios *in vitro* en ratas sugieren que los iones sodio pueden optimizar el transporte de magnesio, si bien no se ha conseguido demostrar un efecto sistemático sobre la absorción (Brink y Beynen, 1992).

5.- **Aluminio:** a pesar de que éste puede originar complejos insolubles con el magnesio, no se han puesto de manifiesto alteraciones en la retención y absorción del mismo como consecuencia (Greger y Baier, 1983).

Una vez absorbido, el magnesio es transportado a los distintos tejidos, siendo en el óseo donde se encuentra en mayor proporción. El magnesio óseo se encuentra localizado en los cristales de hidroxapatita, al menos en dos formas químicas, siendo el hidróxido la porción soluble. Un 20-30% en la superficie de los cristales fácilmente intercambiable y modificado por los niveles séricos, existiendo un equilibrio debido a influencias fisicoquímicas más que enzimáticas (Rapado y col., 1975). El resto se encuentra íntimamente incorporado y no es intercambiable. El Mg muscular da un índice más real de la cantidad del catión que existe en el organismo ya que es más fácilmente modificable a efectos homeostáticos (Aranda y col., 1989; Planells y col., 1993).

La vía más importante de excreción es la digestiva, con variaciones según el tipo de ingesta; así, si la dieta es muy rica en magnesio las pérdidas en heces pueden llegar a un 75%, mientras que con dietas pobres estas pérdidas se reducen a un 30%. Las pérdidas endógenas son, como en la mayoría de los minerales, muy difíciles de cuantificar, aunque se sabe que hay pérdidas a través de la bilis, jugo intestinal y pancreático.

La tercera parte del magnesio que entra en el organismo a través de la dieta se excreta por la orina, la cantidad excretada por esta vía es mínima cuando la ingesta es deficitaria y se estabiliza cuando los aportes son superiores a los normales. Por todo ello, se considera que el riñón es el órgano fundamental en la homeostasis del catión.

Respecto a la excreción, el riñón es la mayor vía de eliminación de magnesio y el proceso de reabsorción tubular controla la homeostasis del Mg (De Rouffignac y col., 1991; Rude, 98; Shils, 1999). Del 95-97% del Mg filtrado es reabsorbido y sólo de un 3-5% es excretado.

### **2.2.6.1.3. Ingesta Recomendada**

Para este micronutriente es difícil establecer las recomendaciones, debido a la gran cantidad de interacciones dietéticas que origina, además de algunos factores más como pueden ser la edad y el estado fisiológico. En el establecimiento de estas recomendaciones ha de tenerse en cuenta las proporciones dietéticas de calcio, vitamina D, oxalatos, fitatos y proteínas, ya que elevan los requerimientos de Mg (Parfitt, 1980). Los requerimientos en ratas adultas son de 500 mg/día de dieta

(Nutrient Requirements of Laboratory Animals, 1995).

Los requerimientos en humanos de Mg se recogen en la tabla 12.

La mayor parte de los estudios epidemiológicos en los países industrializados ponen de manifiesto que un alto número de personas ingieren unos niveles de magnesio inferiores a los recomendados y existen evidencias que el consumo habitual de bajas ingestas de Mg está asociado a varias enfermedades metabólicas como alteraciones cardiovasculares y disfunciones renales, gastrointestinales, neurológicas, musculares (Galan y col., 1997). Esta situación mantenida durante largos periodos de tiempo podría facilitar o ser la responsable de determinados síntomas que actualmente atribuimos a otras causas o desconocemos. Un ejemplo son las relaciones encontradas entre la fatiga crónica, alteraciones del sueño (Cox y col., 1991), Alzheimer y depresión (Lenke, 1995; Widmer y col., 1995) y bajos niveles intraeritrocitarios de magnesio, síntomas que revierten tras el tratamiento con el catión.

## **2.2.6.2. CINC**

### **2.2.6.2.1. Aspectos generales**

El cinc es un elemento traza ampliamente distribuido por todas las células, fluidos y secreciones, participando en numerosas funciones catalíticas, estructurales y reguladoras. El contenido total de este mineral en el organismo es aproximadamente de 1.5 g en la mujer y 2.5 g en el hombre y la mayor parte está repartida entre el hueso y músculo esquelético. Entre los tejidos con un mayor contenido destacan los fluidos prostáticos (650 mg/g), el hueso (100-250 mg/g), el hígado (199 mg/g), el músculo (170 mg/g) y el riñón (163 mg/g). En la sangre se encuentra aproximadamente un 0.5% del contenido total corporal (Cousins, 1998; King y Keen, 1999).

El cinc es componente de numerosas enzimas que participan en la síntesis y degradación de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, es un potente antioxidante celular gracias a su capacidad para retardar los procesos oxidativos (Powell, 2000), es un componente estabilizador de las biomembranas, a través de las metalotioneinas, desempeña un papel estructural y desarrolla una función bioquímica como regulador de la expresión génica siendo necesario para la estabilidad del DNA,

RNA y ribosomas (Bettger y O'Dell, 1993; Cousins, 1998); participa en la unión de algunos factores de transcripción; estabiliza complejos hormona-receptor y puede tener una participación reguladora en la polimerización de la tubulina; a nivel pancreático está implicado en las funciones endo y exocrinas; en los testículos interviene en la espermatogénesis; en los eritrocitos participa en el mantenimiento del equilibrio ácido-base de los fluidos y estabiliza la membrana; en los leucocitos forma parte de la fosfatasa carboxipeptidasas; interactúa en procesos de desarrollo y diferenciación celular. Es también un componente esencial para el sistema inmune (Shankar y Prasad, 1998), y una ingesta subóptima en los animales de experimentación causa una atrofia marcada del timo, reducción en el número de linfocitos y disminución en las reacciones de hipersensibilidad.

El cinc es un elemento muy importante en el ciclo reproductivo de múltiples especies. En humanos, es necesario para la formación y maduración del espermatozoide, para la ovulación y la fertilización (Favier, 1992). La suplementación de Zn proporciona beneficios en casos de esterilidad masculina y en la reducción de complicaciones durante el embarazo (Favier, 1992).

#### **2.2.6.2.2. Absorción, transporte y eliminación**

La homeostasis del cinc se mantiene mediante la regulación de la absorción digestiva de este mineral y el control de la secreción endógena de cinc dentro del tracto intestinal (Finley y col., 1994; Sandström, 1995). El estatus de Zn en el organismo es importante ya que parece ser que afecta la excreción endógena de Zn en heces, independientemente de la cantidad de mineral ingerido (House, 1999).

Cuando la ingesta de cinc es elevada, la regulación de la absorción de cinc sólo proporciona un “control grueso” del cinc total del cuerpo. El incremento de la excreción fecal de cinc endógeno parece proporcionar el “control fino” necesario para balancear la retención neta de cinc con sus necesidades metabólicas. En caso de ingestas bajas o excesivas, cambios en las pérdidas urinarias y a través de la piel pueden contribuir a mantener la homeostasis.

El Cinc se absorbe en el intestino delgado en una cantidad aproximada del 35%; el lugar de máxima absorción es para unos investigadores el duodeno (Foster y col., 1979) y para otros el yeyuno (Lee y col., 1989), aunque también en ileon se

puede absorber (Antonson y col., 1979). El cinc se absorbe por medio de un transporte activo, de tipo saturable y con necesidad de un transportador. En 1983, Menard y Cousins, estudiaron la captación por vesículas aisladas del borde en cepillo del intestino, encontrando que la captación era saturable al llegar a concentraciones de Zn de 0.2 mM. En condiciones normales el transportador no parece estar saturado (Lee y col., 1989). La absorción de cinc mediada por un transportador se estimula cuando la ingesta es baja. La afinidad del transportador por el cinc no varía en una ingesta reducida del mineral, pero la capacidad de transporte mediada por receptor si lo hace, lo cual sugiere un aumento en el número de receptores. En el transporte de cinc también interviene un componente pasivo, de tipo insaturable y sin necesidad de un transportador intermediario, mediado por difusión (Lönnerdal, 2000). La absorción en este caso no se ve estimulada por el ATP ni por el sodio (Cousins, 1998). En condiciones de alta ingesta de cinc el mecanismo no saturable se vuelve destacado, este mecanismo puede afectar a la difusión pasiva, el movimiento paracelular de cinc o ambos. La utilización digestiva de cinc disminuirá a medida que aumenta la ingesta de este mineral, mientras que al mismo tiempo aumenta la cantidad neta de cinc absorbido.

Recientemente, diversos autores han hecho énfasis en la capacidad del ciego y colon para absorber limitadas concentraciones de cinc en experimentos *in vivo* e *in vitro*, en estos últimos Hara y col. (2000) sugieren que el ciego y colon pueden tener un papel importante en la absorción de cinc cuando se dan condiciones de malabsorción de este mineral. Condomina y col. (2002) indican que el transporte de cinc en el intestino grueso se basa en la difusión pasiva y por tanto tienen especial importancia los factores que tienden a mejorar la solubilidad de este catión, tal es el caso de la fibra soluble que al ser fermentada en el intestino grueso causa un descenso del Ph y un aumento de la solubilidad y por tanto de la absorción de cinc (Goodlad y Mathers, 1992; López y col., 1998; Yonekura y col., 2004).

Tras su absorción por las células intestinales el cinc se transporta en sangre unido a albúmina,  $\alpha_2$ -macroglobulina y aminoácidos. El cinc circulante representa una parte menor del cinc corporal total y la velocidad de turnover plasmático es elevada. Los diferentes tejidos corporales tomarán de la sangre mayores o menores cantidades de catión en función de sus necesidades. El páncreas, hígado, riñón y bazo tienen las mayores velocidades de acumulación y recambio del mineral. La absorción e

intercambio de cinc en los glóbulos rojos y el músculo es más lenta que en las vísceras.

La cantidad de cinc en orina se origina principalmente de la proporción ultrafiltrable de cinc en plasma. En condiciones normales hasta el 95% del cinc filtrado es reabsorbido en la porción distal del túbulo renal (King y Keen, 1994). La cantidad de cinc que se excreta en orina se correlaciona pronunciadamente con la tasa de producción de orina y excreción de creatinina. El catabolismo del músculo e inanición, causan un aumento clínico en la pérdida urinaria de cinc. Una marcada disminución o aumento en la ingesta de cinc causará el consiguiente cambio en las pérdidas de superficie (Milne y col., 1984).

No existe un almacén específico de cinc en el cuerpo, pudiendo algunas fuentes de cinc endógeno retenerse preferentemente en ciertos tejidos como respuesta a una disminución en la ingesta dietética del mineral. La absorción por parte del hueso y su concentración en este tejido disminuye al disminuir el cinc ingerido, pero la velocidad de recambio y la liberación de cinc no se aumenta significativamente. Sin embargo, puede producirse un catabolismo del músculo que libere el cinc al plasma (Masters y col., 1983). El cinc presente en el hueso que habitualmente tiene una velocidad de recambio baja puede mobilizarse en casos extremos como una deficiencia de cinc durante el embarazo (Hurley y Tao, 1972).

Bajo condiciones fisiológicas y dietéticas normales, los factores que afecten a la cantidad de cinc disponible para su absorción por parte del tracto digestivo determinan la biodisponibilidad de este mineral. La solubilidad del cinc en los lugares preferentes de absorción intestinal tiene un impacto más que probable sobre su disponibilidad. El cinc de los alimentos se extrae con relativa facilidad en el pH ácido presente en el estómago, uniéndose posteriormente a diversos componentes orgánicos en el pH más básico presente en el intestino delgado. Esto se refleja en una menor utilización digestiva de cinc presente en un alimento cuando se compara con la misma dosis en una solución acuosa (Sandström, 1997).

Como sucede con los minerales anteriormente citados, existen factores que influyen en la absorción del Zn, entre ellos:

✘ **Tipo y cantidad de proteína de la dieta:** la cantidad de proteína en la

dieta se correlaciona positivamente con la absorción de cinc. La utilización digestiva de cinc aumenta ligeramente con los niveles de proteína en la dieta (Lönnerdal, 2000) y algunos autores encuentran absorciones muy reducidas de este mineral o incluso nulas con niveles proteicos del 4 o 5 % (Urbano y col., comunicación personal; Van Campen y House, 1974). Debe tenerse en cuenta además que la proteína es una fuente importante de este mineral y aumentos en la ingesta proteica se corresponden normalmente con aumentos en la ingesta de cinc.

El tipo de proteína presente en la dieta es así mismo de importancia fundamental para la absorción de cinc. Así, la proteína de origen animal ejerce un efecto beneficioso sobre la utilización digestiva de cinc facilitando su absorción y contrarrestando el efecto inhibitor de varios factores no nutritivos presentes en la dieta (Sandström y col., 1980). Esto puede deberse a la liberación de aminoácidos durante el proceso de digestión que mantendrían el cinc en un estado más soluble facilitando así su absorción. Los aminoácidos, cisteína, metionina e histidina, pueden mejorar la absorción de cinc mediante la formación de complejos estables con este elemento (Schölmerich y col., 1987; House y col., 1997; King y Keen, 1999).

✘ **Ácido fítico:** De entre los elementos esenciales, el cinc es el mineral más vulnerable al poder quelante del fítico debido a la fuerza con la que se acompleja (Oberleas, 1996; Oberleas and Chan, 1997; Pallauf y col., 1998). Numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* (utilizando técnicas isotópicas y de balance) han señalado al ácido fítico (IP6) y a sus productos de hidrólisis, particularmente IP5, y quizás IP4 e IP3, que también podrían participar, como potentes inhibidores de la absorción de cinc (O'Dell y Savage, 1960; Lönnerdal y col., 1989; Sandström y Sandberg, 1992; Han y col., 1994; Oberleas, 1996; Manary y col., 2002; Lestienne y col., 2005b). Estos compuestos pueden formar complejos insolubles con el cinc en las condiciones de pH básico presentes en el intestino delgado. Debido a la ausencia o reducida actividad fitasa presente en el tracto digestivo de los animales monogástricos que pueda destruir los complejos, estos acabarán siendo excretados en la heces. Aunque la absorción de cinc en adultos queda totalmente inhibida por la presencia de ácido fítico en la dieta en los niños y bebés esta situación no es tan clara ya que se ha observado una elevada absorción de este mineral en mezclas de cereales y legumbres que contenían elevados niveles de fitatos (Hurrell, 2003a y b).

Los fitatos pueden interferir con la absorción de cinc exógeno presente en la

dieta o con la reabsorción del cinc endógeno excretado al lumen intestinal junto a las secreciones digestivas. Cualquier procesado de tipo doméstico o industrial que tienda a disminuir la presencia de fitatos en el alimento dará lugar a un aumento en la utilización digestiva de cinc (Lei y col., 1993; Kaur y Kawatra, 2002). Aunque repetidamente se ha demostrado que el ácido fítico de la dieta afecta negativamente a la biodisponibilidad del Zn, debemos tener en cuenta que la mayoría del Zn de la dieta se encuentra todavía disponible al animal, en otras palabras, la cantidad de fítico que normalmente se encuentra dentro del alimento no previene completamente la absorción y utilización del Zn dietético (House, 1999).

El contenido de fitatos en los alimentos de origen vegetal explica en parte la menor disponibilidad de cinc procedente de estos alimentos. Se ha desarrollado un índice de predicción del efecto inhibitor de los fitatos sobre la utilización digestiva de cinc consistente en la relación molar [fitato]/[Zn] (Morris y Ellis, 1980; Lo y col., 1981; Morris y Ellis, 1989). Cuanto mayor es este índice peor será la utilización digestiva del cinc del alimento. El valor predictivo de esta relación molar debe sin embargo ser tratado con cautela ya que depende de las condiciones del alimento o la dieta así como del estado fisiológico del individuo, pudiendo a veces no ser válido (Morris y Ellis, 1980; Porres y col., 2003a).

✘ **Fibra:** se ha sugerido que la fibra alimentaria puede tener un efecto inhibitor sobre la absorción de cinc (Munoz, 1986), sin embargo este efecto no acaba de estar claro, ya que las fuentes de fibra son normalmente ricas en ácido fítico y parece ser éste compuesto el principal responsable de la inhibición en la absorción de cinc (Larsson y col., 1996; López y col., 1998a y 2000a). Estudios en componentes aislados de la fibra como la  $\alpha$ -celulosa (Turnlund y col., 1982) no muestran efecto inhibitor alguno y estudios que utilizan preparaciones de fibra defitinizadas parecen confirmar la falta de efecto de este componente sobre la absorción de cinc (Sandström, 1997). López y col. (1998b) demostraron que la ingestión de almidón resistente incrementaba la absorción de cinc a nivel del colon. Posteriormente, Sandström y col. (2000) observaron que la ingesta de elevadas cantidades de salvado, añadido a una dieta basada en proteínas animales, no afectaba la absorción de cinc.

En su relación sobre los efectos de la fibra dietética en la biodisponibilidad mineral Periago y col. (1993) señalaron que la fibra dietética soluble parece tener más capacidad para captar cationes divalentes que la fibra dietética insoluble, aunque su

fermentación en el ciego y colon permitiría la liberación y posterior absorción parcial de los cationes libres. Hara y col. (2000) observaron que la ingesta de fibra fermentable y soluble en agua no mejoraba la absorción de cinc, pero sí contribuía a la mejora del estatus de este mineral en el intestino grueso.

Sin embargo, existen múltiples estudios donde se confirma el efecto inhibitor de los distintos componentes de la fibra en la absorción de cinc; Platt y Clydesdale (1985), basándose en estudios *in vitro*, atribuyeron a la lignina una alta afinidad por cobre, hierro y cinc, aunque esta afinidad disminuye en presencia de calcio y magnesio como consecuencia de la competencia de estos cationes por los lugares de unión en la lignina (). Así mismo se ha demostrado el efecto inhibitor de hemicelulosa, celulosa y fibra del trigo sobre la absorción de cinc (Bagheri y col., 1982; Persson y col., 1987). Mod y col. (1981) establecieron que la fermentación de sustancias no digeribles permitiría la solubilización del cinc al bajar el pH y/o podría conseguir la liberación del cinc quelado de la fracción de hemicelulosa a través de su degradación en el intestino grueso.

La adición de fructo-oligosacáridos en la dieta que contiene ácido fítico restaura la absorción de Zn, así como la retención de este mineral en los tejidos como ya explicamos en el capítulo de la fibra (López y col., 2000b).

**✘ Interacción con otros nutrientes:** los mecanismos de transporte de cationes al interior de la célula están determinados en parte por su configuración y propiedades de coordinación. Por tanto, elementos con características fisicoquímicas similares compiten por vías comunes. La afinidad por una proteína transportadora mutua también puede provocar competencia con distintos metales:

- 🌐 **Calcio:** no parece que el calcio de por sí pueda interferir con la absorción de cinc (Lönnerdal, 2000). Niveles elevados de Ca pueden intensificar el efecto inhibitor del ácido fítico en la absorción del Zn en los humanos debido a la formación del complejo Ca-fitato-Zn en el intestino delgado, los cuales son incluso menos solubles que los complejos formados por cualquiera de los dos cationes y el ácido fítico (López y col., 2000b). Por lo que la relación molar  $[Ca] \times [fitato] / [Zn]$  se ha propuesto como un índice para predecir el efecto depresor de las variables calcio y fitato sobre la utilización digestiva de cinc (Fordyce y col., 1987; Morris y Ellis, 1989; Hira y Kaur, 1993; Martínez y co.,

1998). Incluso si el contenido de Ca en la dieta es bajo pero la relación ácido fítico-Zn es elevada (14:1) el consumo de fítico da lugar a una reducción significativa en la absorción aparente de Zn, dando lugar a un menor contenido de Zn tanto en los huesos como en el hígado (López y col., 2000b). Deben guardarse sin embargo las consideraciones necesarias para este índice al igual que se describió anteriormente para la relación molar [fitato]/[Zn] debido a la importancia de las condiciones del alimento o la dieta, así como del estado fisiológico del individuo que pueden alterar su valor predictivo.

- ④ **Hierro:** el cinc y el hierro interaccionan competitivamente durante la absorción intestinal. La determinación de absorción de cinc sugiere que es menor la interacción entre Fe y Zn en humanos que en ratas (Walsh y col., 1994). Cuando ambos nutrientes son ingeridos simultáneamente en soluciones acuosas a niveles empleados en los suplementos existe evidencia de que un exceso de hierro inhibe la absorción de cinc (Whittaker, 1998; Troost y col., 2003). Esto puede ser de especial importancia en mujeres embarazadas en las cuales se ha sugerido la necesidad de tomar suplementos adicionales de cinc para contrarrestar el posible efecto inhibitorio de los suplementos de hierro. Sin embargo los efectos inhibitorios del hierro no se observan cuando este mineral se adiciona a la dieta. La adición de histidina disminuye el efecto inhibitorio del hierro sobre la absorción de cinc cuando ambos se administran en soluciones acuosas (Sandström y col., 1985). Por el contrario, Donangelo y col. (2002) observaron que el empleo de suplementos de hierro en mujeres con niveles marginales de hierro mejoraban los índices de este mineral sin detectarse ningún efecto en los niveles de cinc.
- ④ **Cobre:** parece que el cinc tiene escaso efecto sobre la absorción del cobre, aunque puede existir una competencia por seguir una ruta similar. Se ha observado que la ingestión de elevadas cantidades de cinc puede afectar negativamente a la absorción de cobre por un mecanismo basado en el aumento de la síntesis de metaloproteína en las células intestinales que al atrapar el cobre e impedir su paso a través de la membrana serosa disminuye su absorción. Dosis farmacológicas de cinc se emplean para tratar la enfermedad de Wilson, un error congénito del metabolismo de cobre que produce una acumulación excesiva de este mineral en los tejidos. Por contra,

no parece que una ingesta media o alta de cobre afecte en modo alguno a la absorción de cinc (August y col., 1989).

- **Otros minerales:** ingestas elevadas de cadmio o estaño pueden interferir con la absorción intestinal de cinc (King y Keen, 2002), pero dado que en condiciones normales la ingesta de estos metales es reducida no parece que su efecto pueda ser de importancia.
- **Ácido Fólico:** debe aún aclararse la interacción entre el cinc y el ácido fólico pero parece que bajo condiciones de un estado de cinc comprometido el ácido fólico puede interferir con el aprovechamiento de este mineral, mientras que a bajos niveles de cinc, la actividad de la enzima hidroxilasas de teroilpoliglutamato, que resulta fundamental para convertir los folatos de la dieta en su forma monoglutamato, se encuentra disminuida (King y Keen, 2002).
- **Quelatos y Ligandos de Bajo Peso Molecular:** Entre los compuestos con mayor capacidad para formar este tipo de complejos con el cinc los más frecuentemente estudiados son el EDTA, los aminoácidos histidina y metionina y ácidos orgánicos como el ácido cítrico (Pabon y Lönnnerdal, 1992; Lönnnerdal, 2000; Ekholm y col., 2000 y 2003).
- **Otros Factores:** la edad del individuo tiene influencia sobre su capacidad de absorber cinc. Los animales recién nacidos absorben cinc en una proporción mayor que los animales de más edad, quizás porque su sistema de transporte tiene más afinidad por este catión (Lönnnerdal, 1989). El pH intestinal no parece influir en la absorción de cinc, sin embargo, una acidez reducida por baja secreción de HCl en el estómago, sí puede dar lugar a un descenso en la absorción del mineral (Sturmiolo y col., 1991; Hara y col., 2000). Las prostaglandinas intraluminales parecen tener importancia en la absorción de cinc. La PGE<sub>2</sub> aumenta la absorción de cinc mientras que la PGF<sub>2</sub> la inhibe (Hoadley y col., 1988). La molécula de glucosa puede tener un efecto estimulador sobre la absorción de cinc. Lee y col. (1989) han observado que la adición de 20µmol de glucosa a una solución de perfusión que contenía acetato de cinc aumenta la absorción del mineral en humanos.

En resumen, la biodisponibilidad de cinc para su absorción intestinal y utilización por el organismo representa el efecto neto de los factores inhibidores y potenciadores presentes en la dieta. En la práctica, el nivel de fitatos, el tipo y cantidad de proteína y el contenido total de cinc tienen un impacto mayoritario sobre la cantidad de cinc que se absorbe de los alimentos. La disponibilidad de cinc proveniente de suplementos y soluciones acuosas está afectada por los mismos factores cuando estos se ingieren junto con una comida, mientras que la absorción es mayor cuando se toman en ayunas. Las interacciones con otros minerales son más probables en ausencia de sustancias orgánicas procedentes del alimento.

Respecto a la excreción, en circunstancias dietéticas normales, las heces son la vía principal de excreción de cinc (Hambridge y col., 1986), mientras que la urinaria es una vía secundaria de eliminación. Otras vías de excreción son pelo, sudor, descamación de la piel, menstruación, semen, fluido prostático y, en situaciones de embarazo y lactancia, cantidades importantes se transfieren diariamente de la madre al feto o al lactante (Linder, 1998).

#### **2.2.6.2.3. Ingesta Recomendada y Toxicidad**

Es indudable que los factores fisiológicos influyen, en cierta medida, sobre las necesidades de Zn. El aporte nutricional recomendado se determina teniendo en cuenta la edad, sexo, embarazo y lactancia. Los valores se detallan en la Tabla 12.

Los requerimientos de cinc en las ratas adultas son de 12 mg/Kg, siempre que la fuente proteica principal de la dieta sea caseína o proteína de clara de huevo (Nutrient Requirements of Laboratory Animals, 1995).

Las distintas fuentes alimentarias varían considerablemente en cinc, oscilando entre los 0.02 mg/100g de la clara de huevo a 1 mg/100g de la carne de pollo hasta 52 mg/100g en las ostras (Mataix y col., 1998). El marisco y las carnes rojas son buenas fuentes de cinc que además se encuentra en forma altamente disponible. Cereales y leguminosas son también buenas fuentes de este mineral aunque su disponibilidad en estos alimentos es reducida. En los cereales casi todo el cinc se encuentra en las porciones de salvado y germen mientras que en las legumbres se encuentra principalmente en los cotiledones (Beal y Mehta, 1985). La concentración de cinc en los alimentos vegetales puede aumentarse si estos se tratan con fertilizantes ricos en

cinc o se cultivan en suelos con alto contenido en este mineral.

No debemos olvidar que la deficiencia de cinc afecta a 10 millones de niños en los países en desarrollo (Sandstead, 1995), sobretodo en aquellas zonas donde la población subsiste a base de proteína procedente de cereales (El Hendy y col., 2001). El bajo consumo de alimentos ricos en Fe y Zn biodisponibles, tales como carne, sobretodo carne roja, y el elevado consumo de alimentos ricos en inhibidores de la absorción de Fe y Zn, como fitatos, algunas fibras dietéticas y Ca, dan lugar a deficiencias en ambos minerales. Las alteraciones potenciales que pueden producirse como consecuencia de la deficiencia son principalmente daños neurofisiológicos, hepáticos, renales y desórdenes gastrointestinales (Sandstead, 2000; Cho, 1991; Vallee y Falchuk, 1993; Okada y col., 1995), así como un significativo retraso en el ritmo de crecimiento del individuo (Prasad, 1993; El Hendy y col., 2001). En el caso de las ratas, Mengheri y col. (1995) observaron que la deficiencia de Zn provocaba un dramático descenso en su peso corporal.

Referente a su toxicidad, la intoxicación aguda por Zn provoca malestar gástrico, mareos y nauseas, incluso se han descrito casos de muerte con dosis muy elevadas. La toxicidad crónica, producto de la exposición prolongada a una fuente del mineral, origina igualmente problemas gástricos, descenso de la función inmunitaria y del colesterol asociado a la HDL. En gallinas, la administración de una ingesta elevada produce una pausa en la producción de huevos y pérdida de plumaje, secundarias a la disminución del consumo alimentario. Últimamente se ha sugerido que las concentraciones elevadas de Zn originan una acumulación del mismo en el extremo de los axones neuronales, lo que parece ser un factor contribuyente a la enfermedad de Alzheimer (Cousins, 1998).

### **2.2.6.3. HIERRO**

#### **2.2.6.3.1. Aspectos generales**

El hierro es un mineral de vital importancia en el ser humano. Participa en el metabolismo oxidativo, crecimiento y proliferación celular, así como en el transporte (hemoglobina) y almacenamiento de oxígeno (mioglobina) (Fairbanks, 2000). La facilidad con la que el hierro se oxida y reduce permite su máximo aprovechamiento por el organismo.

El hierro es un elemento que está presente en todas las células del organismo, se encuentra en forma de proteínas hemo, es decir, proteínas con un grupo prostético porfirina-hierro. La particularidad del grupo hemo es su facilidad para captar y liberar oxígeno, así como electrones, de ahí que estas proteínas contribuyan al transporte de oxígeno o de electrones. El contenido de hierro varía según el peso, la concentración de hemoglobina, el sexo y el tamaño del compartimento de almacenamiento (Morris y col., 1987). El hierro orgánico total equivale a alrededor de 3,8 mg en los varones y 2,3 mg en las mujeres (Layrisse y Martínez-Torres, 1992), siendo el elemento traza más abundante en el organismo. El hombre adulto, durante su vida, mantiene prácticamente constante su contenido férrico (Conrad y col., 1967), mientras que en las mujeres estos depósitos representan sólo la octava parte del total (Yip y Dallman, 1998).

Los compuestos en los cuales el hierro forma parte los podemos dividir en tres grupos:

<b><i>Compuestos funcionales</i></b>	
	Hemoglobina Mioglobina Hemo enzimático Hemo no enzimático
<b><i>Compuestos de transporte</i></b>	
	Transferrina
<b><i>Compuestos de almacenamiento</i></b>	
	Ferritina Hemosiderina

La molécula mejor conocida de las que poseen Fe es la hemoglobina, presente en los eritrocitos y cuya principal función es permitir el transporte de oxígeno de los pulmones a los tejidos. Es la forma predominante, suponiendo en el hombre sano unos 2 gramos de Fe, que representan un 70% del total (Hillman, 1996; Yip y Dallman, 1998).

La mioglobina, el compuesto hemo del músculo, se encarga de almacenar y liberar el oxígeno. Es la responsable de la alta biodisponibilidad de hierro en la proteína de origen animal.

Los citocromos representan el hierro hemo enzimático, están implicados en el transporte de electrones y en reacciones de fosforilación oxidativa. Intervienen en la producción oxidativa de energía celular en forma de ATP. Aunque en conjunto sólo representan el 3% del Fe orgánico total.

Entre las distintas enzimas que contienen hierro no hemo se incluyen las proteínas ferrosulfurosas y las metaloflavoproteínas. Se encargan de reducir compuestos tales como NADH-DH succínico-DH y xantina oxidasa.

El compuesto transportado del hierro es la transferrina, proteína plasmática que porta el metal desde el intestino o los productos de degradación de la hemoglobina a los tejidos.

El hierro almacenado se encuentra en dos formas principales: ferritina y hemosiderina. Ambas se localizan sobre todo en el hígado, sistema retículoendotelial, fundamentalmente en el bazo (Yip y Dallman, 1998), y en la médula ósea (Beutler, 1988). El Fe unido a la ferritina es más fácil de movilizar que el que se encuentra unido a la hemosiderina (Yip y Dallman, 1998).

Normalmente, el metabolismo del hierro en humanos se caracteriza por su capacidad para mantener constantes las adecuadas concentraciones de este mineral, para lo que usan mecanismos adaptativos estrechamente regulados. Tan importante es la deficiencia de este mineral como la acumulación nociva por una excesiva suplementación que puede originar importantes patologías (Cook, 1990).

#### **2.2.6.3.2. Absorción, transporte y eliminación**

El hierro es un mineral ampliamente distribuido en la alimentación humana (Bothwell y col., 1979). Los tejidos animales contienen hierro en forma hemo, ferritina y hemosiderina así como hierro ligado a membranas y compuestos de bajo peso molecular. En otros alimentos de origen animal, el hierro también se encuentra unido a proteínas específicas tales como lactoferrina en la leche y ovotransferrina en el huevo blanco. Los alimentos de origen vegetal contienen hierro en forma de metaloproteínas, ferritinas vegetales y hierro acomplejado a componentes estructurales o de almacenamiento, principalmente fitatos (Hazell, 1985). La ferritina es la forma en la que se encuentra la mayor parte del hierro de la soja (Ambe y col., 1987; Burton y col.,

1998), en esta el hierro es un sólido mineral férrico que contiene miles de átomos de hierro y oxígeno, dentro de la proteína (Theil, 2001; Theil, 2004) (peso de Ferritina = 20,3 KDa; Crichton y col., 1978).

La absorción de este mineral depende del contenido en la dieta, del estado de los almacenes y de la tasa de formación de los eritrocitos, y su porcentaje de absorción puede oscilar entre el 5-20%.

En la dieta el hierro se encuentra generalmente en dos formas: a) los tejidos animales contienen un 40% de hierro hemo como hemoglobina y mioglobina y un 60% de hierro no hemo principalmente como ferritina y hemosiderina y, b) los productos vegetales contienen sólo hierro no hemo (Oberleas y col., 1999).

El hierro hemo y el no hemo poseen distintos mecanismos de absorción. En el hombre y algunos animales, el hierro hemo es el que se absorbe preferentemente. Para poder absorber el hierro no hemo este debe encontrarse en estado iónico. La absorción del Fe no hemo depende de su solubilidad en la parte alta del intestino, que, a su vez, está modulada por la presencia de potenciadores o inhibidores de la misma. La absorción del hierro hemo es mucho más fácil y se ve poco afectada por el resto de los componentes de la dieta (Yip y Dallman, 1998).

En general se acepta que sólo el hierro soluble puede ser absorbido. Hierro soluble puede encontrarse en forma de ión férrico o ferroso. El hierro férrico es hidrolizado rápidamente a  $\text{pH} > 1$ , por el contrario, el hierro ferroso no se hidroliza en un  $\text{pH}$  inferior a 7. No debemos olvidar que el estado normal del hierro es como ión férrico, ya que el hierro ferroso es rápidamente oxidado a hierro férrico. La hidrólisis de hierro, como la formación de hidróxidos de hierro, normalmente dan lugar a hierro insoluble. Esto no tiene porqué ocurrir siempre, ya que la presencia de ciertos ligandos que se unan al ión ferroso pueden dar lugar a la formación de complejos solubles (Wienk y col., 1999).

En conclusión, en la absorción de hierro influyen dos factores importantes: el hierro debe mantenerse en forma de ión ferroso o deben estar presentes una cantidad suficiente de ligandos capaces de mantener el hierro en la forma soluble (Wienk y col., 1999).

El hierro inorgánico o hierro no hemo es solubilizado e ionizado fundamentalmente por el jugo gástrico, reducido al estado ferroso y quelado por sustancias de peso molecular bajo como ácido ascórbico, azúcares y aminoácidos que estimulan la absorción (Beutler, 1988). También la bilis, como vehículo de transporte de la transferrina, estimula la absorción. Sin embargo, el pH alcalino del jugo pancreático insolubiliza parte de los compuestos del hierro, aunque el efecto de las enzimas proteolíticas puede promover su absorción (Layrisse y Martínez-Torres, 1992).

En cuanto al sitio de absorción, la mayoría de los autores apuntan que se absorbe fundamentalmente en el intestino delgado proximal, siendo el duodeno el punto de máxima absorción con un 20%, seguido por la porción proximal del yeyuno, mientras que a nivel del ileon la absorción es mínima (2%) (Beutler, 1988; Schüman y col., 1990; Layrisse y Martínez-Torres, 1992; Conrad y Umbreit, 1993; House, 1999. Oberleas y col., 1999). Sin embargo, en 1994, Ebihara y col. demostraron que la porción inferior del tracto digestivo, el intestino grueso, juega también un importante papel en la absorción del hierro.

La mayor parte del hierro absorbido pasa al torrente sanguíneo atravesando rápidamente las células de la mucosa en forma de pequeñas moléculas, y el que excede de las necesidades es almacenado intracelularmente en forma de ferritina y hemosiderina. En el plasma se transporta unido a la transferrina, quien lo capta desde el tracto gastrointestinal o desde los puntos de almacenamiento y lo traslada hasta la médula ósea (síntesis de hemoglobina), células del sistema retículoendotelial (almacenamiento), placenta (cubre las necesidades del feto) y a todas las células (para las enzimas en las que participa). Por tanto, interacciona con receptores específicos en la membrana celular (Kühn, 1989).

La ferritina, almacén fundamental de hierro, es vital para el organismo. La hemosiderina se diferencia de ella porque tiene mayor capacidad de contener hierro (en torno a un 30% más que la ferritina) y por ser insoluble en agua. Se cree que es una forma degradada de la ferritina (Grady y col., 1989). En hígado y bazo de animales sanos predomina la ferritina como depósito de hierro, mientras que cuando existe un exceso patológico del metal predomina la hemosiderina. El almacén de hierro del hígado no interviene en ninguna función metabólica (Wienk y col., 1999).

Casi todos los alimentos reducen significativamente el porcentaje de hierro absorbido. Sin embargo, distintos factores alimentarios pueden actuar como potenciadores o inhibidores de la absorción de hierro no hemo localizado en el estómago y en la parte superior del intestino delgado. El balance entre estos factores determinan la biodisponibilidad del hierro no hemo en un alimento (Sean, 1997).

#### **Potenciadores de la absorción de hierro no hemo:**

✘ **Ácido ascórbico:** es un potente favorecedor de la absorción de hierro en su forma no hemo mediante la reducción del hierro férrico a ferroso y como quelante en el estómago y en el intestino delgado. Ambos mecanismos ayudan a mantenerlo en solución para prevenir su polimerización y que se una a otros ligandos inhibidores, tales como fitatos y oxalatos, principalmente (Siegenberg y col., 1991; Yip y Dallman, 1998). Cuando el ácido ascórbico es añadido a una proteína vegetal, el porcentaje de absorción de hierro aumenta. Lynch y Cook (1980) establecieron que en una dieta basada en proteína vegetal la absorción de hierro se incrementaba hasta seis veces gracias a grandes cantidades de ácido ascórbico. La influencia de este ácido es más pronunciada en alimentos con baja biodisponibilidad de hierro y es efectiva en dietas que contienen altos niveles de los dos principales inhibidores de la absorción del hierro no hemo, fitatos y polifenoles (Cook y col., 1977 y Siegenberg y col., 1991; Davidsson y col., 2000). Aunque no debemos olvidar que el ácido ascórbico es efectivo en la promoción de la absorción de hierro sólo si es ingerido conjuntamente con el hierro (Cook y col., 1997).

Davidsson (2003) concluyó que la habilidad del ácido ascórbico en sobreponer el efecto inhibitor del ácido fítico depende de ambos, el nivel del ácido fítico en el alimento y la cantidad de ácido ascórbico presente. Estudios recientes sobre la biodisponibilidad del hierro en fórmulas a base de soja han concluido que se consigue un significativo incremento de la absorción de este mineral, en niños y adultos, después de la degradación del ácido fítico o tras la duplicación de la concentración del ácido ascórbico en la fórmula conteniendo esta ácido fítico nativo (Davidsson y col., 1994; Hurrell y col., 1998). Posteriormente estos resultados fueron confirmados en un estudio realizado por Davidsson y col. (2001) utilizando una fórmula a base de proteína de guisante en mujeres.

✘ **Proteínas animales:** distintos tejidos animales, incluidos ternera, pollo,

pescado, cordero, hígado, y cerdo, favorecen el estatus de hierro ya que proporcionan hierro muy utilizable y mejoran la absorción del hierro no hemo (Cook y Monsen, 1976 y Lynch y col., 1989). A diferencia del ácido ascórbico, dan lugar a un pequeño incremento de absorción de hierro cuando se elevan las cantidades de tejido proteico (Lynch, 1997). El músculo de ternera incrementa diez veces la absorción de Fe no hemo procedente de una comida de maíz (Layrisse y col., 1973). Un gran número de estudios han demostrado que aminoácidos libres y, particularmente, divalentes como asparragina, glicina y serina, aumentan la absorción de Fe en ratas (Christensen y col., 1984). Las últimas tendencias a este respecto apuntan que los péptidos resultantes de la digestión proteica potencian la absorción intestinal del hierro mediante la formación de quelatos con este metal (Kapsokefalou y Miller, 1995; Pérez-Llamas y col., 2001) favoreciendo posteriormente su absorción a nivel intestinal. En concreto, estudios *in vitro* muestran que péptidos con residuos de cisteína potencian la absorción de Fe no hemo. Las proteínas miofibrilares, actina y miosina, contienen un número elevado de estos residuos; es posible que el suplemento proteico signifique la unión al hierro en el tracto gastrointestinal, de manera que se mantiene en solución (Hurrell y col., 1988). Torrance y col. (1982) observaron que los tejidos vegetales podrían actuar principalmente reduciendo el efecto inhibitor de los polifenoles. Kapokefalou y Millar (1991) encontraron un incremento en hierro ferroso durante la digestión *in vitro* de ternera, sugiriendo que la carne tiene un efecto reductor. Finalmente, Zhang y col. (1990) propusieron que la carne actúa estimulando la producción de ácido gástrico.

✘ **Alcohol:** aumenta la cantidad de hierro hepático. Si bien un consumo excesivo de alcohol altera el metabolismo del hierro probablemente debido a una menor renovación de los eritrocitos (Bothwell y col., 1989; Monsen, 1988; Sánchez y col., 1988; Mazzanti y col., 1987). Parece que una deficiencia de las secreciones exocrinas pancreáticas estimula la absorción de hierro (Monsen, 1988).

✘ **Ácidos orgánicos:** aunque se han estudiado menos que el ácido ascórbico, existen otros ácidos orgánicos, incluyendo ácido cítrico, málico, tartárico y láctico que favorecen la absorción del hierro. Gillooly y col. (1983) midieron la absorción de hierro de 17 alimentos vegetales. Todos los vegetales asociados con una buena biodisponibilidad del hierro contenían cantidades apreciables de uno o más ácidos orgánicos: cítrico, málico y ascórbico. La adición de ácido cítrico, málico o

tartárico a una dieta a base de arroz aumentó la absorción de hierro de dos a cuatro veces (Gillooly y col., 1983; Ballot y col., 1987).

✘ **Quelatos y Ligandos de Bajo Peso Molecular:** al formar complejos con ligandos o sustancias quelantes de bajo peso molecular la solubilidad del hierro aumentará y el efecto sobre la absorción de este mineral es por tanto positivo. Entre los compuestos con mayor capacidad para formar este tipo de complejos con el Fe se encuentra la solución de EDTA. Se ha comprobado que la adición de EDTA Na a una dieta rica en fitatos favorece la absorción del Fe ya que impide la unión mineral-fitato (Fairweather-Tait y Hurrell, 1996; Hurrell y col., 2000).

#### **Inhibidores de la absorción del hierro no hemo:**

✘ **Fitatos:** la absorción de hierro reducida en los alimentos que contenían salvado de trigo hizo sospechar a Widdowson y McCance (1942) que el fítico podía ser un importante factor inhibidor. Posteriormente un gran número de estudios demostraron que el fítico es el principal inhibidor de los alimentos a base de cereales tales como trigo, fríjol de ojo negro, sorgo, arroz, judías y mijo (Gillooly y col., 1983; Rossander-Hulthen y col., 1990; Hurrell y col., 1992; Lestienne y col., 2005b). Se ha observado que incluso pequeñas cantidades de fítico tienen un fuerte efecto inhibidor en trigo y soja (Hallberg y col., 1989; Brune y col., 1992; Hurrell y col., 1992 y 2003a y b). Hurrell y col. (1992) observó que 1 mol de ácido fítico es capaz de acomplejar a 6 moles de ión férrico.

Los detalles del mecanismo por los que los fitatos inhiben la absorción de hierro aún no han sido caracterizados (Lynch y col., 1999). El fitato monoférrico, que constituye solamente una pequeña proporción del fítico existente en el salvado, no tiene propiedades inhibitoras (Simpson y col., 1981), pero la formación de complejos fitato diférrico y tetraférrico en el tracto gastrointestinal podría dar lugar a hierro no disponible para la absorción (Morris y Ellis, 1982; Sandberg y col., 1999). Sin embargo, el ácido fítico puede ser degradado mediante la activación de la fitasa endógena o por la adición de fitasa exógena (Cook y col., 1997; Hurrell, 2003a y b).

✘ **Polifenoles:** estos compuestos, fundamentalmente los taninos, representan el segundo factor inhibidor de la absorción del hierro no hemo (Siegenberg y col., 1991; Lestienne y col., 2005).

Existe una correlación inversa entre polifenoles condensados y absorción de hierro, ya que estos actúan como agente natural quelante de este mineral (Gillooly y col., 1984). Aproximadamente 50 mg de taninos de legumbres se unen a 1 mg de hierro ionizable del alimento (Rao y Prabhavati, 1982). Brune y col. (1991) establecieron que el efecto inhibitor de los taninos en la absorción de hierro en humanos es dosis-dependiente.

✘ **Proteínas vegetales:** algunos alimentos de origen vegetal con alto contenido proteico, entre los que destacan las semillas de soja y nueces (Cook y col., 1981; MacFarlane y col., 1990; Lynch y col., 1994; Hurrell, 2003a), inhiben fuertemente la absorción de Fe no hemo debido a la existencia de péptidos de alto peso molecular (Derman y col., 1987; MacFarlane y col., 1988 y 1990).

✘ **Fibra:** algunos estudios establecen que la fibra es capaz de acomplejar hierro (Lynch, 1997; Olivares y col., 2001; Lestienne y col., 2005), mientras que otros afirman que esta no ejerce ningún efecto (Brune y col., 1992; Martínez y col., 1998; Huh y col., 1999). Por ello se han estudiado los distintos componentes de la fibra para conocer sus efectos sobre la absorción de hierro en humanos; así pues, Rossander (1987) consideró que celulosa y pectinas no presentan capacidad inhibitora, sin embargo, *Ispagula* y *Psyllium* sí dan lugar a una suave reducción en la absorción de este mineral. Gillooly y col. (1984) observaron que celulosa, fibra detergente neutra, goma guar, goma tragacanto y pectina no alteraban la absorción de Fe, sin embargo, las fracciones de hemicelulosa y lignina sí actúan como inhibidores.

Numerosos estudios demuestran que los prebióticos tales como los fructooligosacáridos, como inulina, estimulan la absorción de hierro en el intestino grueso al incrementar la fracción soluble de Fe en el colon (Delzenne y col., 1995; Ohta y col., 1995b). Así mismo, la ingesta de fructooligosacáridos pueden activar también a las fitasas del intestino grueso, que degradarían el ácido fítico y mejorarían el estado del hierro (López y col., 2000b).

✘ **Interacción con otros minerales:** según la teoría de Hill y Matrone (1970), los elementos cuyas propiedades físicas y químicas son similares pueden actuar de forma antagónica. La absorción de hierro no hemo se ve afectada por distintos minerales, entre los que se incluyen **cinc, manganeso, cobre y calcio** (O'Dell, 1989) y calcio (Barton y col., 1983; Mahoney y col., 1985; Dallman, 1986;

Reddy y Cook, 1997).

El **cinc** disminuye la absorción de este elemento a través de un mecanismo poco conocido, incluso un exceso de cinc puede inducir anemia (Crofton y col., 1989).

Una ingesta elevada de **manganeso** interfiere la absorción del hierro no hemo (O'Dell, 1989), hecho que parece explicarse por la existencia de un receptor común para ambos en las células de la mucosa intestinal (Rossander-Hultén y col., 1990).

El **cobre** también puede afectar negativamente la absorción, aunque únicamente en los casos en los que se ingieren niveles altos del mismo (Fritz y col., 1977).

El **calcio** disminuye la absorción a través de un mecanismo aún no conocido totalmente. El calcio incluido en la leche y en el queso o como sales cálcicas interfieren en la absorción tanto del Fe hemo como del no hemo (Chanarin, 1999). Se ha demostrado la existencia de una correlación inversa entre la ingesta de Ca desde productos lácteos y el estatus de Fe (Lynch, 2000).

En definitiva, la baja disponibilidad del hierro en dietas a base de cereales y/o legumbres es debida a varios factores, incluyendo la presencia de inhibidores como ácido fítico, compuestos fenólicos, determinadas fracciones de la fibra (hemicelulosa y lignina (Gillooly y col., 1984), entre otros) y la cantidad insuficiente de substratos promotores tales como ácido ascórbico (Gillooly y col., 1984; Fairweather-Tait y Hurrell, 1996; Hurrell, 2003a).

En cuanto a la movilización del hierro, en torno a unos 30 mg del total ingerido son captados por la médula ósea para la síntesis de hemoglobina, abandonándola como eritrocitos, aunque una porción revierte por lisis de hematíes defectuosos (Morris y col., 1987). Se calcula que, una vez en circulación y transcurrida su vida media en el torrente sanguíneo, la porción de hierro que retorna a la médula y se reutiliza es del 50% (Cook y col., 1973). Otra parte de 4.5 mg se emplea en las reservas titulares y 3 mg se cambian con la transferrina en el fluido extracelular.

La eliminación del hierro (aproximadamente 1 mg/día en humanos) se realiza a través de las heces, seguido de la piel y, por último, la orina. El excretado fecalmente corresponde a la fracción no absorbida de la dieta, el biliar no absorbido, sangre

perdida en el tubo digestivo y detritos celulares del intestino. En el caso de la mujer, a estas pérdidas hay que sumar las de la menstruación (Cook, 1990).

#### **2.2.6.3.3. Fuentes alimentarias**

Las mejores fuentes alimentarias de hierro son hígado, músculo, hemoglobina y semillas de soja, y algo peores son huevos, leche y cereales. En cualquier caso, la absorción de hierro a partir de estos alimentos suele ser mayor en niños que en adultos.

La fuente alimentaria de hierro influye en gran medida sobre la eficiencia de su absorción, que oscila entre <1% y >20%. El hierro no hemo de los alimentos de origen vegetal es el que ocupa el lugar más bajo, los productos lácteos se encuentran en la parte media y la carne, en el extremo superior de la escala. La carne es una buena fuente de hierro, ya que la mayor parte del que contiene se halla en forma hemo, cuya absorción es de 2 a 3 veces mayor que la del hierro no hemo. Además, la carne posee otros factores (ácido ascórbico) que favorecen la absorción del hierro no hemo existente en el resto de los alimentos (Pallarés y col., 1993).

#### **2.2.6.3.4. Ingesta recomendada y toxicidad**

Los requerimientos varían ampliamente en función de la edad y el sexo (Tabla 12).

Por supuesto, ha de tenerse en cuenta la biodisponibilidad, por lo que la mayoría de las recomendaciones para humanos se basan en una absorción máxima del 10%. Esto es hasta tal punto importante, que según ILSI (International Life Sciences Institute) EUROPE (1990) se asigna distinta ingesta diaria en función de su disponibilidad en el alimento:

- hombres adultos sanos de 25-59 años de edad: 12,3 mg/día, para dietas con biodisponibilidad del hierro del 10% y 6,2 mg/día cuando la biodisponibilidad es del 20%.

- mujeres: en edad fértil de 23,8 mg/día (biodisponibilidad del 10%) y 11,9 mg/día (biodisponibilidad del 20%); durante la lactación 13,1 mg/día o 6,6 mg/día (según biodisponibilidad); en edad postmenopáusica 9,6 mg/día o 4,8 mg/día (idem).

En la rata, los requerimientos de hierro son 35 mg/Kg de dieta (Nutrient Requirements of Laboratory Animals, 1995).

Respecto a su toxicidad, pueden diferenciarse:

- intoxicación aguda: por ingestión de una dosis exagerada de Fe terapéutico. Puede determinar lesiones orgánicas graves e, incluso, muerte, pero es poco frecuente puesto que la dosis letal es 200-250 mg/Kg peso, en comparación con la dosis terapéutica de 2-5 mg/Kg al día.

- intoxicación crónica: consiste, fundamentalmente, en la patología conocida como hemocromatosis, producto del aumento de los depósitos de hierro en forma de hemosiderina. Su manifestación más común es la fibrosis orgánica (hígado, páncreas, corazón, articulaciones e hipófisis) (Yip y Dallman, 1998).

**Tabla 12.** Ingestas Diarias Recomendadas de Magnesio, Cinc y Hierro (Instituto de Medicina, 2001)

Mg		Zn		Fe	
Edad (años)	Mg/día	Edad (años)	Zn/día	Edad (años)	Fe/día
0-0.5	30	0-0.5	3	0-0.5	9
0.5-1	75	0.5-1	3	0.5-1	11
1-3	80	1-3	3	1-3	7
4-8	130	4-8	5	4-8	10
9-13	240	9-13	8	9-13	8
14-18	410H-360M	14-18	11H-9M	14-18	11H-15M
19-30	400H-310M	19-50	11H-8M	19-30	8H-18M
31-50	420H-320M	51-70	11H-8M	31-50	8H-18M
51-70	420H-320M	>70	11H-8M	51-70	8
>70	420H-320M			>70	8
≤18	400	≤18	13	≤18	27
19-50	350	19-50	11	19-50	27
31-50	360	31-50	11	31-50	27
≤18	360	≤18	14	≤18	10
19-50	310	19-50	12	19-50	9
31-50	320	31-50	12	31-50	9

H=hombre; M=mujer

## 2.2.7. FACTORES NO NUTRITIVOS

Las legumbres alimentarias contienen en sus semillas una serie de sustancias que pueden causar efectos negativos al ser consumidos por los animales o el hombre (tabla 13). Estos efectos pueden provocar desde un inofensivo sabor hasta desórdenes fisiológicos muy severos e incluso pueden ser considerados tóxicos ó inhibidores del crecimiento de animales (Liener, I.E., 1962; Jaffe and Lette, 1968; McPhee and Muehlbauer, 2002). Esto incluye fitatos, polifenoles, inhibidores de enzimas digestivos (antiamilásicos, antitripsina y antiquimiotripsina), taninos condensados, fitohemaglutininas o lectinas (responsables de la aglutinación de los glóbulos rojos) factores flatulentos, saponinas, ciertas enzimas, compuestos goitrogénicos (capaces de producir bocio), glicósidos cianogénéticos (por hidrólisis producen bocio), antivitaminas, estrógenos, latirogenos y alergenos.

A pesar de sus efectos no nutritivos muchos de ellos representan un papel muy importante en la naturaleza. Lectinas, alcaloides y taninos contribuyen a la resistencia de la planta frente a enfermedades y al ataque de insectos y proporcionan resistencia al estrés medioambiental (Riemer and Whittaker, 1989; Fornal and Ciepielewska, 1991). Los  $\alpha$ -galactósidos sirven como fuente energética para la planta, siendo fundamentalmente utilizados por esta en situaciones de estrés tales como enfriamiento y desecación (Jones y col., 1998; Monteze Guimaraes y col., 2001). De acuerdo con Levitt (1972) se cree que estos azúcares llegan a ligarse directamente sobre las proteínas, previniendo así su desnaturalización. Williams (1970) presenta evidencia de la utilidad del ácido fítico como fuente de fósforo y cationes para la germinación de la semilla, pudiendo también actuar como fosfágeno (Asada y col., 1969). Gupta y Ventakasubramaniam (1975) sugieren su posible función como antimicótico previniendo la formación de aflatoxinas en la soja al hacer el cinc no biodisponible para el hongo.

**Tabla 13.** contenido de algunos factores no nutritivos en el guisante crudo (mg/g) (Liener, 1976; Zdunczyk y col., 1997; Canibe y col., 1997; Igbasar and Guenter, 1997; Marzo y col., 1997; Frias y col., 1998; Gelencsér y col., 1998a,b; Muel y col., 1998; Wang y col., 1998; Grala y col., 1999; Alonso y col., 2000a; Fredrikson y col., 2001; Mariscal-Landín y col., 2002; Habiba, 2002; McPhee and Muehblauer, 2002; Salgado y col., 2002; Sandberg, 2002b; Wang y Daun, 2004):

TIA (TIU/mg SS)	1.28– 14.6
Quimotripsina inhibidores (IU/mg SS)	4.85
$\alpha$ -amilasa inhibidores (IU/mg SS)	ND
Hemaglutinina actividad (IU/mg SS)	6.0
$\alpha$ -galactósidos	22.9– 96.0
Ácido Fítico	
IP6 ( $\mu$ mol/g S.S.)	6.2 – 17.1
IP5 ( $\mu$ mol/g S.S.)	ND - 4.15
IP4 ( $\mu$ mol/g S.S.)	ND
IP3 ( $\mu$ mol/g S.S.)	ND
Polifenoles	
Flavonoides	0.25 – 0.70
Taninos mg/g	ND-41.0
Fenoles totales	ND – 0.55
Taninos condensados <sup>a</sup>	ND – 0.26
Lectinas (HU)	100 – 400

TIU: unidades internacionales del Inhibidor de Tripsina.

<sup>a</sup> g equivalentes catequínicos/Kg<sup>-1</sup> dieta.

ND: cantidades no detectables.

### 2.2.7.1. INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD TRIPSINA

Los Inhibidores de Actividad Tripsina (TIA) son proteínas con capacidad para inhibir a las proteasas (tripsina) en el sistema digestivo, reduciendo así la digestibilidad

de las proteínas. Los inhibidores de la actividad de la tripsina (TIA) se representan en unidades inhibitoras de tripsina (TIU). Una unidad de tripsina se define como un incremento de la absorbancia en 0.01 unidades a 410 nm por 10 ml de reacción mixta (Gueguen y col., 1993). El contenido en inhibidores de la actividad de tripsina en las legumbres alimentarias es de 1.28 a 14.60 TIU/mg (Tabla 13). Los niveles de TIA pueden variar según las variedades (genotipos) y las condiciones medioambientales durante el desarrollo de la planta (Leterme y col., 1992; Bacon y col., 1995).

Estudios nutricionales con legumbres alimentarias han revelado que la presencia de inhibidores de la tripsina y la quimotripsina en la dieta pueden conducir a un incremento en la producción de enzimas pancreáticas y consecuentemente a un alargamiento del páncreas en ratas (hipertrofia pancreática) y a una reducción en la aparente biodisponibilidad de los aminoácidos azufrados (Liener y Kakade, 1980; Wang y col., 1998; McPhee y Muehlbauer, 2002). Las dietas con inhibidores de las proteasas producen una disminución del crecimiento. La alimentación de animales con dietas que contienen inhibidores de proteasas puede disminuir su incremento de peso diario. Puszta y col. (1992) obtienen una disminución del 22% en el peso de las ratas cuando las alimentan con dieta de lactalbúmina adicionada de inhibidor de la proteasa procedente de fíjol de ojo negro. Kakade y col. (1976) achacan la disminución en el crecimiento de sus animales a un efecto conjunto de los inhibidores de la tripsina y la peor digestibilidad natural de las proteínas vegetales que pueden dar complejos semejantes a los formados por enzima e inhibidores.

Herkelman y col. (1992) observan diferencias en el incremento de peso diario cuando alimentan cerdos con dietas de diferente contenido en inhibidores de las proteasas siendo mayor el incremento de peso cuanto menor es la concentración de inhibidores de las proteasas. Grant y col. (1993; 1995) señalan la disminución del crecimiento de sus ratas en los 200 primeros días de un periodo experimental de 700 y 800 días, posteriormente el crecimiento se iguala al de los animales que consumen la dieta control.

De igual forma, las dietas con inhibidores de las proteasas producen una disminución de la utilización digestiva de la proteína. El aumento de la concentración de los inhibidores de las proteasas en la dieta conlleva una disminución en la digestibilidad aparente de materia seca, nitrógeno y aminoácidos. Kakade y Hoffa (1973) responsabilizan a los inhibidores de la tripsina por la disminución de la

digestibilidad *in vitro* de la proteína de soja cruda o autoclavada. Leterme y col. (1990) y Jondreville y col. (1992) encuentran las digestibilidades más bajas en las variedades de guisantes con más alto contenido en inhibidores de las proteasas. Huisman y Le Guen (1991) observan en sus estudios la influencia negativa de los inhibidores de proteasas del guisante sobre la digestibilidad de la proteína en el íleon. Esta disminución de la digestibilidad puede deberse además a un posible efecto antigénico de la proteína.

Hagemeister y Barth (1993) señalan la influencia de los inhibidores de las proteasas en el metabolismo de los aminoácidos a través de la pérdida de proteína endógena, ésta puede ser la causa de la baja digestibilidad aparente de la proteína de dietas basadas en alimentos vegetales que contengan otros factores no nutritivos. La naturaleza de esta pérdida endógena difiere según el animal de experimentación. En la rata existe muy poca cantidad de aminoácidos azufrados en las heces y su presencia puede ser debida a la degradación bacteriana en la parte distal del intestino (Carrol y col., 1953) o a permanecer la cisteína en uniones que no son accesibles para el sistema digestivo de la rata (Barnes y col., 1965).

Huisman (1994) también relaciona la disminución de la digestibilidad aparente del nitrógeno con un aumento de las pérdidas endógenas de nitrógeno debidas a la acción de los inhibidores de las proteasas.

Vidal-Valverde y col. (2003) han determinado el contenido de TIA de distintas líneas de guisante y observaron que esta varía ampliamente (0.8-8.4 TIU/mg S.S.), coincidiendo con Wang y col. (1998). Adsule (1976) observó que entre nueve legumbres estudiadas el guisante es el que contiene menor cantidad de TIA; de igual manera Bhatti (1977) encontró que en comparación con soja, judía y fríjol de ojo negro el contenido de TIA en guisante es muy reducido.

La influencia de la germinación en el contenido en inhibidores de la actividad tripsina (TIA) varía según el tipo de legumbre, condiciones y duración del proceso (Savelkoul, 1992). Algunos autores han observado importantes reducciones en el contenido en TIA en judías germinadas (Mbithi-Mwikya y col., 2001) y fríjol de ojo negro germinado (Uwaegbute y col., 2000; Ibrahim y col., 2002), sin embargo, otros han sugerido un aumento (Batra y col., 1986), e incluso ninguna variación significativas como es el caso de judías (Noor y col., 1980; Chang & Harrold, 1988) y

lentejas (Frias y col., 1995a) germinadas. Urbano y col. (2005a) establecieron que el contenido en TIA en guisantes germinados durante 3 días no se afectaba pero incrementaba ligeramente con 6 días de germinación debido a la concentración provocada por la pérdida de materia seca.

Trugo y col. (1990) observaron como la germinación (después de 3 días) tenía un efecto muy pequeño en la eliminación de los TIA, mientras que la cocción reducía los niveles de TIA en más de un 90%.

El cocinado es el procesado más efectivo para la reducción del contenido de TIA en las legumbres, ya que los destruye completamente (Adsule y Barat, 1984; Periago y col, 1998; Habiba, 2002). Griffiths (1984) demostró que el tratamiento con calor seco tenía pocos efectos, pero el calor húmedo (autoclave a 121°C durante 30 minutos) eliminaban completamente los inhibidores de la tripsina y la quimotripsina en el guisante y la judía.

Liener (1976) observó como el escaso valor nutritivo de las legumbres crudas y la hipertrofia pancreática que se desencadena tras su consumo, no se debía únicamente a la presencia de TIA, si no también al estado natural de la proteína, para Liener era evidente que aunque la ausencia de inhibidores mejoraba la susceptibilidad de la proteína al ataque proteolítico de la tripsina, el simple tratamiento con calor, previo a su consumo, favorecía aún mas la digestibilidad de la misma, disminuyendo la talla del páncreas.

### **2.2.7.2. $\alpha$ -GALACTÓSIDOS**

Como se ha comentado en apartados anteriores estos azúcares de bajo peso molecular y alta solubilidad en agua parecen tener una estrecha relación con la flatulencia (Reddy, 1980; Fleming, 1981; Phillips & Abbey, 1989; Suarez, 1999), ya que el hombre y los animales monogástricos carecen de la enzima  $\alpha(1-4)$  galactosidasa (necesaria para hidrolizar los enlaces  $\alpha(1-6)$  que unen las moléculas de galactosa) en el intestino delgado de forma que alcanzan el intestino grueso donde van a ser fermentados por las enzimas producidas por la microbiota del colon (Ferket, 1991; Bengala Freire y col., 1991). El resultado es, entre otros ya mencionados, la

producción de gases tales como dióxido de carbono, hidrógeno y pequeñas cantidades de metano, causando además molestias gastrointestinales como ruido abdominal, calambres, diarrea y náuseas (Steggerda, 1968; ; Calloway y col., 1971; Rackis, 1975; Reddy y col., 1980; Olsen y col., 1982; Cummings y col., 1986; Trugo y col., 1993). Este fenómeno no es un efecto tóxico de las legumbres, pero si indeseable y embarazoso que hace que la gente opte por no incluirlos en su dieta habitual. Los principales oligosacáridos causantes de la producción de flatulencia son rafinosa y estaquiosa (Hellendoorn, 1969; Calloway y Hickey, 1971; Cristofaro y col., 1974; Rackis, 1974; Murphy, 1975; Fleming, 1981; Savitri y Desikachar, 1985). Así pues estos compuestos tienen más importancia por sus efectos negativos sobre el bienestar del hombre y el animal que por su contribución como fuente de energía. Becker y col. (1974) observaron que tras la desaparición de los alfa-oligosacáridos se reducía significativamente la producción de hidrógeno de la rata.

Los guisantes han sido considerados usualmente como legumbres con baja actividad productora de flatulencia (Murphy, 1975), diversos estudios han demostrado que el nivel de estos factores no nutritivos es significativamente inferior en la harina de guisante que en la harina de judía (Elkowicz y Sosulski, 1982; Sathe y Salunkhe, 1984).

Si queremos incrementar el consumo de leguminosas es necesario conseguir reducir los niveles de estos compuestos; múltiples han sido las experiencias desarrolladas con estos fines. El procesado doméstico o tecnológico debe afectar el contenido en  $\alpha$ -galactósidos de las legumbres por dilución en el medio y/o transformación en la fracción de carbohidratos que ya si son digeribles por las enzimas del intestino delgado.

El remojo es el tratamiento más común para la eliminación parcial de los  $\alpha$ -galactósidos de las semillas, siendo este más eficiente cuando se añade bicarbonato sódico al agua de remojo, debido a la mayor permeabilidad obtenida por la parcial solubilización de las paredes de las células (Vijayakumari y col., 1996 y 1997; Mulimani y col., 1997; Ibrahim, 2002). El-Adawy y col. (2000) estableció que las mayores pérdidas se producían cuando se añadía al agua de remojo una solución de bicarbonato sódico al 0.5%.

Sanchez-Mata y col. (1999) detectaron una reducción en estaquiosa, rafinosa

después del remojo y cocinado de garbanzos (22.0-42.8%). Resultados similares fueron obtenidos por Silva y Braga (1982), Attia y col. (1994), Vijayakumari y col. (1997) y Wang y col. (1997), quienes estudiaron este fenómeno en otras legumbres. Vidal-Valverde y col. (1992a) observaron como el remojo de las lentejas reducía drásticamente la cantidad de alfa-galactósidos, mientras que el cocinado de las lentejas remojadas sólo modificaba ligeramente el contenido de alfa-galactósidos. Según Alonso y col. (2001) tras la extrusión de harina de guisante sólo disminuyen los niveles de estaquiosa, mientras que los de verbascosa y rafinosa no se modifican significativamente, sin embargo, en el caso de las habas se reducen drásticamente rafinosa, estaquiosa y verbascosa.

Múltiples autores han observado como el cocinado reduce el contenido en  $\alpha$ -galactósidos entre un 20 y 100% (Trugo y col., 1990; Vidal-Valverde y col. 1992a; Abel-Gaward, 1993; Attia y col., 1994). Vidal-Valverde y col. (1993a) determinaron que la mayor pérdida de  $\alpha$ -galactósidos ocurría en garbanzos y judías remojadas cuando eran hervidas a 35°C durante 5 h. Sin embargo, existen en la literatura artículos donde se describe un incremento en el contenido en oligosacáridos después del cocinado debido, posiblemente, a la hidrólisis de los oligosacáridos unidos a proteínas o a otras macromoléculas o a la hidrólisis de polisacáridos de elevado peso molecular (Rao y Belavady, 1978; Revilleza y col., 1990).

Vijayakumari y col. (1997) comparó la reducción de rafinosa y estaquiosa obtenida tras someter a la semilla de *Prosopis chilensis* a diferentes tratamientos: remojo, cocción y autoclave, y concluyó que de todos ellos, el autoclave parecía ser el método más efectivo para la eliminación de estos nutrientes (63-71%).

La germinación es uno de los tratamientos biológicos más eficientes en la eliminación de  $\alpha$ -galactósidos. Monteze Guimaraes y col. (2001) sugirieron que la germinación contribuye a la hidrólisis de galacto-oligosacáridos en mono o disacáridos que son empleados como fuente de energía o esqueleto hidrocarbonado para la biosíntesis de macromoléculas necesarias para el desarrollo embrionario durante los primeros estados de la germinación. La hidrólisis de galacto-oligosacáridos es catalizada por  $\alpha$ -galactosidasa, la cual no se encuentra en cantidades apreciables en la semilla en estado latente y comienza a activarse en el inicio de la germinación. Esta reducción fue observada tras la germinación de diferentes semillas de legumbres como fríjol de ojo negro (Nnanna y Philipps, 1988), guisantes (Hsu D y col., 1980;

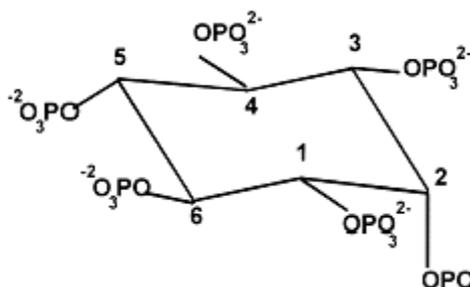
Urbano y col., 2005), lentejas (Frias y col., 1996a), lupino (Trugo y col., 1993) así como soja (Donangelo y col., 1995). Trugo y col. (1990) observaron una reducción sustancial (cerca al 80%) en el contenido de  $\alpha$ -galactósidos en alubias después de tres días de germinación, ya que la actividad de la  $\alpha$ -galactosidasa alcanzaba el máximo valor, y demostró ser eficiente en la reducción intestinal de fermentación, con medidas de los niveles de  $H_2$  en el aliento de voluntarios humanos después del consumo de las semillas de judías. Conclusiones similares fueron observadas por Sathe y col. (1984) en la judía, Nnanna y Philipps (1988) y Monteze Guimaraes y col. (2001) en el frijol de ojo negro.

Khokhar y col. (1996) concluyeron que la cocción y la germinación son los métodos de procesado más efectivos, a escala industrial y doméstica, para reducir el contenido en  $\alpha$ -galactósidos en la semilla de guisante. Conclusiones similares fueron establecidas por Kadlec y col. (2001) al observar como la combinación del efecto de la germinación y el calentamiento con microondas y/o desecado convencional, decrecían aún más el contenido de los  $\alpha$ -galactósidos de los guisantes germinados.

Además de los métodos anteriormente descritos, en la bibliografía existen múltiples estudios cuya finalidad es la reducción de los  $\alpha$ -galactósidos como la biotecnología y la ingeniería genética (De Lumen, 1992), la selección genética (Price y col., 1988; Leakey, 1994) o extracción con etanol (Leske y col., 1991). Por otro lado, desde un punto de vista microbiano encontramos otras técnicas útiles como la fermentación natural (Vidal-Valverde y col., 1993b; y Frias y col., 1996b), la incubación de productos derivados de leguminosas, principalmente soja, con varios microorganismos o enzimas derivadas de microorganismos u hongos (Thananunkul y col., 1976; Cruz y col., 1981) y la fermentación láctica, que podría emplearse para reducir el contenido en rafinosa y estaquiosa en productos derivados de leguminosas, como la leche de soja (Mital y Steinkraus, 1975). Duszkievicz-Reinhard y col (1994) sometieron a las harinas de leguminosas (guisantes y judías) a una fermentación con bacterias ácido lácticas, pero los resultados obtenidos no fueron los esperados, debido a que las condiciones de crecimiento de las bacterias no eran las favorables (a diferencia de lo que ocurre en la leche de soja), por lo que la cantidad de estaquiosa utilizada por las mismas fue menor.

### 2.2.7.3. ÁCIDO FÍTICO

El ácido fítico [mio-inositol (1,2,3,4,5,6) hexafosfato] (IP<sub>6</sub>) consiste en una molécula de mio-inositol y seis moléculas de fosfato inorgánico:



Se encuentra presente en muchos alimentos de origen vegetal, principalmente cereales y legumbres, en forma de sales de cationes mono y divalentes (Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, K<sup>+</sup>) siendo, al mismo tiempo, una importante reserva de fósforo durante la germinación y el crecimiento de las plantas (Cosgrove, 1980) y una forma de almacén de cationes en muchas semillas (Sovolev, 1966; Cosgrove, 1966; Gorospe y col., 1992). En la semilla del guisante, alrededor del 45% del fósforo total está presente en forma de fitato (Gopalan y col., 1982). De acuerdo con Honke y col. (1998) el fítico se acumula en el guisante gradualmente durante su maduración. Dentro de la semilla es el germen el que contiene las mayores cantidades de fítico y de actividad fitasa comparado con el cotiledón (Fredrikson y col., 2001). Los guisantes deshidratados contienen una media del 0.85% de ácido fítico, el cual está muy por debajo de los niveles encontrados en la mayoría de los productos alimenticios (Graft y Dintzis, 1982; Cheryan, 1980). Sin embargo es el factor no nutritivo más abundante en esta legumbre (tabla 13) (Fredrikson y col., 2001).

El ácido fítico es considerado como un factor no nutritivo ya que los seis grupos fosfato de la molécula de IP<sub>6</sub> lo hacen comportarse como un fuerte agente quelante reduciendo la biodisponibilidad principalmente de cationes di- y trivalentes, tales como cinc, cobre, hierro, manganeso, magnesio y calcio (Vohra y col. 1965; Harland y Oberleas, 1987; Weaver y Kannan, 2002). Bajo las condiciones de pH del tracto gastrointestinal, se forman los complejos insolubles metal-fítico (Platt y Clydesdale,

1987; Gifford y Clydesdale, 1990), convirtiendo al metal en no disponible para la absorción intestinal reduciéndose su biodisponibilidad en animales y en humanos (Davies y Nightingale, 1975; Davies, 1982; Kratzer y Vohra, 1986; Nelson y col., 1989). Además el fítico disminuye la digestibilidad de proteínas (Knuckles y col., 1986), almidón (Yoon y col., 1983), y lípidos (Nyman y Björck, 1989). Se ha descrito que el ácido fítico forma complejos con la proteína, muy difíciles de romper (Singh y Krikorian, 1982; Liener, 1994), que la hacen más resistente a la degradación proteolítica (Cheryan, 1980), reduciendo significativamente la digestibilidad *in vitro* de la misma (Carnovale y col., 1988; Knuckles y col., 1989; Al-Wesali y col., 1995) y por tanto, el valor nutricional de la legumbre.

El efecto perjudicial del ácido fítico sobre la digestibilidad de la proteína surge por su habilidad de interactuar con ellas, formando dos tipos de complejos distintos, dependiendo del pH (Cheryan, 1980). Complejos binarios proteína-fitato que se forman a pH ácido, y complejos terciarios proteína-mineral-fitato que se forman mediante puentes catiónicos a pH próximo a la neutralidad. La reducción de la solubilidad de las proteínas como consecuencia de los complejos proteína-fitato pueden también afectar negativamente a ciertas proteínas funcionales de las legumbres que dependen de su hidratación y solubilidad (Urbano y col., 2000). La posibilidad de que el fítico pueda inhibir la proteólisis, mediante la inhibición de las proteinasas digestivas, fue sugerido por Sing y Krikorian (1982), pero investigaciones posteriores han fracasado al intentar demostrar este hecho (Deshpande y Damodaran, 1989). Sin embargo, sí se ha demostrado la capacidad del ácido fítico en inhibir la actividad de la enzima pepsina (Camus y Laporte, 1976),  $\alpha$ -amilasa (Cawlay y Mitchell, 1968; Sharma y col., 1978) y tripsina (Singh y Krikorian, 1982).

Durante el procesado del alimento y en la digestión, el ácido fítico o inositol hexafosfato (IP<sub>6</sub>) puede ser parcialmente defosforilado, dando lugar a los productos de degradación: penta- (IP<sub>5</sub>), tetra- (IP<sub>4</sub>) y tri-fosfatos (IP<sub>3</sub>), a través de la acción de la fitasa endógena, que se encuentra en la mayoría de las semillas de las plantas superiores (Zhou Y Erdman, 1999).

En los últimos años se han desarrollado múltiples experiencias con el fin de reducir el contenido de fítico en los alimentos, destinados al consumo humano y animal, y así aumentar la digestión de las proteínas y la biodisponibilidad de los

minerales (Crean y Haisman, 1963; Hsu y col. 1980; Lönnerdal y col., 1989; Brune y col., 1992; Sandström & Sandberg, 1992; Sanberg y col., 1999). Hurrell (2003) estableció que existen tres vías para reducir el efecto inhibitor del ácido fítico en la absorción de los minerales en dietas basadas en alimentos complementarios a base de cereales y legumbres. El primer método es la eliminación del ácido fítico, el segundo método es su degradación enzimática y el tercer método es la adición de compuestos al alimento que prevengan la unión fitato-mineral. Tales compuestos incluyen el ácido ascórbico y EDTA sódico. Aunque posteriormente afirma que la forma más efectiva de reducir el ácido fítico es mediante la degradación enzimática.

Numerosas técnicas biológicas de procesado, tales como remojo (Urbano y col., 2003; Lestienne y col., 2005a), cocinado (Fernández y col., 1997), germinación (Honke y col., 1998; Vidal-Valverde y col., 1998b) o fermentación (Kozłowska y col., 1996), reducen el contenido en fítico como consecuencia de su disolución en el medio o al aumento de actividad de fitasa, sintetizada naturalmente por la planta (fitasa endógena) o por una serie de microorganismos (Nayini y Markakis, 1983; Sandberg y Svanberg, 1991; Larson y Sandberg, 1992; Svanberg y col., 1993; Khalil y Mansour, 1995; Kozłowska y col., 1996; Honke y col., 1998; Sandberg y Kozłowska, 1999). Actualmente, en el mercado, se encuentran disponibles preparados de fitasa microbiana (haciendo factible su empleo en el procesado de alimentos). Estas fitasas comerciales son capaces de reducir el contenido de fítico cuando se adicionan al alimento (Pallauf y col., 1992; Van Hartingsveldt y col., 1994; Urbano y col., 2003).

La cocción ordinaria consigue reducir el contenido en fítico, de la semilla del guisante, en un 40% (Habiba, 2002). Esto indicaría que tras el cocinado de guisantes se eliminan considerables cantidades de ácido fítico, el cual, si se encuentra unido a algún nutriente, tales como minerales o proteínas, detendría su utilización (Nestares y col., 1999). Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por Abu El-Maati (1997), Beal y Mehta, (1985), Torre y col. (1991), así como, Zdunczyk y col. (1997). Bishnoi y col. (1994b) encontraron una reducción menos acentuada (8%) tras la cocción ordinaria del guisante, siendo esta disminución mayor (12%) cuando se trataba de cocción bajo presión. Alonso y col. (2001) observaron una reducción significativa en ácido fítico tras la extrusión de harina de guisante. Sin embargo, algunos autores parecen no encontrar efecto alguno del cocinado sobre el contenido de fítico; Reddy y col. (1978) no detectaron rotura del ácido fítico tras el cocinado de

judías, ya que las pequeñas pérdidas que pudieran observarse se debían a una disolución del fítico en el agua de cocción. Las experiencias con habas de Fernández y col. (1994) indican que el cocinado no ejerce efecto alguno salvo en el caso de un remojo previo en medio ácido, en el que se producirían las condiciones favorables para una autólisis del ácido fítico por parte de la fitasa endógena de la semilla. Es posible que las distintas especies de leguminosas respondan de forma diferente a este tipo de tratamiento debido a que cada una presenta una estructura interna propia.

Además se han ensayado otros métodos como ultrafiltración (Okubo y col., 1975), precipitación y separación del ácido fítico en la preparación de concentrados proteicos de soja mediante la combinación de pH bajo y alta concentración de calcio, o pH alto y baja concentración de calcio (Ford y col., 1978) o combinación de diálisis y resina de intercambio aniónico para disminuir la concentración de ácido fítico y sus sales a diferentes rangos de pH, obteniendo una disminución del 78% sin unas pérdidas significativas en la cantidad de proteína (Smith y Rackis, 1957). Estos tipos de métodos son poco practicables a escala industrial.

Sin embargo, el ácido fítico no solo tiene efectos negativos en la salud humana; Múltiples estudios indican que actúa como un antioxidante natural, principalmente debido a sus propiedades quelantes del hierro, comportándose como un potente inhibidor de la formación de radicales hidroxilo de hierro, al bloquear el lugar de unión (Graf y col., 1984; Empson y col., 1991; Hawkins y col., 1993; Zhou y Erdman, 1995). Existen algunos estudios encaminados a explicar su papel en la prevención de ciertos cánceres, tales como el cáncer de colon. Las primeras pistas de su acción anticarcinogénica se observaron a través de estudios epidemiológicos, los cuales mostraban una menor incidencia en cáncer de colon dentro de poblaciones consumidoras de dietas vegetarianas (Englyst y col., 1982a y b). El mecanismo de acción no se conoce aún; sin embargo, se supone que el fítico, por esa habilidad de quelar minerales, tiene un efecto protector, al reducir por un lado, el riesgo de peroxidación lipídica (Rickard y Thompson, 1997), y por otro, la formación de radicales hidroxilo que se acomplejen al hierro en el colon (Nelson, 1976; Graf y Eaton, 1985; Shamsuddin, 1995). Además el fítico disminuye los niveles séricos de colesterol y triglicéridos (efecto hipolipidémico) (Zhou y Erdman, 1995; Rickard y Thompson, 1997).

Los productos de degradación del fítico tales como IP<sub>3</sub> e IP<sub>4</sub>, además de

presentar potentes propiedades anticancerosas, ya que alteran la proliferación y diferenciación celular, juegan un papel significativo en la mediación de la respuesta celular y se ha observado que pueden actuar como segundos mensajeros en los sistemas de transducción (Michell, 1986; Holub, 1987; Berridge y Irvine, 1989; Potter, 1990; Challiss y col., 1991; Irvine, 1992; Zhou y Erdman, 1995). Por otra parte podrían tener efectos metabólicos, tales como reducción de enfermedades cardíacas mediante el control de la hipercolesteronemia y arteroesclerosis (Jariawalla y col., 1990; Potter, 1995), prevención de formación de piedras en el riñón (Modlin, 1980; Ohkawa y col., 1984), y reducción del riesgo de padecer cáncer de colon (Baten y col., 1989; Ullah & Shamsuddin, 1990; Graf & Eaton, 1993; Vucenic y col., 1993; Yang & Shamsuddin, 1995; Shamsuddin y col., 1997). Además, se han estudiado la participación de mio-inositol (1,2,6) trifosfato en la prevención de complicaciones de la diabetes y en el tratamiento de enfermedades crónicas inflamatorias, así como, en enfermedades cardiovasculares (Claxon y col., 1990; Ruf y col., 1991; Siren y col., 1991; Carrington y col., 1993).

#### **2.2.7.3.1. EMPLEO DE ENZIMAS COMERCIALES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA**

El uso de enzimas en los procesos industriales permite frecuentemente evitar el empleo de altas temperaturas, solventes orgánicos y pH extremos, mientras que al mismo tiempo estimula la reacción específica, la pureza de los productos y reducen el impacto medioambiental. El incremento en el empleo de enzimas industriales depende de una constante innovación para mejorar el desarrollo y reducir costes. Esta innovación es llevada a cabo mediante un rápido incremento del conocimiento de una enorme diversidad de enzimas naturales, ADN recombinante y tecnologías de fermentación que permiten esta diversidad de producción a bajo coste, y la modificación de herramientas proteicas que permiten la incorporación de enzimas en el mercado industrial (Cherry y Fidantsef, 2003).

Durante la última década, las enzimas alimentarias han supuesto un cambio significativo en los avances de la nutrición animal, particularmente en las especies monogástricas. Su utilización en la industria alimentaria animal es reciente, aunque está aumentando drásticamente en los últimos años con el objetivo de mejorar la calidad nutritiva de los materiales crudos (Van Hartingsveldt y col., 1996). El empleo

de enzimas en las dietas de cerdos es actualmente, dentro de Europa, universal (Bedford, 2000).

#### **2.2.7.3.1.1. ¿Qué son las enzimas alimentarias?**

Las enzimas son proteínas existentes en todas las células vivas aunque no se les considera nutrientes por sí mismos. Además de regular todos los procesos metabólicos y biológicos, son vitales en la digestión de alimentos. Al ser catalizadores aceleran las reacciones químicas en las que intervienen. Son sólo biológicamente activos bajo condiciones muy específicas de temperatura, pH y humedad. Las enzimas son muy específicas para sus substratos y para las reacciones químicas que ellos catalizan. Son producidos por todos los organismos vivos tales como microorganismos, plantas y animales. Al ser proteínas, cuando son adicionados al alimento, son digeridas en el tracto digestivo, del mismo modo que el resto de las proteínas, sin dejar ningún residuo en las heces u orina. La tecnología moderna hace que la extracción de enzimas procedente de bacterias u hongos sea factible. Es más, esta permite la producción de enzimas alimentarias comerciales en gran escala y consecuentemente, hace que sean más asequibles y económicas para su uso en aplicaciones alimentarias.

#### **2.2.7.3.1.2. Clasificación de enzimas**

Las enzimas alimentarias empleadas comercialmente podemos agruparlas dentro de cuatro categorías: fitasas, carbohidrasas (incluyendo  $\alpha$ -amilasa,  $\alpha$ -galactosidasa, NSP- enzimas degradadoras), proteasas y lipasas. Estas son muy efectivas en mejorar la digestibilidad del fósforo procedente del fítico, así como de otros minerales, carbohidratos (incluyendo almidón), oligosacáridos y polisacáridos no amiláceos, proteínas y lípidos, respectivamente.

##### **2.2.7.3.1.2.1. ¿Porqué son necesarias las enzimas alimentarias?**

La necesidad de suplementar los alimentos con este tipo de enzimas se debe a numerosos factores ya sean fisiológicos, biológicos, dietéticos y medioambientales. En animales jóvenes la producción de enzimas endógenas puede ser limitada, debido a que tienen un sistema enzimático inmaduro, por lo que el suplemento de enzimas alimentarias podría ser una necesidad fisiológica. Factores no nutritivos, tales como el

ácido fítico, oligosacáridos y polisacáridos no amiláceos, se encuentran abundantemente en los ingredientes de origen vegetal. Como ya hemos comentado anteriormente, estos factores son capaces de acomplejarse con nutrientes dietéticos, afectando su digestibilidad. Sin embargo, los animales monogástricos no producen enzimas endógenas capaces de degradarlos. Por lo tanto, las enzimas alimentarias se adicionan para ayudar en la digestión y liberación de los nutrientes absorbibles y utilizables. Al eliminar los efectos no nutritivos, mejoramos la disponibilidad de los nutrientes alimentarios. Dirigir la excreción de nutrientes (particularmente fósforo, nitrógeno y minerales) en la producción de ganado es un hito importante para controlar la polución medioambiental. Así pues, las enzimas alimentarias son llaves básicas para mejorar la digestibilidad de nutrientes que no pueden ser digeridos por las enzimas endógenas.

#### **2.2.7.3.1.2.2. LA ENZIMA FITASA**

El ácido fítico es degradado a mio-inositol pentafofato ( $IP_5$ ) y fósforo inorgánico por enzimas denominadas fitasas [mio-inositol (1,2,3,4,5,6) hexafofato fosfohidrolasa (EC 3.1.3.8, EC 3.1.3.26)] (Reddy y col., 1989). En general, la fitasa puede actuar no solo sobre  $IP_6$ , sino también sobre inositoles fosfato menores ( $IP_5$ ,  $IP_4$ ,  $IP_3$ ). Frias y col. (2003a) determinaron que el comportamiento de la fitasa es claramente diferente dentro de cada legumbre debido, en parte, al heterogéneo contenido en inositoles fosfato de cada especie; en concreto, ellos estudiaron el guisante y la lenteja, y observaron que mientras el guisante contiene  $IP_6$ ,  $IP_5$ ,  $IP_4$  e  $IP_3$ , en la lenteja sólo existen  $IP_6$  e  $IP_5$ .

La fitasa forma parte de un subgrupo de enzimas de la familia de las fosfatasas ácidas. En términos generales, podrán ser consideradas fitasas todas aquellas enzimas que exhiban capacidad para hidrolizar el ácido fítico ( $IP_6$ ) (Gibson & Ullah, 1990). Existen diferentes tipos de fitasa: 3-fitasas (EC 3.1.3.8), 4-fitasas, y 6-fitasas (EC 3.1.3.26), indicando el punto susceptible de ataque de la unión fosfoéster (Tijsskens y col., 2001).

La fitasa es una enzima que ha sido estudiada extensamente durante los últimos años debido al enorme interés existente para conseguir reducir el contenido de fítico en piensos para animales y alimentos para consumo humano (Greiner y col., 1996; van Hartingsveldt y col., 1995; Zyla, 1980). La fitasa fue originalmente propuesta

como aditivo alimentario animal para mejorar el valor de los materiales vegetales mediante la liberación de fósforo inorgánico (Michell y col., 1997). Recientemente se considera como una forma de reducir los niveles de polución de fosfato en áreas de desarrollo ganadero intensivo. Numerosos estudios han demostrado que la adición de fitasa mejora la utilización de fosfatos procedentes del fítico, reduciéndose, drásticamente, la excreción de fósforo inorgánico (Simons y col., 1990; Cromwell y col., 1995; Jongbloed y col., 1997; Kornegay y col., 1997; Kemme y col., 1999; Waldroup, 1999; Bedford, 2000). A pesar de que el principal objetivo de la suplementación con fitasa es convertir el fósforo indigerible de la molécula del fítico en fosfatos absorbibles, la degradación de los complejos del fítico también dá lugar a cantidades sustanciales de Fe, Zn, Cu y Mn inorgánico, que ya pueden absorberse como cationes divalentes (Rimbach y Pallauf, 1993; Adeola y col., 1995; Sandberg y col., 1996; Windisch y Kirchgessner, 1996).

La actividad de la fitasa no es totalmente predecible, sin embargo, el beneficio que consigue depende de varios factores, incluyendo material crudo empleado, (cuando se emplean harinas, el tamaño de partícula obtenido tras la molienda de la semilla va a determinar la accesibilidad de la enzima al fítico (Fredrikson y col., 2001)), fuente de fitasa, edad del animal, contenido dietético de calcio, fósforo y vitamina D, así como, el nivel de actividad fitasa presente en la dieta (Bedford, 2000). Varios autores han sentenciado que cuanto mayor es el contenido de calcio en la dieta, menor es la eficacia de la fitasa (Fisher, 1992; Lei y col., 1994; Sebastian y col., 1996). El calcio no es sólo responsable de precipitar el fítico, si no también de interaccionar con sustratos solubles, reduciendo la susceptibilidad de interaccionar frente a un ataque enzimático (Sebastian y col., 1996). El empleo de quelatos, tales como citrato, que elimina el calcio de los complejos del fítico, son efectivos para aumentar la actividad de la fitasa (Zyla y col., 1996; Boling y col., 1998; Maenz y col., 1999; Qian y col., 1999). Estudios de balance en humanos indican que el incremento de los niveles de calcio dietéticos, reduce el grado de degradación de fítico (Cruickshank y col., 1945; Walker y col., 1948; Ellis y col., 1986), probablemente debido a la formación de complejos insolubles calcio-fítico. Además al reducir el contenido de calcio de la dieta obtendríamos beneficios económicos, ya que disminuiría su coste. No solo el contenido de calcio absoluto en la dieta si no su proporción con el fósforo, es lo que parece ser lo importante, ya que cuanto mayor es este porcentaje menor es la respuesta de la fitasa (Qian y col., 1997). La vitamina D interacciona en la dieta con

ambos minerales, así pues, si se eleva el contenido en vitamina D, al tiempo que reducimos los niveles de calcio, se incrementaría la utilización del fítico, incluso en ausencia de adición de fitasa (Edwards, 1992; Fisher, 1992).

Como ya hemos comentado anteriormente, el ácido fítico puede actuar como factor no nutritivo al unirse a proteínas y quelar minerales, así pues, la adición de fitasa podría mejorar el valor nutritivo de alimentos de origen vegetal mediante el aumento de la digestibilidad de la proteína y la disponibilidad de los minerales después de hidrolizar los fitatos durante la digestión en el estómago (Sandberg y col., 1996; Yi y Kornegay, 1996) o durante el procesado del alimento (Reddy y col., 1989).

La fitasa es también importante al producir determinados productos de degradación del fítico ( $IP_3$  e  $IP_4$ ) muy interesantes en estudios cinéticos y fisiológicos, comentados ya anteriormente. Después de identificar cada uno de estos productos, que inducen efectos fisiológicos positivos para la salud, la utilización de fitasa debería encontrar una aplicación en el procesado de alimentos para producir alimentos con un valor nutritivo mejorado, beneficiosos para la salud, sin alterar sus propiedades sensoriales (alimentos funcionales) (Konietzny & Greiner, 2002).

#### **2.2.7.3.1.2.1.1. Localización de la fitasa**

El ácido fítico es una de las formas más abundantes de fósforo orgánico de la naturaleza. De ahí que la capacidad de sintetizar fitasa se encuentre ampliamente distribuida entre organismos, incluyendo microorganismos (hongos y bacterias), plantas, así como, en tejidos de algunos animales (Irving, 1980; Nayini y Markakis, 1986).

##### **a) Microorganismos**

La actividad fitasa se detecta en numerosos microorganismos, la mayoría de los cuales producen solamente fitasa intracelular. La actividad fitasa extracelular prácticamente se encuentra en exclusiva en los filamentos de los hongos, siendo *Aspergillus niger* el mejor productor (Shieh & Ware, 1968; Gargova y col., 1997). Hay que tener en cuenta que en la producción de fitasas microbianas para aplicaciones alimentarias o para la fermentación con microorganismos vivos con actividad fitasa, es la fitasa extracelular la más importante, ya que se pueden extraer y purificar con mayor

facilidad que las intracelulares, y sobretodo, porque durante el procesado del alimento el substrato y la enzima deben encontrarse (Sandberg y Andlid, 2002).

Los hongos son una importante fuente de fitasas, el género más estudiado es *Aspergillus*, del cual se obtienen fitasas comerciales ampliamente utilizadas, aunque en los últimos años se ha comenzado a emplear la fitasa procedente de *Peniophora lycii*. En particular las especies *A. niger*, *A. ficuum* y *A. fumigatus* están siendo objeto de múltiples investigaciones, ya que se han clonado y mejorado sus genes mediante ingeniería genética (Wyss y col., 1999).

También se ha encontrado actividad fitasa en bacterias, tales como *Pseudomonas* sp. (Richardson & Hadobas, 1997), *Bacillus subtilis* (Powar & Jagannathan, 1982; Shimizu, 1992; Kerovuo y col., 1998), *B. amyloliquefaciens* (Kim y col., 1998a), *Klebsiella* sp. (Tambe y col., 1994; Greiner y col., 1997), *Escherichia coli* (Greiner y col., 1993) y *Enterobacter* (Yoon y col., 1996). Las únicas bacterias que poseen actividad fitasa extracelular son las que pertenecen al género *Bacillus* y *Enterobacter*.

Por otra parte, se ha estudiado en los microorganismos empleados para la fermentación de alimentos, su capacidad de degradar el fítico durante el proceso de fermentación. Algunas levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae* (Moore y col., 1995; Nakamura y col., 2000; Haraldsson y col., 2005) y *Schwanniomyces castellii* (Lambrechts y col., 1992) producen fitasa intracelular, así como, extracelular.

A través de la biotecnología se pueden obtener preparados de fitasa microbiana, disponibles comercialmente y emplearlos para la elaboración de alimentos.

#### b) Plantas

La enzima fitasa podemos encontrarla en los compartimentos de almacén dentro del grano, semilla y polen de plantas superiores, tales como, cereales, legumbres, semillas oleaginosas y frutos secos, aunque una pequeña actividad fitasa se localiza también en las raíces de las plantas. La fitasa es la enzima responsable, en granos, semillas y polen, de la degradación del ácido fítico durante la germinación para la obtención de fosfato, minerales, aminoácidos y mio-inosoles disponibles

necesarios para el crecimiento y desarrollo de la planta (Reddy y col., 1989). En un principio se suponía que la fitasa localizada en las raíces le servía a la planta a utilizar mejor el fósforo del suelo, pero diversos estudios han demostrado que esta fitasa es utilizada pobremente por la planta (Hayes y col., 2000). Sin embargo, los microorganismos del suelo, tales como, *Bacillus* sp. y *Enterobacter* podrían comportarse como factores importantes en transformar el fósforo del suelo disponible para la planta.

La mayor actividad fitasa ha sido localizada en cereales, principalmente trigo, arroz y cebada (Sandberg y Svanberg, 1991; Konietzny y col., 1995; Greiner y Konietzny, 1997), aunque también las leguminosas tienen una amplia actividad fitasa (Eskin y Johnson, 1987; Han y Gallagher, 1987; Greiner y col., 1996). En general, la actividad de la enzima fitasa en legumbres y plantas oleaginosas es 10 veces menor a la de los cereales (Konietzny & Greiner, 2002).

### C) Tejidos animales

En comparación con las investigaciones sobre la fitasa localizada en microorganismos y plantas, la dirigida a la fitasa de origen animal es muy limitada. El primer artículo relacionado con ella apareció en 1908, en el cual se detectaba la existencia de fitasa en hígado y sangre de ternera (McCullum & Hart, 1908). Sin embargo, investigaciones posteriores en mamíferos fueron infructuosas, ya que sólo se detectaron en la sangre de vertebrados, tales como pájaros, reptiles y peces (Rapoport y col., 1941).

Debido a las adversas consecuencias nutricionales de la fitasa para los animales, incluido el hombre, se ha estudiado la existencia de fitasa en el tracto gastrointestinal de varios animales. Así pues, la fitasa fue detectada en la mucosa del intestino delgado de ratas, conejos, cerdos, pollos, terneras y humanos (Bitar & Reinhold, 1971; Cooper & Gowing, 1983; Iqbal y col., 1994), aunque, debemos tener en cuenta que esta fitasa apenas juega un papel importante en la digestión del ácido fítico de la dieta en animales monogástricos (Iqbal y col., 1994). En la degradación del fítico en animales monogástricos también colabora la flora intestinal del intestino grueso.

### **2.2.7.3.1.2.1.2. Propiedades catalíticas de la fitasa**

La mayoría de las fitasas poseen un pH óptimo alrededor de 4.5 a 6.0 y una temperatura ideal que oscila de 35 a 77 °C (Tijskens y col., 2001). En concreto, las condiciones óptimas de acción de la fitasa producida por *A. niger* son pH 2.2, 5.0-5.5 y temperatura de 55-58 °C, su actividad específica a 37 °C es de 50-103 (U mg<sup>-1</sup>) (Ullah & Gibson, 1987; Simons y col., 1990; Wyss y col., 1999 a, b).

La actividad de fitasas endógenas se ha estudiado en distintas legumbres. Scott (1991) encontró que en el guisante y la judía la fitasa presentaba actividad máxima a 37 °C. Honke y col., (1999) señalaron que la actividad fitasa de guisantes, lentejas y judías se encontraba dentro del rango 37-55 °C. El valor de pH juega un papel en la actividad de la fitasa endógena de leguminosas. De acuerdo con la literatura, el pH óptimo de esta enzima se encuentra dentro del rango de 4.6 a 6.0, aunque también la neutralidad o incluso una leve alcalinidad del medio son adecuadas (Mandal y col., 1972; Han y Gallgher, 1987; Scott, 1991; Honke y col., 1999).

### **2.2.7.3.1.2.1.3. Hidrólisis del fítico a través de la fitasa**

El ácido fítico puede ser degradado por la fitasa durante el procesado del alimento o como consecuencia de su paso a través del tracto gastrointestinal.

#### **a) Hidrólisis del fítico durante el procesado**

Es conocida la correlación existente entre la rápida hidrólisis del ácido fítico y el aumento de la actividad fitasa de la semilla o grano durante la germinación. En el transcurso de este periodo el ácido fítico es hidrolizado por una o varias fitasas endógenas, liberándose fósforo inorgánico e Inositol libre, que van a satisfacer las necesidades biosintéticas de los nuevos tejidos (Lolas y Markakis, 1977; Vidal-Valverde y col., 1994). Chen y Pan (1977), así como, Honke y col. (1998) observaron como la germinación provoca una reducción del contenido en fítico y un aumento en la actividad fitasa en los guisantes.

La fermentación de cereales y leguminosas reduce apreciablemente su contenido en ácido fítico debido a la actuación de la fitasa endógena del vegetal y a la de los microorganismos utilizados. La hidrólisis dependerá de la cantidad de

microorganismos añadidos al alimento y del tiempo de fermentación (Kozłowska y col., 1996). Paradójicamente la fermentación es un proceso de mucha utilidad y ampliamente empleado en la preparación de alimentos de consumo diario en comunidades con una alta ingesta de leguminosas (Barampama y Simard, 1994).

Una alternativa a la activación de la enzima endógena del alimento es la adición de fitasa comercial durante el procesado del mismo, lo cual daría lugar a una degradación importante de los niveles de fítico (Beers y Jongbloed, 1992; Segueilha y col., 1992; Shimizu, 1994; Gustafsson y Sandberg, 1995; Marklinder y col., 1995).

Como ya hemos comentado anteriormente para optimizar el proceso y conseguir incrementar la biodisponibilidad de minerales y proteínas, mediante la degradación del fítico, es esencial conocer las condiciones de actuación óptimas para la fitasa, lógicamente existen diferencias para la actividad fitasa procedente de las distintas especies de plantas o microorganismos. Frias y col. (2003a) compararon la acción de una fitasa comercial (procedente de *A. niger*) y la fitasa endógena de harinas de guisante y lenteja y concluyeron que, en la harina de lenteja, la adición de fitasa no suponía una mayor pérdida de fítico, sin embargo, en el caso de la harina de guisante, la pérdida del contenido de IP<sub>6</sub> e IP<sub>5</sub> es superior tras la adición de fitasa comercial, en comparación a cuando solo actúa la enzima endógena.

La fitasa procedente de harina de *A. niger* 1500 PU g<sup>-1</sup> (una unidad de fitasa, PU, es la cantidad de enzima que libera bajo condiciones estándar, pH 5.0, 37 °C, 1 nmol de fósforo inorgánico procedente de la fitasa sódica durante 1 minuto) se añadió a una masa preparada con harina de trigo y se observó que la hidrólisis de fítico en la mezcla alcanzó el 88% (Türk y col., 1996).

Khare y col. (1994) observaron que tras la adición de fitasa, procedente de trigo, a leche de soja, se producía una reducción significativa de fítico, tras 8h de tratamiento a 60 °C.

Beers y Jongbloed (1992) comprobaron una mejora en el desarrollo de cerdos y en la digestibilidad aparente del fósforo tras la adición de fitasa procedente de *A. niger* en el pienso de los animales.

Varios autores han observado mejoras, aunque en distinto grado, en la

digestibilidad de los aminoácidos tras el empleo de fitasa en las raciones para cerdos (Martin y col., 1998; Namkung y Leeson, 1999; Ravindran y col., 1999).

#### b) Hidrólisis del fítico en el sistema digestivo

A la hora de discutir la degradación del fítico a lo largo del tracto gastrointestinal debemos tener en cuenta una serie de factores, por ejemplo, si existe algún efecto de la fitasa procedente de la dieta, de la mucosa intestinal o de la producida por la microflora intestinal. En concreto, la degradación del fítico en el estómago e intestino delgado de humanos se produce principalmente como resultado de la actividad de la fitasa dietética de origen vegetal o microbiano, siendo esta última la más estable de las dos en las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal. La fitasa procedente de *A. niger* tiene un pH óptimo a 2.5 y 5.5 (Simons y col., 1990), por lo que es activa principalmente en el estómago (Jongbloed y col., 1992). No debemos olvidar que la actividad fitasa de la mucosa intestinal en el hombre es baja, apenas sí participa en la degradación del fítico que tiene lugar en el intestino, cuando se consume una dieta normal. Sin embargo, sí se han encontrado evidencias de hidrólisis de fítico en el colon de cerdos, debido a la acción de la fitasa liberada por la flora intestinal presente (Lantzsch y col., 1988; Sanberg y Andlid, 2002).

Se ha sugerido que podría existir una adaptación a un aumento de degradación de fítico (Widdowson & Thrussell, 1951), potencialmente, esto podría ocurrir como consecuencia de un cambio en la secreción de la enzima o una alteración de la flora intestinal.

Simona y col. (1990) y Cromwell y col. (1995) concluyeron que la forma más eficaz de incrementar la degradación de fitatos en animales monogástricos durante la digestión era suplementando el alimento o pienso con la enzima fitasa, sobretodo cuando la dieta estaba elaborada principalmente a base de leguminosas, ya que, como hemos indicado anteriormente, las leguminosas no tiene una actividad fitasa tan elevada como los cereales.

### III. HARINAS FUNCIONALES DE GUISANTES MEDIANTE LA ADICIÓN DE FITASA COMERCIAL

Con el fin de estudiar la influencia del tratamiento enzimático con fitasa a la que se somete la harina de guisante (*Pisum sativum*), sobre la ingesta, cambios ponderales, utilización nutritiva de la proteína, hidratos de carbono y minerales, se proyectaron una serie de ensayos a realizar en ratas Wistar de ambos sexos, comenzando desde que alcanzan un peso medio de 100g, encuadrados en los diseños experimentales que se esquematizan a continuación.

#### 3.1. MATERIAL

Las características del guisante empleado son: variedad comercial Esla, perteneciente al germoplasma de Valladolid (España), peso medio de la semilla de 14,8 g (talla mediana), aspecto redondo, cotiledón amarillo y testa ligeramente verdosa (Vidal-Valverde y col., 2003), cultivados en unas condiciones edafoclimáticas controladas.

##### 3.1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizaron tres experimentos en los que se utilizó la harina de guisante crudo o sometido a distintos procesos, siguiendo la técnica de balance de Thomas-Mitchell (Mitchell, 1923). Cada lote de diez ratas se alimentó con una de las siguientes dietas ensayadas:

###### **Harina de Guisantes Crudos (GC)**

La semilla completa fue desecada con aire y posteriormente molida y tamizada a través de un tamaño de malla de 0,5 mm. Posteriormente se suplementó con 5% de aceite de oliva, para así cubrir los requerimientos lipídicos de las ratas en crecimiento (AIN, ).

Esta misma harina se empleó para la obtención del resto de dietas experimentales.

### **Harina de Guisantes sometida a Remojo Sin Adición de Fitasa (GNF)**

100 g de harina de guisante crudo se incubaron en una solución buffer 0.1 N de ácido acético/hidróxido sódico, a pH 5.5. El volumen final se enrasó hasta 1000 ml con agua destilada atemperada y se ajustó el pH a 5,5 con HCl 2N.

El experimento se realizó por duplicado en un fermentador (Infors ISF-100, Infors AG, Suiza) a 37 °C durante 60 minutos y a una velocidad de agitación de 350 rpm, siguiendo el método descrito por Frias y col. (2003). El porcentaje de harina de leguminosa:solución de remojo fue de 1:10 (w/v).

Después de la incubación, la mezcla se centrifugó a 5 °C y 10.000 rpm, durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Finalmente la harina de guisante se congeló y liofilizó, hasta peso constante, para su posterior análisis.

### **Harina de Guisantes sometida a Remojo Adicionada de Fitasa (GF)**

100 g de harina de guisante crudo se incubaron en una solución buffer 0.1 N de ácido acético/hidróxido sódico, a pH 5.5, y tratados con 160 mg de fitasa comercial “Phytase Novo L” (800 unidades de fitasa/Kg de alimento) (Fitasa procedente de *Aspergillus niger*, distribuidos por la casa Novo Nordisk). Una unidad de actividad fitasa es definida como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de fósforo inorgánico del fitato sódico por minuto a pH 5.5 y 37 °C (Urbano y col., 2003). La optimización del proceso de actuación de la enzima fitasa fue deducida por Dr. Jaime Antezana durante la elaboración de su Tesis Doctoral (Phytase, Novo Nordisk L, actividad enzimática 5000 FYT/g, 1 FYT = Liberación de 1 μmol de fosfato/minuto a pH 5.5 y 37°C).

El resto de los procesos aplicados fueron idénticos a los desarrollados para la dieta GNF.

### **3.1.2. DESARROLLO DE LOS EXPERIMENTOS:**

En cada experimento se utilizaron 10 ratas albinas (*Ratus norvegicus*) de la raza Wistar, 5 machos y 5 hembras, que procedían del Servicio de Animales del Laboratorio de la Universidad de Granada.

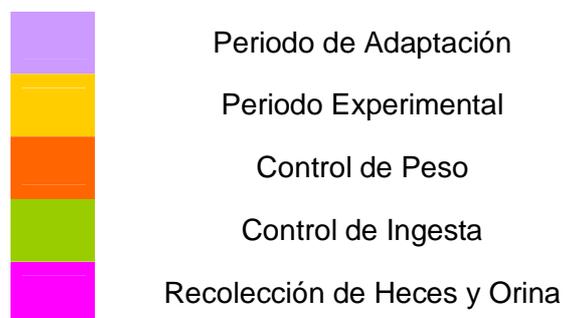
Las ratas en crecimiento (recientemente destetadas), con un peso inicial de  $111 \pm 1.6$  g, fueron alojadas, desde el día 0 del experimento, en jaulas individuales de metabolismo, de acero inoxidable, que permitían un perfecto control y separación de comida, heces y orina. A su vez estas jaulas fueron situadas en una habitación termoregulada a  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , con un sistema de ventilación conveniente y con fotoperiodo controlado de 12 horas (luz/oscuridad).

La dieta fue ingerida por los animales *ad libitum*, al igual que el agua bidestilada.

El periodo experimental fue de 10 días de duración, de los cuales los 3 primeros días corresponden al periodo de adaptación a la dieta y a las condiciones experimentales, y los 7 días siguientes constituyen el periodo principal experimental en el que se recogen por separado las heces y orina, para su posterior análisis, controlándose durante este periodo la ingesta de la dieta y el peso corporal (diagrama 1).

**Diagrama 1. Diseño de las experiencias realizadas**

DÍA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Adaptación									
				Experimental						
				Control de Peso			Control de Peso			Control de Peso
				Control de Ingesta						
				Recolección de Heces y Orina			Recolección de Heces y Orina			Recolección de Heces y Orina



Las heces homogeneizadas y desecadas, se conservaron refrigeradas en bolsas de plástico; y la orina, se recogió sobre agua bidestilada + ácido clorhídrico al 35% y se llevó a volumen conocido.

Al final del periodo experimental los animales fueron sacrificados por decapitación. Los órganos extraídos: hígado, *Longitimus Dorsi*, esternón, fémur, corazón y riñón, se congelaron para posteriormente, previa preparación de la muestra, realizar las determinaciones analíticas en cada una de las partes anatómicas seleccionadas. Al mismo tiempo se recogió la sangre de los animales, que fue conservada en frío, sin congelar, para proceder a la inmediata determinación de los parámetros sanguíneos.

Las ratas se manipularon en todo momento conforme establecen las regulaciones Europeas existentes en la actualidad en relación a los animales de laboratorio.

### **3.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS:**

Los métodos analíticos empleados fueron los siguientes:

#### **3.2.1. Humedad (materia seca)**

Se realizó por desecación en una estufa a  $105 \pm 1^\circ\text{C}$  hasta peso constante. Se determina en dieta, heces, hígado, fémur, esternón, corazón riñón, y músculo *Longissimus dorsi*.

#### **3.2.2. Nitrógeno total**

Por el método de Kjeldahl, usando como catalizador aproximadamente 5 gramos de mezcla: Sulfato potásico (100 partes), Sulfato cúprico (6 partes) y Selenio (1 parte). Se utilizó el factor 6,25 para la conversión del nitrógeno en proteína cruda. El factor de corrección para calcular el contenido en proteína es 6,25.

Se determina en dieta, heces, orina, hígado y músculo *Longissimus dorsi*.

### **3.2.3. Nitrógeno insoluble y nitrógeno soluble proteico y no proteico**

La determinación se realizó según el método descrito por Periago y col. (1996c) con ligeras modificaciones, las muestras de harina de guisantes (0.5 g) se extraen por 3 veces consecutivas con 10 ml de NaOH 0.02N durante 60 minutos a temperatura ambiente. Tras la extracción, el conjunto de los diferentes extractos y la harina de leguminosa se centrifuga a 3000 rpm durante 45 minutos. El sobrenadante se destina a la determinación de nitrógeno soluble proteico y no proteico mientras que el resto de nitrógeno que queda en la harina de leguminosa precipitada corresponde al nitrógeno insoluble. Al sobrenadante que contiene el nitrógeno soluble se le adicionan 20 ml de ácido tricloroacético (30%) y la mezcla se mantiene refrigerada a 4°C durante 15 minutos tras lo cual se centrifuga a 3000 rpm durante 45 minutos. En el sobrenadante queda el nitrógeno no proteico, mientras que precipitado queda el nitrógeno proteico. El contenido en las tres fracciones separadas se determinará por el método de Kjeldahl.

### **3.2.4. pH**

El pH de los guisantes crudos y procesados se determinó después de que 5 g de ejemplo se suspendieran en 40 mL de agua destilada empleando un medidor de pH Crison GLP22 (Crison, Barcelona, España). A continuación las muestras se titularon con 0.1 M de NaOH hasta pH 7. La acidificación titrable se expresa como miliequivalentes de NaOH por 100g de sustancia seca (S.S.).

### **3.2.5. Azúcares solubles disponibles y $\alpha$ -Galactósidos**

Los análisis de glucosa, fructosa, sacarosa y  $\alpha$ -galactósidos (rafinosa, estaquiosa y verbascosa) fueron llevados a cabo usando el método descrito por Frias y col. (1994).

### **3.2.6. Almidón total**

El contenido en almidón total y utilizable se determinan de acuerdo al método de Vidal-Valverde y col. (1998b), mediante un proceso basado en la digestión enzimática total del almidón a glucosa durante 3h y 30 min, respectivamente; El contenido en almidón se calcula multiplicando la concentración resultante de glucosa por 0,9 (Dalqvist, 1964).

### **3.2.7. Vitaminas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>**

Se lleva a cabo a través de una sola extracción para determinar ambas vitaminas de acuerdo con Vidal-Valverde y col. (1993b). Estas vitaminas fueron cuantificadas mediante HPLC como describió Vidal-Valverde y col. (1993b) y Frías y col. (1995b).

### **3.2.8. Minerales Totales (Cenizas)**

Se obtienen por calcinación de una parte de la muestra en horno a 450°C, hasta su perfecta calcinación; el residuo se diluye con solución de ácido clorhídrico 6 N y se enrasa con agua bidestilada a un volumen determinado, para posterior análisis.

### **3.2.9. Magnesio, Hierro y Cinc**

Las concentraciones de Magnesio, Hierro y Cinc de la dieta, heces, orina, fémur, esternón, corazón y riñón se determinan mediante espectrofotometría de absorción atómica, utilizando un espectrofotómetro PERKIN-ELMER 1100B (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), con llama de gas acetileno y usando una longitud de onda de 285.2 nm para Mg, 249.3 nm para Fe y 213.9 para Zn. Las muestras se diluyeron con agua bidestilada.

### **3.2.10. Fibra alimentaria**

La determinación de los componentes de la fibra alimentaria se ha conseguido a través del método establecido por Prosky y col. (1992). Las fracciones de fibra alimentaria se obtienen en forma de residuos insolubles después de la digestión enzimática de los componentes de la fibra no alimentaria: los residuos insolubles se aíslan mediante filtración, y la fibra soluble es precipitada con etanol. Los residuos secos corresponden a fibra dietética insoluble (FDI) y fibra dietética soluble (FDS). La fibra dietética total (FDT) es el resultado de la suma de FDI y FDS.

### **3.2.11. Actividad Inhibidora de la Tripsina (TIA)**

Los TIA se determinaron conforme se describe en Vidal-Valverde y col. (1993b). La actividad inhibidora de la tripsina se expresó en unidades de tripsina inhibidas por mg de muestra (TIU mg<sup>-1</sup> SS).

### 3.2.12. Inositoles fosfatos

Los inositoles hexafosfato (IP<sub>6</sub>), pentafofostato (IP<sub>5</sub>), tetrafosfato (IP<sub>4</sub>) y trifosfato (IP<sub>3</sub>) se cuantificaron por HPLC de acuerdo al método establecido por Kozłowska y col. (1996).

### 3.3. PARÁMETROS E ÍNDICES BIOLÓGICOS UTILIZADOS

- Ganancia de peso
- Ingesta de alimento
- Excreción fecal y urinaria de nitrógeno, magnesio, hierro, cinc.
- Determinación de la composición química de hígado, plasma, fémur y y músculo *Longissimus dorsi*.

Los diferentes índices biológicos utilizados se calcularon de la siguiente forma:

\* **Absorción Aparente:** Es la cantidad ingerida menos la cantidad eliminada en heces.

$$A = ( I - F )$$

\* **Coefficiente de Digestibilidad Aparente (CDA):** Es la relación porcentual entre la cantidad absorbida de la ingerida, sin tener en cuenta las pérdidas endógenas.

$$CDA = [ ( I - F ) / I ] \times 100$$

\* **Balance o Retención de Corporal:** Se determina por diferencia entre el absorbido y el urinario.

$$\text{Balance} = I - ( F + U )$$

\* **Utilización metabólica o % Retenido/Absorbido:** Expresa el tanto por ciento de la cantidad retenida de la absorbida. La cantidad retenida se determina por diferencia entre la cantidad absorbida y la excretada por orina.

$$R/A = [ I - ( F + U ) / ( I - F ) ] \times 100$$

Las siglas utilizadas en estas fórmulas, son las indicadas por la FAO/OMS (1966):

I: Ingerido.

F: Excreción Fecal.

U: Excreción Urinaria.

\* **Índice de Coeficiente de Eficacia en Crecimiento (C.E.C.):** Expresa la ganancia en peso de los animales en gramos (incremento de peso por gramo/rata/día), por gramos de proteína ingerida durante los 7 días de la experiencia.

$$\text{C.E.C.} = \frac{\text{Ganancia de peso}}{\text{g proteína ingeridos}}$$

\* **Índice de Transformación de Sustancia Seca (I.T.S.S.):** Expresa la cantidad de alimento ingerido en relación a la ganancia de peso.

$$\text{I.T.S.S.} = \frac{\text{Alimento ingerido (g)}}{\text{Ganancia de peso (g/rata/día)}}$$

\* **Índice de Carbohidratos Utilizables (I.C.U.):** Expresa la ganancia de peso de los animales en gramos, por gramos de hidratos de carbono utilizables ingeridos

$$\text{I.C.U.} = \frac{\text{Ganancia de peso (g/rata/día)}}{\text{Ingesta de carbohidratos utilizables (g /día)}}$$

### 3.4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los datos se sometieron a un análisis multifactorial de la varianza. Se ha calculado el valor medio (MEDIA) y el error estandar (EEM) de la media para cada parámetro estudiado, utilizando el programa estadístico Statgraphics Statistical Graphics 5.0 Systems Software (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, USA). Posteriormente al Análisis de la Varianza (si este era significativo) se estudió el grado de significación de las diferencias entre los parámetros e índices utilizados mediante test de Durcan para  $P \leq 0.05$ .

## IV. RESULTADOS

### 4.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS DIETAS ENSAYADAS

#### 4.1.1. ANÁLISIS QUÍMICOS:

El contenido de nutrientes y factores no nutritivo de la harina de guisante crudo y de la obtenida después del remojo a 37 °C y pH 5,5 con o sin la adición de la enzima fitasa comercial “Phytase Novo L” se describe en las Tablas 14 a 18. Cuando la enzima no se añadió, sólo la fitasa endógena podría actuar durante el remojo.

**Tabla 14. Efecto de la adición de fitasa comercial en el contenido en nitrógeno: total, insoluble, soluble proteico y soluble no proteico de *Pisum sativum* L. var. *esla***

	Harina de Guisante Cruda (GC)	Harina de Guisante Control No adicionada de Fitasa (GNF)	Harina de Guisante adicionada de Fitasa (GF)
<b>Nitrógeno (g/100g s.s.)</b>			
<b>Nitrógeno total</b>	4.44±0.05 <sup>b</sup>	4.18±0.04 <sup>a</sup>	4.12±0.05 <sup>a</sup>
<b>Nitrógeno Insoluble</b>	0.48±0.01 <sup>a</sup>	0.42±0.02 <sup>a</sup>	0.43±0.01 <sup>a</sup>
<b>Nitrógeno Soluble Proteico</b>	3.30±0.02 <sup>b</sup>	3.39±0.03 <sup>b</sup>	3.03±0.03 <sup>a</sup>
<b>Nitrógeno Soluble No Proteico</b>	0.66±0.02 <sup>b</sup>	0.37±0.03 <sup>a</sup>	0.57±0.03 <sup>b</sup>
<b>pH</b>	6.5	5.6	5.7

Los valores representados en la tabla son medias de tres determinaciones (Urbano y col., 2003). El Error Estándar de la Media varió entre ±0.01 y ±0.1% del valor de la media. Los resultados están referidos a gramos de sustancia seca. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (P<0.05).

GC: Dieta de Harina de Guisante Crudo + 4% Aceite de Oliva.

GNF: Dieta de Harina de Guisante Control No adicionada de Fitasa + 4% Aceite de Oliva.

GF: Dieta de Harina de Guisante Control adicionada de Fitasa + 4% Aceite de Oliva.

El contenido de nitrógeno, reflejado en la tabla 14, disminuye significativamente a consecuencia del tratamiento realizado. El porcentaje de descenso es del 6% en el grupo control sin adición de fitasa y la pérdida es debida fundamentalmente al nitrógeno soluble no proteico. En la dieta adicionada de fitasa el descenso es del 7% y la pérdida es debida fundamentalmente al nitrógeno soluble proteico.

**Tabla 15. Efecto de la adición de fitasa comercial en el contenido en Azúcares solubles utilizables, Almidón, Azúcares Utilizables Totales y Vitaminas de *Pisum sativum* L. var. *esla***

	Harina de Guisante Cruda (GC)	Harina de Guisante Control No adicionada de Fitasa (GNF)	Harina de Guisante adicionada de Fitasa (GF)
<b>Azúcares solubles utilizables (g/100g)</b>			
Fructosa	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	0.08±0.01 <sup>b</sup>
Glucosa	ND <sup>a</sup>	0.06±0.01 <sup>b</sup>	0.16±0.01 <sup>c</sup>
Galactosa	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	0.12±0.01 <sup>b</sup>
Sacarosa	1.73±0.14 <sup>c</sup>	0.32±0.01 <sup>a</sup>	0.38±0.02 <sup>b</sup>
Azúcares Solubles Utilizables Totales	1.73±0.14 <sup>c</sup>	0.38±0.01 <sup>a</sup>	0.74±0.03 <sup>b</sup>
<b>Almidón (g/100g)</b>			
Almidón Total	42.65±0.58 <sup>a</sup>	48.73±0.91 <sup>b</sup>	48.09±0.10 <sup>b</sup>
Almidón Utilizable	38.70±1.21 <sup>a</sup>	45.21±0.60 <sup>b</sup>	44.11±0.66 <sup>b</sup>
Almidón Resistente	3.95±0.65 <sup>a</sup>	3.53±0.30 <sup>a</sup>	3.98±0.57 <sup>a</sup>
<b>Azúcares Utilizables Totales (g/100g)</b>	40.43±0.36 <sup>a</sup>	45.58±0.31 <sup>c</sup>	44.85±0.35 <sup>b</sup>
<b>Vitaminas (mg/100g)</b>			
Vitamina B1	0.729±0.013 <sup>b</sup>	0.217±0.004 <sup>a</sup>	0.216±0.003 <sup>a</sup>
Vitamina B2	0.146±0.007 <sup>b</sup>	0.088±0.002 <sup>a</sup>	0.090±0.005 <sup>a</sup>

Los valores representados en la tabla son medias de tres determinaciones y han sido publicados por Urbano y col. (2003). El Error Estándar de la Media varió entre ±0.01 y ±0.1% del valor de la media. Los resultados están referidos a gramos de sustancia seca. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (P<0.05).

El pH de las dietas tratadas desciende significativamente de 6.5 en guisante crudo a 5.6 en la dieta control sin adición de fitasa y 5.7 en guisantes adicionados de fitasa. Produciéndose el consiguiente aumento en la capacidad tamponadora de las dietas (acidez titulable) de 3.4 meq NaOH/100g S.S. en la harina de guisante crudo a 9.54 y 9.40 meq NaOH/100g S.S. en las dietas control sin fitasa y guisante tratado con fitasa respectivamente.

Se observaron reducciones significativas en el contenido en vitaminas B<sub>1</sub> (40%) y B<sub>2</sub> (70%) en los guisantes procesados, con respecto a los guisantes crudos, sin existir diferencias significativas entre estos dos grupos (Tabla 15).

**Tabla 16. Efecto de la adición de fitasa comercial en el contenido en cenizas, Magnesio, Cinc, Hierro y Fósforo Total de *Pisum sativum* L. var. *esla***

	Harina de Guisante Cruda (GC)	Harina de Guisante Control No adicionada de Fitasa (GNF)	Harina de Guisante adicionada de Fitasa (GF)
<b>Cenizas (g/100g)</b>	3.01±0.21 <sup>b</sup>	1.36±0.16 <sup>a</sup>	1.34±0.09 <sup>a</sup>
<b>Magnesio (mg/100g)</b>	133.64±5.09 <sup>c</sup>	77.52±3.52 <sup>b</sup>	40.94±1.28 <sup>a</sup>
<b>Cinc (mg/100g)</b>	8.38±0.31 <sup>c</sup>	3.28±0.14 <sup>b</sup>	2.16±0.21 <sup>a</sup>
<b>Hierro (mg/100g)</b>	6.39±0.08 <sup>c</sup>	4.28±0.07 <sup>a</sup>	5.94±0.10 <sup>b</sup>
<b>Fósforo Total (mg/100g)</b>	311.49±5.54 <sup>c</sup>	151.51±3.61 <sup>a</sup>	200.78±2.35 <sup>b</sup>

Los valores representados en la tabla son medias de tres determinaciones. El Error Estándar de la Media varió entre ±0.01 y ±0.1% del valor de la media. Los resultados están referidos a gramos de sustancia seca. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (P<0.05).

El contenido en minerales totales en la harina de guisante cruda fue 3 g/100g S.S., el contenido en Magnesio 133.64, en Hierro 6.39 y en Cinc 8.38, expresados en mg/100 g s.s. (Tabla 16). El remojo, con o sin adición de la enzima fitasa, redujo drásticamente el contenido en minerales totales en las distintas harinas de guisante ensayadas en relación a la harina de guisante crudo, siendo esta reducción de un 55 y 56% para GNF y GF, respectivamente. Después de 60 minutos de remojo con o sin adición de la enzima fitasa, se observa una reducción significativa en el contenido de Mg (42-69%) y Zn (61-74%.) siendo esta pérdida más pronunciada en la harina

adicionada de fitasa (GF). En el caso del hierro las pérdidas provocadas durante el procesado (33-7%) son significativas en relación al contenido en este mineral del guisante crudo; siendo esta disminución más acentuada en la dieta control a la que no se le adicionó la enzima fitasa (GNF). El contenido de Fósforo Total se redujo drásticamente durante el procesado, siendo esta pérdida más significativa en la harina de guisante sin adición de fitasa (51.4 y 35.5% en GNF y GF) en relación a la harina de guisante cruda. En relación al contenido en las dietas de fósforo procedente de inositoles fosfato se observa una reducción significativa en las dos dietas procesadas, con o sin adición de enzima, sin que existan diferencias significativas entre ellas (45.8 y 59.3% en GNF y GF), en comparación con la harina de guisante cruda.

**Tabla 17. Efecto de la adición de fitasa comercial en el contenido en fibra total, fibra soluble y fibra insoluble de *Pisum sativum* L. var. *esla***

	Harina de Guisante Cruda (GC)	Harina de Guisante Control No adicionada de Fitasa (GNF)	Harina de Guisante adicionada de Fitasa (GF)
<b>Fibra Total (g/100g)</b>	20.50±0.32 <sup>b</sup>	18.35±0.36 <sup>a</sup>	19.32±0.37 <sup>a</sup>
<b>Fibra Soluble (g/100g)</b>	3.85±0.16 <sup>b</sup>	0.56±0.12 <sup>a</sup>	0.65±0.05 <sup>a</sup>
<b>Fibra Insoluble (g/100g)</b>	16.65±0.26 <sup>a</sup>	17.88±0.32 <sup>a</sup>	18.91±0.25 <sup>a</sup>

Los valores representados en la tabla han sido determinados por Vidal-Valverde y col. El Error Estándar de la Media varió entre  $\pm 0.01$  y  $\pm 0.1\%$  del valor de la media. Los resultados están referidos a gramos de sustancia seca. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

El efecto de la fitasa endógena y de la fitasa comercial en el contenido en fibra total, fibra soluble y fibra insoluble se detalla en la tabla 17. El tratamiento de remojo en la harina de guisante sin adición de enzima (GNF) reduce significativamente el contenido en Fibra Total en un 10.5%, debido a la pérdida de Fibra Soluble (85.5%), en relación a la harina de guisante crudo. Por otro lado el contenido en Fibra Total en la dieta procesada adicionada de fitasa (GF) se reduce ligeramente en un 5.8%, debido principalmente al descenso en Fibra Soluble, que disminuye en un 83.1%, en relación a la harina de guisante crudo.

**Tabla 18. Efecto de la adición de fitasa comercial en el contenido en factores no nutritivos: Alfa-galactósidos, Inhibidores de la Tripsina e Inositoles Fosfato de *Pisum sativum* L. var. *esla***

	Harina de Guisante Cruda (GC)	Harina de Guisante Control No adicionada de Fitasa (GNF)	Harina de Guisante adicionada de Fitasa (GF)
<b>Alfa-galactósidos (g/100g s.s.)</b>			
Rafinosa	0.56±0.03 <sup>b</sup>	0.15±0.01 <sup>a</sup>	0.12±0.01 <sup>a</sup>
Estaquiosa	2.24±0.06 <sup>b</sup>	0.45±0.01 <sup>a</sup>	0.43±0.01 <sup>a</sup>
Verbascosa	2.39±0.10 <sup>b</sup>	0.26±0.01 <sup>a</sup>	0.27±0.01 <sup>a</sup>
Alfa-galactosidos Totales	5.19±0.13 <sup>b</sup>	0.86±0.01 <sup>a</sup>	0.82±0.02 <sup>a</sup>
<b>Actividad inhibidora de la tripsina (TIU/mg s.s.)</b>	8.69±0.01 <sup>b</sup>	2.45±0.10 <sup>a</sup>	2.19±0.03 <sup>a</sup>
<b>Inositol hexafostato (IP<sub>6</sub>) (mg/100g)</b>	339.3±0.06 <sup>c</sup>	75.3±0.01 <sup>b</sup>	24.6±0.01 <sup>a</sup>
<b>Inositol pentafostato (IP<sub>5</sub>) (mg/100g)</b>	40.1±0.02 <sup>a</sup>	69.3±0.01 <sup>b</sup>	41.3±0.03 <sup>a</sup>
<b>Inositol tetrafostato (IP<sub>4</sub>) (mg/100g)</b>	ND	72.6±0.01 <sup>b</sup>	51.3±0.03 <sup>a</sup>
<b>Inositol trifostato (IP<sub>3</sub>) (mg/100g)</b>	ND	ND	57.0±0.02
<b>Fósforo total (mg/100g)</b>	311.49±5.54 <sup>c</sup>	151.51±3.61 <sup>a</sup>	200.78±2.35 <sup>b</sup>
<b>Fósforo Inositoles Fosfato (mg/100g)</b>	107.9±1.03 <sup>b</sup>	58.5±0.15 <sup>a</sup>	43.9±0.11 <sup>a</sup>

Los resultados de Rafinosa, Estaquiosa, Verbascosa y TIA (n=3, media ± EEM) han sido publicados por Urbano y col. (2003). Los resultados de Inositol hexafostato (IP<sub>6</sub>), Inositol Pentafostato (IP<sub>5</sub>), Inositol Tetrafostato (IP<sub>4</sub>) e Inositol Trifostato (IP<sub>3</sub>) (n=4, media ± DS) han sido publicados por Frías y col. (2003a). El Error Estándar de la Media varió entre ±0.01 y ±0.1% del valor de la media. Los resultados están referidos a gramos de sustancia seca. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (P<0.05).

El contenido en α-galactósidos decayó alrededor de un 83-84% en las dietas procesadas, en relación a los guisantes crudos, sin existir diferencias significativas entre ellas (Tabla 18). Los niveles de TIA descendieron bruscamente desde un nivel de 8.7 en guisantes crudos hasta 2.2 y 2.45 cuando la harina de guisante fue sometida al remojo, con o sin adición de la enzima fitasa (GF y GNF), respectivamente, sin

existir diferencias significativas entre estas últimas (Tabla 18).

El efecto de la fitasa endógena y de la fitasa comercial en el contenido de las distintas fracciones de fítico se describe en la tabla 18. El contenido en Inositol hexafostato ( $IP_6$ ) de la harina de guisante se redujo drásticamente en un 78% después del remojo (GNF), esta reducción fue más significativa (93%) cuando se adicionó la enzima fitasa (GF). En relación a los niveles de  $IP_5$ , se observa que en la dieta sometida al remojo, sin adición de enzima, aumenta significativamente (72.5%), sin embargo, en la dieta procesada adicionada de fitasa (GF) los niveles de  $IP_5$  son similares a los que contiene la dieta de guisante crudo (GC). El contenido en  $IP_4$  comienza a ser detectado cuando se somete la harina de guisante al procesado, alcanzando niveles más elevados en la dieta GNF que en GF. El contenido en  $IP_3$  sólo se detecta en la dieta sometida al tratamiento adicionada de fitasa (GF).

#### **4.1.2. ANÁLISIS BIOLÓGICOS:**

##### **4.1.2.1. INGESTA DE NUTRIENTES Y FACTORES NO NUTRITIVOS**

La ingesta de alimento, expresada en gramos/rata/día o por gramos/100 g de peso de rata/día (Tabla 19), fue similar en todos los grupos de animales investigados, no existiendo diferencias significativas que fueran provocadas por el tratamiento al que se somete la harina de guisantes. Estos resultados, junto con los comentados sobre la composición química de las dietas son los responsables de las modificaciones encontradas en la ingesta de distintos nutrientes.

La ingesta de proteínas fue similar entre los animales que consumieron la dieta de guisante crudo (GC) que en los que consumieron la dieta control de guisantes sin adición de fitasa (GNF) o con adición de fitasa (GF) (Tabla 19).

La ingesta de azúcares solubles utilizables fue significativamente inferior en los animales alimentados con las dietas procesadas de guisantes (GNF y GF) (Tabla 20). Sin embargo, la ingesta de almidón utilizable y azúcares totales utilizables fue significativamente superior entre los animales que consumieron las dietas procesadas (GNF y GF), sin existir diferencias significativas entre ambas (Tabla 20).

**Tabla 19. Efecto de la adición a *Pisum sativum* L. var. *esla* de fitasa comercial en la ingesta de alimento e ingesta de proteína (rata/día)**

	Harina de Guisante Cruda (GC)	Harina de Guisante Control No adicionada de Fitasa (GNF)	Harina de Guisante adicionada de Fitasa (GF)
<b>Ingesta (g)</b>	10.72±0.20 <sup>a</sup>	11.20±0.29 <sup>a</sup>	11.25±0.41 <sup>a</sup>
<b>Ingesta (g/100g rata/día)</b>	9.08±0.24 <sup>a</sup>	9.53±0.27 <sup>a</sup>	9.20±0.27 <sup>a</sup>
<b>Proteína (g) (N<sub>2</sub> × 6.25)</b>	2.97±0.06 <sup>a</sup>	2.92±0.08 <sup>a</sup>	2.90±0.11 <sup>a</sup>

Los valores representados en la tabla son medias de diez determinaciones (n=10 media ± EEM) en los grupos GC y GNF, y de ocho determinaciones (n=8 media ± EEM) en el grupo GF. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (P<0.05).

**Tabla 20. Efecto de la adición a *Pisum sativum* L. var. *esla* de fitasa comercial en la ingesta de Azúcares solubles utilizables, Almidón, Azúcares Utilizables Totales y Vitaminas (rata/día)**

	Harina de Guisante Cruda (GC)	Harina de Guisante Control No adicionada de Fitasa (GNF)	Harina de Guisante adicionada de Fitasa (GF)
<b>Azúcares solubles utilizables (g)</b>	0.19±0.004 <sup>c</sup>	0.04±0.00 <sup>a</sup>	0.08±0.00 <sup>b</sup>
<b>Almidón total (g)</b>	4.57±0.09 <sup>a</sup>	5.46±0.15 <sup>b</sup>	5.41±0.17 <sup>b</sup>
<b>Almidón resistente (g)</b>	0.42±0.01 <sup>ab</sup>	0.40±0.01 <sup>a</sup>	0.45±0.01 <sup>b</sup>
<b>Almidón utilizable (g)</b>	4.15±0.08 <sup>a</sup>	5.06±0.14 <sup>b</sup>	4.96±0.16 <sup>b</sup>
<b>Azúcares totales utilizables (g)</b>	4.33±0.09 <sup>a</sup>	5.10±0.14 <sup>b</sup>	5.05±0.20 <sup>b</sup>
<b>Vitamina B<sub>1</sub> (mg)</b>	0.078±0.002 <sup>b</sup>	0.024±0.001 <sup>a</sup>	0.024±0.001 <sup>a</sup>
<b>Vitamina B<sub>2</sub> (mg)</b>	0.016±0.000 <sup>a</sup>	0.010±0.000 <sup>b</sup>	0.010±0.000 <sup>b</sup>

Los valores representados en la tabla son medias de diez determinaciones (n=10 media ± EEM) en los grupos GC y GNF, y de ocho determinaciones (n=8 media ± EEM) en el grupo GF. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (P<0.05).

La cantidad de Fibra Total ingerida fue similar en todos los grupos de dietas ensayados, conforme se describe en la tabla 21.

La cantidad de Fibra Soluble ingerida fue significativamente superior en los animales alimentados con GC, en relación con los otros dos grupos de animales, sin que existan diferencias significativas entre ellos (GF y GNF).

Las ratas que consumieron guisantes sometidos a remojo y adicionados de fitasa fueron las que mas cantidad de Fibra Insoluble ingirieron, en comparación con las que se alimentaron de GC y GNF, sin que existan diferencias significativas entre estos dos grupos de animales.

**Tabla 21. Efecto de la adición a *Pisum sativum* L. var. *esla* de fitasa comercial en la ingesta de Fibra Total, Fibra Soluble y Fibra Insoluble (rata/día)**

	Harina de Guisante Cruda (GC)	Harina de Guisante Control No adicionada de Fitasa (GNF)	Harina de Guisante adicionada de Fitasa (GF)
<b>Fibra Total (g)</b>	2.20±0.04 <sup>a</sup>	2.05±0.05 <sup>a</sup>	2.17±0.08 <sup>a</sup>
<b>Fibra Soluble (g)</b>	0.20±0.004 <sup>b</sup>	0.05±0.01 <sup>a</sup>	0.07±0.003 <sup>a</sup>
<b>Fibra Insoluble (g)</b>	1.98±0.04 <sup>a</sup>	2.00±0.05 <sup>a</sup>	2.13±0.08 <sup>b</sup>

Los valores representados en la tabla son medias de diez determinaciones (n=10 media ± EEM) en los grupos GC y GNF, y de ocho determinaciones (n=8 media ± EEM) en el grupo GF. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (P<0.05).

La ingesta de α-galactósidos e inhibidores de tripsina se detalla en la tabla 22. Ambas ingestas fueron significativamente superiores en los animales que recibieron la dieta de guisante crudo (GC) que en los que consumieron las dietas GNF y GF, sin existir diferencias significativas entre estos dos últimos grupos.

**Tabla 22. Efecto de la adición a *Pisum sativum* L. var. *esla* de fitasa comercial en la ingesta de factores no nutritivos (rata/día)**

	Harina de Guisante Cruda (GC)	Harina de Guisante Control No adicionada de Fitasa (GNF)	Harina de Guisante adicionada de Fitasa (GF)
<b><math>\alpha</math>-galactósidos totales (g)</b>	0.56±0.01 <sup>b</sup>	0.01±0.003 <sup>a</sup>	0.09±0.002 <sup>a</sup>
<b>Inhibidor de Tripsina (TIU)</b>	93148±1775 <sup>b</sup>	27427±717 <sup>a</sup>	24637±901 <sup>a</sup>
<b>IP6 (mg/g)</b>	36,36±0,69 <sup>c</sup>	8,40±0,22 <sup>b</sup>	2,70±0,10 <sup>a</sup>
<b>IP5 (mg/g)</b>	4,29±0,08 <sup>a</sup>	7,72±0,20 <sup>b</sup>	4,61±0,17 <sup>a</sup>
<b>IP4 (mg/g)</b>	ND	8,06±0,21 <sup>b</sup>	5,74±0,21 <sup>a</sup>
<b>IP3 (mg/g)</b>	ND	ND	6,41±0,23

Los valores representados en la tabla son medias de diez determinaciones (n=10 media ± EEM) en los grupos GC y GNF, y de ocho determinaciones (n=8 media ± EEM) en el grupo GF. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (P<0.05).

La ingesta de las distintas fracciones de ácido fítico se refleja en la tabla 22. La ingesta de IP<sub>6</sub> se redujo drásticamente como consecuencia del remojo y fue significativamente más baja en el grupo que consumió los guisantes con fitasa (GF) que en el resto de los grupos (GC y GNF). Los animales que se alimentaron de GNF ingirieron más cantidad de IP<sub>5</sub> que el resto de los animales (GC y GF), que consumieron cantidades similares. Con respecto a la ingesta de IP<sub>4</sub>, esta es superior en los animales que consumieron GNF que en los que se alimentaron de GF, siendo nula en los que ingirieron GC. Solamente los animales que se alimentaron de la dieta sometida al remojo y adicionada de fitasa ingirieron IP<sub>3</sub>.

La tabla 23 muestra los valores de Incremento de Peso y los Coeficientes de Utilización Nutritiva de la Proteína, de la Dieta y de los Hidratos de Carbono en las distintas dietas ensayadas. El incremento de peso, expresado en gramos/rata/día, y el Coeficiente de Eficacia en Crecimiento (C.E.C.) fueron significativamente superiores en los animales que consumieron la dieta control sin adición de fitasa (GNF) que en

aquellos que recibieron las dietas GC y GF, no existiendo diferencias significativas entre estos últimos. Un comportamiento similar fue encontrado en el índice de transformación del alimento (I.T.S.S.), donde los valores fueron reduciéndose en los animales del grupo control, sin adición de fitasa.

**Tabla 23. Efecto de la adición a *Pisum sativum* L. var. *esla* de fitasa comercial en el Incremento de Peso y Coeficientes de Utilización Nutritiva de la Dieta, de la Proteína, de los Hidratos de Carbono y Peso de las Heces**

	Harina de Guisante Cruda (GC)	Harina de Guisante Control No adicionada de Fitasa (GNF)	Harina de Guisante adicionada de Fitasa (GF)
<b>Δ peso (g/rata/día)</b>	1.90±0.11 <sup>a</sup>	3.22±0.24 <sup>b</sup>	1.99±0.38 <sup>a</sup>
<b>C.E.C.</b>	0.64±0.03 <sup>a</sup>	1.10±0.06 <sup>b</sup>	0.66±0.11 <sup>a</sup>
<b>I.T.S.S.</b>	5.79±0.28 <sup>b</sup>	3.61±0.20 <sup>a</sup>	7.14±1.20 <sup>b</sup>
<b>I.C.U.</b>	0.44±0.02 <sup>a</sup>	0.63±0.05 <sup>b</sup>	0.46±0.09 <sup>a</sup>
<b>Peso Heces (g)</b>	13.09±0.76 <sup>a</sup>	13.09±0.86 <sup>a</sup>	14.51±0.72 <sup>a</sup>

Los valores representados en la tabla son medias de diez determinaciones (n=10 media ± EEM) en los grupos GC y GNF, y de ocho determinaciones (n=8 media ± EEM) en el grupo GF. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (P<0.05).

El índice de eficacia alimentaria de los hidratos de carbono disponibles (I.C.U) se encuentra significativamente aumentado en los animales que consumen harina de guisante procesada sin adición de fitasa (GNF) en relación a la harina de guisante cruda y guisantes procesados adicionados de fitasa, sin existir diferencias significativas entre estos últimos. En relación al peso de las heces podemos comprobar cómo todos los animales excretan cantidades similares, sin que existan diferencias significativas entre ellos (GC, GNF y GF).

#### 4.1.2.2. UTILIZACIÓN DIGESTIVA Y METABÓLICA DE NITRÓGENO

La utilización digestiva y metabólica del nitrógeno se describe en la Tabla 24. La ingesta de nitrógeno fue similar en todos los grupos de dietas ensayadas, sin existir diferencias significativas entre ellos. La excreción fecal de nitrógeno fue significativamente superior en las ratas alimentadas con los guisantes crudos (GC) que en las que consumieron los guisantes procesados (GNF y GF), no existiendo diferencias significativas entre estas dos últimas dietas. La excreción urinaria de nitrógeno fue similar entre todas las dietas ensayadas.

**Tabla 24. Efecto de la adición a *Pisum sativum* L. var. esla de fitasa comercial en la Utilización Digestiva y Metabólica de Nitrógeno en ratas**

	Harina de Guisante Cruda (GC)	Harina de Guisante Control No adicionada de Fitasa (GNF)	Harina de Guisante adicionada de Fitasa (GF)
<b>N Ingerido (mg/d)</b>	476±9.07 <sup>a</sup>	468±12.23 <sup>a</sup>	466±17.04 <sup>a</sup>
<b>N fecal (mg/d)</b>	78.2±3.32 <sup>b</sup>	61.3±3.40 <sup>a</sup>	63.1±1.74 <sup>a</sup>
<b>N urinario (mg/d)</b>	239±9.50 <sup>a</sup>	215±9.52 <sup>a</sup>	241±8.27 <sup>a</sup>
<b>N Absorbido (mg/d)</b>	398±9.65 <sup>a</sup>	406±12.60 <sup>a</sup>	403±16.31 <sup>a</sup>
<b>CDA (%)</b>	83.5±0.78 <sup>a</sup>	86.8±0.78 <sup>b</sup>	86.4±0.44 <sup>b</sup>
<b>Balance (mg/d)</b>	159±9.23 <sup>a</sup>	191±9.27 <sup>b</sup>	161±15.10 <sup>a</sup>
<b>R/A (%)</b>	39.9±2.02 <sup>a</sup>	46.93±1.77 <sup>b</sup>	39.6±2.60 <sup>a</sup>

Los valores representados en la tabla son medias de diez determinaciones (n=10 media ± EEM) en los grupos GC y GNF, y de ocho determinaciones (n=8 media ± EEM) en el grupo GF. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (P<0.05).

La utilización digestiva del nitrógeno, calculada a través del Coeficiente de Digestibilidad Aparente (CDA), fue significativamente mas elevada en las dietas GNF y GF que en la dieta de guisantes crudos, y los valores son análogos como consecuencia del tratamiento.

El balance de nitrógeno y el %R/A fueron significativamente superiores en la dieta control sin adición de fitasa (GNF) que en la dieta con guisante crudo (GC), no existiendo diferencias significativas entre las dietas GC y GF.

El contenido de agua y nitrógeno presente en el hígado y el músculo *Longissimus dorsi* de las ratas alimentadas con las dietas de guisante crudo o procesados se describe la tabla 25. El hígado de los animales que consumieron la dieta control sin adición de fitasa (GNF) contiene más cantidad de agua que el de los animales que recibieron las dietas de guisante crudo (GC) y guisante adicionado de fitasa (GF); así mismo, en los animales alimentados con GF el contenido en nitrógeno es superior al de los otros dos grupos (GC y GNF). Los contenidos de agua y nitrógeno en el músculo *Longissimus dorsi* fue similar en todos los animales estudiados.

**Tabla 25. Efecto de la adición a *Pisum sativum* L. var. *esla* de fitasa comercial en la composición del Hígado y Músculo *Longissimus Dorsi* en ratas**

	Harina de Guisante Cruda (GC)	Harina de Guisante Control No adicionada de Fitasa (GNF)	Harina de Guisante adicionada de Fitasa (GF)
<b>Hígado</b>			
% agua	70.77±0.19 <sup>a</sup>	71.16±0.25 <sup>b</sup>	70.45±0.18 <sup>a</sup>
Nitrógeno (% s.s.)	11.67±0.13 <sup>a</sup>	11.63±0.15 <sup>a</sup>	12.04±0.08 <sup>b</sup>
<b>Músculo <i>Longissimus Dorsi</i></b>			
% agua	73.31±0.17 <sup>a</sup>	73.24±0.37 <sup>a</sup>	74.10±0.27 <sup>a</sup>
Nitrógeno (% s.s.)	14.69±0.18 <sup>a</sup>	14.49±0.18 <sup>a</sup>	14.71±0.08 <sup>a</sup>

Los valores representados en la tabla son medias de diez determinaciones (n=10 media ± EEM) en los grupos GC y GNF, y de ocho determinaciones (n=8 media ± EEM) en el grupo GF. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (P<0.05).

#### 4.1.2.3. UTILIZACIÓN DIGESTIVA Y METABÓLICA DE MAGNESIO

La cantidad de Mg ingerido fue significativamente superior en los animales alimentados con la harina de guisante crudo (GC), seguida de aquellos que consumieron dieta control de guisante sin adición de fitasa (GNF), siendo la menor en los que ingirieron harina de guisante con fitasa (GF) (Tabla 26). Esta misma relación se observa en la excreción fecal y urinaria, así como en la absorción neta de este mineral, ya que en todos los casos las ratas que consumen la dieta de guisante crudo excretan y absorben más cantidad de Mg que las que se alimentan de la dieta procesada sin adición de enzima fitasa (GNF) y aún más que las que ingieren la dieta procesada adicionada de fitasa (GF).

**Tabla 26. Efecto de la adición a *Pisum sativum* L. var. *esla* de fitasa comercial en la Utilización Digestiva y Metabólica de Magnesio en ratas**

	Harina de Guisante Cruda (GC)	Harina de Guisante Control No adicionada de Fitasa (GNF)	Harina de Guisante adicionada de Fitasa (GF)
<b>Mg ingerido (mg/día)</b>	13.7±0.30 <sup>c</sup>	8.9±0.23 <sup>b</sup>	5.5±0.27 <sup>a</sup>
<b>Mg fecal (mg/día)</b>	7.9±0.40 <sup>c</sup>	4.5±0.35 <sup>b</sup>	2.8±0.26 <sup>a</sup>
<b>Mg urinario (mg/día)</b>	3.8±0.27 <sup>c</sup>	2.1±0.24 <sup>b</sup>	1.0±0.16 <sup>a</sup>
<b>Mg absorbido (mg/día)</b>	5.9±0.50 <sup>c</sup>	4.2±0.36 <sup>b</sup>	2.5±0.23 <sup>a</sup>
<b>CDA (%)</b>	43.6±2.30 <sup>a</sup>	48.0±3.87 <sup>a</sup>	43.9±2.60 <sup>a</sup>
<b>Balance (mg/día)</b>	2.50±0.22 <sup>b</sup>	1.90±0.30 <sup>b</sup>	1.15±0.20 <sup>a</sup>
<b>R/A (%)</b>	37.2±1.50 <sup>a</sup>	42.2±5.30 <sup>b</sup>	47.9±6.10 <sup>b</sup>

Los valores representados en la tabla son medias de diez determinaciones (n=10 media ± EEM) en los grupos GC y GNF, y de ocho determinaciones (n=8 media ± EEM) en el grupo GF. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (P<0.05).

La utilización digestiva de Mg, calculado a través del CDA, fue similar en los tres grupos de animales ensayados. El balance de este mineral fue superior en los animales que consumieron harina de guisante cruda (GC) y harina de guisante procesada sin adición de la enzima (GNF) que en los que se alimentaron de la dieta procesada adicionada de fitasa (GF), sin encontrar diferencias significativas entre los dos primeros grupos. El %R/A fue superior en los animales que consumieron las dietas procesadas (GNF y GF) en relación a los que se alimentaron de guisantes crudos (GC).

**Tabl(a 27. Efecto de la adición a *Pissum sativum* L. var. *esla* de fitasa comercial en la composición de Magnesio en Esternón, Fémur, Corazón, Riñón y Sangre en ratas**

	Harina de Guisante Cruda (GC)	Harina de Guisante Control No adicionada de Fitasa (GNF)	Harina de Guisante adicionada de Fitasa (GF)
<b>Mg Esternón (mg/100g s.s.)</b>	248.7±17.04 <sup>c</sup>	190.8±9.11 <sup>b</sup>	105.0±5.64 <sup>a</sup>
<b>Mg Fémur (mg/100g s.s.)</b>	541.4±21.62 <sup>c</sup>	435.8±12.80 <sup>b</sup>	349.0±6.79 <sup>a</sup>
<b>Mg Corazón (mg/100g s.s.)</b>	132.1±4.20 <sup>b</sup>	139.1±6.66 <sup>b</sup>	50.1±1.45 <sup>a</sup>
<b>Mg Riñón (mg/100g s.s.)</b>	106.5±4.68 <sup>b</sup>	114.1±4.00 <sup>b</sup>	61.1±2.96 <sup>a</sup>
<b>Mg Sangre (mg/100g s.s.)</b>	859.9±52.3 <sup>b</sup>	834.3±35.4 <sup>b</sup>	546.4±51.1 <sup>a</sup>

Los valores representados en la tabla son medias de diez determinaciones (n=10 media ± EEM) en los grupos GC y GNF, y de ocho determinaciones (n=8 media ± EEM) en el grupo GF. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (P<0.05).

El contenido de Mg en esternón y fémur (Tabla 27), expresado en mg/100g S.S., disminuye drásticamente en los animales que consumen las dietas procesada, en relación a los animales alimentados con guisantes crudos (GC), siendo esta reducción más acentuada cuando ingieren la dieta procesada adicionada de la enzima fitasa (GF). El contenido de Mg en corazón, riñón y sangre es significativamente

inferior en las ratas que ingieren la dieta GF que en las que consumen las dietas GNF y GC, no existiendo diferencias significativas entre estas dos últimas.

#### 4.1.2.4. UTILIZACIÓN DIGESTIVA Y METABÓLICA DE CINCO

La cantidad de Zn ingerido (Tabla 28) fue significativamente superior en los animales alimentados con harina de guisante crudo (GC), seguida de aquellos que consumieron harina de guisante sin adición de fitasa (GNF), siendo la menor en los que ingirieron la harina de guisante procesada adicionada de fitasa (GF).

**Tabla 28. Efecto de la adición a *Pisum sativum* L. var. *esla* de fitasa comercial en la Utilización Digestiva y Metabólica de Cinc en ratas**

	Harina de Guisante Cruda (GC)	Harina de Guisante Control No adicionada de Fitasa (GNF)	Harina de Guisante adicionada de Fitasa (GF)
<b>Zn ingerido (<math>\mu\text{g}/\text{día}</math>)</b>	897.8 $\pm$ 17.10 <sup>c</sup>	367.6 $\pm$ 9.61 <sup>b</sup>	243.0 $\pm$ 8.89 <sup>a</sup>
<b>Zn fecal (<math>\mu\text{g}/\text{día}</math>)</b>	837.0 $\pm$ 20.20 <sup>c</sup>	278.1 $\pm$ 7.76 <sup>b</sup>	116.3 $\pm$ 6.13 <sup>a</sup>
<b>Zn urinario (<math>\mu\text{g}/\text{día}</math>)</b>	42.3 $\pm$ 3.21 <sup>c</sup>	19.7 $\pm$ 1.07 <sup>a</sup>	27.5 $\pm$ 6.27 <sup>b</sup>
<b>Zn absorbido (<math>\mu\text{g}/\text{día}</math>)</b>	58.4 $\pm$ 12.4 <sup>a</sup>	89.5 $\pm$ 4.42 <sup>b</sup>	126.7 $\pm$ 4.80 <sup>c</sup>
<b>CDA (%)</b>	9.0 $\pm$ 1.57 <sup>a</sup>	24.3 $\pm$ 0.93 <sup>b</sup>	52.2 $\pm$ 1.30 <sup>c</sup>
<b>Balance (<math>\mu\text{g}/\text{día}</math>)</b>	22.70 $\pm$ 8.90 <sup>a</sup>	69.75 $\pm$ 4.97 <sup>b</sup>	99.23 $\pm$ 8.07 <sup>c</sup>
<b>R/A (%)</b>	35.8 $\pm$ 6.50 <sup>a</sup>	77.27 $\pm$ 1.93 <sup>b</sup>	78.1 $\pm$ 5.05 <sup>b</sup>

Los valores representados en la tabla son medias de diez determinaciones ( $n=10$  media  $\pm$  EEM) en los grupos GC y GNF, y de ocho determinaciones ( $n=8$  media  $\pm$  EEM) en el grupo GF. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas ( $P<0.05$ ).

La excreción fecal de Zn decreció significativamente en un 66.9%, después del tratamiento de remojo, siendo esta reducción más drástica (86.2%) cuando se adicionó la fitasa (GF). Estos resultados explican que las ratas alimentadas con las dietas procesadas presenten una absorción neta de Zn muy elevada (53.3 y 117%), siendo esta absorción más acentuada en el grupo GF. La utilización digestiva de Zn de la harina de guisante crudo (CDA) es significativamente inferior al de las harinas de guisantes procesados. El mejor índice CDA de Zn se obtiene para harina de guisante adicionada de fitasa (GF).

La excreción urinaria de Zn en los animales alimentados con las harinas de guisante procesadas (GNF y GF) fue significativamente inferior a la de los animales que ingirieron harina de guisante cruda (GC), sin que existan diferencias significativas entre los dos primeros grupos mencionados.

El balance de este mineral fue significativamente superior en los animales que ingirieron guisantes con fitasa (GF), seguido de los que consumieron dieta control sin adición de fitasa (GNF), en relación a los que se alimentaron de guisantes crudos (GC). El %R/A fue significativamente superior en GNF y GF que en GC, sin encontrar diferencias significativas entre los dos primeros grupos.

El contenido de Zn en esternón, expresado en mg/100g s.s. (Tabla 29), disminuye significativamente en los animales que consumen las dietas procesadas (GNF y GF), en relación a los animales alimentados con harina de guisante crudo (GC), sin que existan diferencias significativas entre las dos primeras. El contenido de Zn en fémur disminuye en los animales que consumen harina de guisante adicionada de fitasa en relación a los animales alimentados con harina de guisante crudo, sin embargo, las ratas que ingieren harina de guisante procesada sin adición de fitasa presentan unos valores intermedios a los dos grupos anteriores. El contenido de Zn en corazón no sufre modificaciones como consecuencia del procesado, ya que los tres grupos ensayados presentan valores similares. El contenido de Zn en riñón es inferior en los animales que consumen harina de guisante procesada sin adición de fitasa, en relación a la de los animales que ingieren harina de guisante crudo, los animales que se alimentan con harina de guisante procesada adicionada de fitasa presentan valores intermedios a los anteriores. El contenido de cinc en la sangre fue significativamente superior en los animales alimentados con harina de guisante crudo (GC), seguida de aquellos que consumieron harina de guisante sin adición de fitasa (GNF), siendo la

menor en los que ingirieron la harina de guisante procesada adicionada de fitasa (GF).

**Tabla 29. Efecto de la adición a *Pissum sativum* L. var. *esla* de fitasa comercial en la composición de Cinc en Esternón, Fémur, Corazón, Riñón y Sangre en ratas**

	Harina de Guisante Cruda (GC)	Harina de Guisante Control No adicionada de Fitasa (GNF)	Harina de Guisante adicionada de Fitasa (GF)
Zn Esternón (mg/100g s.s.)	8.28±0.39 <sup>b</sup>	6.91±0.17 <sup>a</sup>	6.14±0.12 <sup>a</sup>
Zn Fémur (mg/100g s.s.)	22.42±0.33 <sup>b</sup>	19.58±0.37 <sup>ab</sup>	18.63±2.41 <sup>a</sup>
Zn Corazón (mg/100g s.s.)	7.07±0.10 <sup>a</sup>	7.04±0.14 <sup>a</sup>	6.92±0.10 <sup>a</sup>
Zn Riñón (mg/100g s.s.)	8.36±0.25 <sup>b</sup>	7.63±0.10 <sup>a</sup>	7.77±0.26 <sup>ab</sup>
Zn Sangre (mg/100g s.s.)	192.89±46.77 <sup>c</sup>	66.17±2.53 <sup>b</sup>	48.06±3.63 <sup>a</sup>

Los valores representados en la tabla son medias de diez determinaciones (n=10 media ± EEM) en los grupos GC y GNF, y de ocho determinaciones (n=8 media ± EEM) en el grupo GF. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (P<0.05).

#### 4.1.2.5. UTILIZACIÓN DIGESTIVA Y METABÓLICA DE HIERRO

La cantidad de Fe ingerido (Tabla 30) fue significativamente más elevada en los animales que consumieron las dietas de harina de guisante crudo (GC) y harina de guisante adicionada de fitasa (GF) que en los alimentados con harina de guisante control sin adición de enzima (GNF).

La excreción fecal de Fe expresada en µg/rata/día decreció significativamente en las ratas que consumieron las harinas procesadas, siendo está reducción similar en las dos dietas (GNF y GF), en relación a la harina de guisante crudo (GC).

Las ratas que consumieron guisantes con fitasa fueron las que más cantidad de Fe absorbieron en valores absolutos, expresados en µg/rata/día.

**Tabla 30. Efecto de la adición a *Pisum sativum* L. var. *esla* de fitasa comercial en la Utilización Digestiva y Metabólica de Hierro en ratas**

	Harina de Guisante Cruda (GC)	Harina de Guisante Control No adicionada de Fitasa (GNF)	Harina de Guisante adicionada de Fitasa (GF)
<b>Fe ingerido (<math>\mu\text{g}/\text{día}</math>)</b>	690.3 $\pm$ 13.10 <sup>b</sup>	483.2 $\pm$ 12.50 <sup>a</sup>	677.2 $\pm$ 21.50 <sup>b</sup>
<b>Fe fecal (<math>\mu\text{g}/\text{día}</math>)</b>	668.8 $\pm$ 35.31 <sup>b</sup>	442.3 $\pm$ 32.74 <sup>a</sup>	425.0 $\pm$ 25.75 <sup>a</sup>
<b>Fe absorbido (<math>\mu\text{g}/\text{día}</math>)</b>	19.5 $\pm$ 16.80 <sup>a</sup>	36.8 $\pm$ 22.10 <sup>a</sup>	243.3 $\pm$ 17.60 <sup>b</sup>
<b>CDA (%)</b>	2.9 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>	7.6 $\pm$ 5.2 <sup>a</sup>	37.7 $\pm$ 2.4 <sup>b</sup>

Los valores representados en la tabla son medias de diez determinaciones (n=10 media  $\pm$  EEM) en los grupos GC y GNF, y de ocho determinaciones (n=8 media  $\pm$  EEM) en el grupo GF. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (P<0.05).

**Tabla 31. Efecto de la adición a *Pisum sativum* L. var. *esla* de fitasa comercial en la composición de Hierro en Esternón, Fémur, Corazón y Riñón en ratas**

	Harina de Guisante Cruda (GC)	Harina de Guisante Control No adicionada de Fitasa (GNF)	Harina de Guisante adicionada de Fitasa (GF)
<b>Fe Esternón (mg/100g s.s.)</b>	10.70 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	8.85 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	12.76 $\pm$ 0.74 <sup>c</sup>
<b>Fe Fémur (mg/100g s.s.)</b>	12.30 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	10.96 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	10.06 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>
<b>Fe Corazón (mg/100g s.s.)</b>	46.62 $\pm$ 2.42 <sup>a</sup>	42.78 $\pm$ 1.41 <sup>a</sup>	47.18 $\pm$ 2.91 <sup>a</sup>
<b>Fe Riñón (mg/100g s.s.)</b>	30.75 $\pm$ 0.91 <sup>a</sup>	26.97 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>	28.84 $\pm$ 2.41 <sup>a</sup>

Los valores representados en la tabla son medias de diez determinaciones (n=10 media  $\pm$  EEM) en los grupos GC y GNF, y de ocho determinaciones (n=8 media  $\pm$  EEM) en el grupo GF. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (P<0.05).

En nuestras condiciones experimentales, la utilización digestiva de hierro de la harina de guisante adicionada de fitasa (CDA) es significativamente superior al de la harina de guisante cruda y la harina de guisante sin adición de la enzima.

El contenido de Fe en esternón (Tabla 31) expresado en mg/100g s.s., aumentó en los animales alimentados con GF y disminuyó en los que consumieron GNF en relación a los que ingirieron GC, que presenta valores intermedios. El contenido de Fe en fémur expresado en mg/100g s.s. disminuyó en los animales que consumieron las dietas procesadas (GNF y GF), en comparación con la harina de guisante crudo (GC). El contenido de Fe en corazón y riñón es similar en los tres grupos de ratas estudiados.

#### **4.1.2.5.1. ANÁLISIS HEMATOLÓGICOS**

El contenido de eritrocitos ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ ) y hemoglobina (g/dl) en sangre y el hematocrito (%) no sufre modificaciones como consecuencia de la ingesta de dietas procesadas, ya que los tres grupos ensayados presentan valores similares (Tabla 32).

En los animales alimentados con guisantes adicionados de fitasa el Volumen Corpuscular Medio (fl) es inferior al de los que consumen guisantes crudos, los animales que ingieren la dieta control sin adición de enzima tienen valores de VCM intermedios. Los parámetros MCH (pg) y MCHC (g/dl) son significativamente más elevados en las ratas que ingirieron harina de guisante cruda, que en los que reciben las dietas procesadas, sin que existan diferencias significativas en estos últimos.

El contenido en plaquetas ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ ) es significativamente más elevado en los animales alimentados con GNF que en los otros dos grupos (GC y GF) sin que existan diferencias significativas entre ellos. El contenido en la sangre de neutrófilos (%) es significativamente superior en los animales que consumieron GF, en relación a los que se alimentaron GC y GNF, sin existir diferencias significativas entre estos dos últimos. Sin embargo, el contenido en linfocitos (%) en el grupo GF es significativamente inferior al observado en los animales de los grupos GC y GNF. El porcentaje en monocitos (%) en sangre es significativamente más elevado en las ratas que consumieron GF que las que se alimentaron de GC, las que ingirieron GNF presentan valores intermedios entre los dos grupos mencionados anteriormente. El contenido en eosinófilos (%) se redujo en los animales alimentados con harina de guisante control

sin adición de enzima (GNF) y se elevó en los animales que ingirieron harina de guisante cruda (GC), en relación a los que consumieron harina de guisante adicionada de fitasa (GNF) que presentan valores intermedios de este parámetro. Los animales alimentados con GC presentan los porcentajes de basófilos (%) más elevados en sangre, seguidos de los que consumieron GF; los que consumieron GNF muestran los valores más reducidos.

**Tabla 32. Efecto de la adición a *Pisum sativum* L. var. *esla* de fitasa comercial en los Parámetros Hematológicos de las ratas ensayadas**

	Harina de Guisante Cruda (GC)	Harina de Guisante Control No adicionada de Fitasa (GNF)	Harina de Guisante adicionada de Fitasa (GF)
<b>Eritrocitos (x10<sup>6</sup>/μl)</b>	7,04±0,22 <sup>a</sup>	6,75±0,20 <sup>a</sup>	6,96±0,43 <sup>a</sup>
<b>Hemoglobina (g/dl)</b>	14,23±0,36 <sup>a</sup>	12,92±0,39 <sup>a</sup>	13,10±0,77 <sup>a</sup>
<b>Hematocrito (%)</b>	40,81±1,09 <sup>a</sup>	38,95±1,06 <sup>a</sup>	39,20±2,37 <sup>a</sup>
<b>VCM (fl)</b>	58,06±0,54 <sup>b</sup>	57,75±0,46 <sup>ab</sup>	56,40±0,63 <sup>a</sup>
<b>MCH (pg)</b>	20,30±0,39 <sup>b</sup>	19,15±0,22 <sup>a</sup>	18,85±0,30 <sup>a</sup>
<b>MCHC (g/dl)</b>	34,96±0,52 <sup>b</sup>	33,15±0,16 <sup>a</sup>	33,45±0,37 <sup>a</sup>
<b>Plaquetas (x10<sup>6</sup>/μl)</b>	739,4±55,62 <sup>a</sup>	961,9±42,01 <sup>b</sup>	782,0±77,30 <sup>a</sup>
<b>Neutrófilos (%)</b>	2,50±0,26 <sup>a</sup>	2,47±0,28 <sup>a</sup>	4,89±1,96 <sup>b</sup>
<b>Linfocitos (%)</b>	75,56±2,19 <sup>b</sup>	71,32±4,22 <sup>b</sup>	55,03±10,45 <sup>a</sup>
<b>Monocitos (%)</b>	13,33±1,32 <sup>a</sup>	16,71±2,54 <sup>ab</sup>	21,53±5,68 <sup>b</sup>
<b>Eosinófilos (%)</b>	0,61±0,10 <sup>b</sup>	0,43±0,07 <sup>a</sup>	0,58±0,27 <sup>ab</sup>
<b>BASO (%)</b>	2,11±1,05 <sup>c</sup>	0,98±0,18 <sup>a</sup>	1,78±0,55 <sup>b</sup>

Los valores representados en la tabla son medias de diez determinaciones (n=10 media ± EEM) en los grupos GC y GNF, y de ocho determinaciones (n=8 media ± EEM) en el grupo GF. Letras iguales dentro de la misma fila indican que no existen diferencias significativas (P<0.05).

## V. DISCUSIÓN

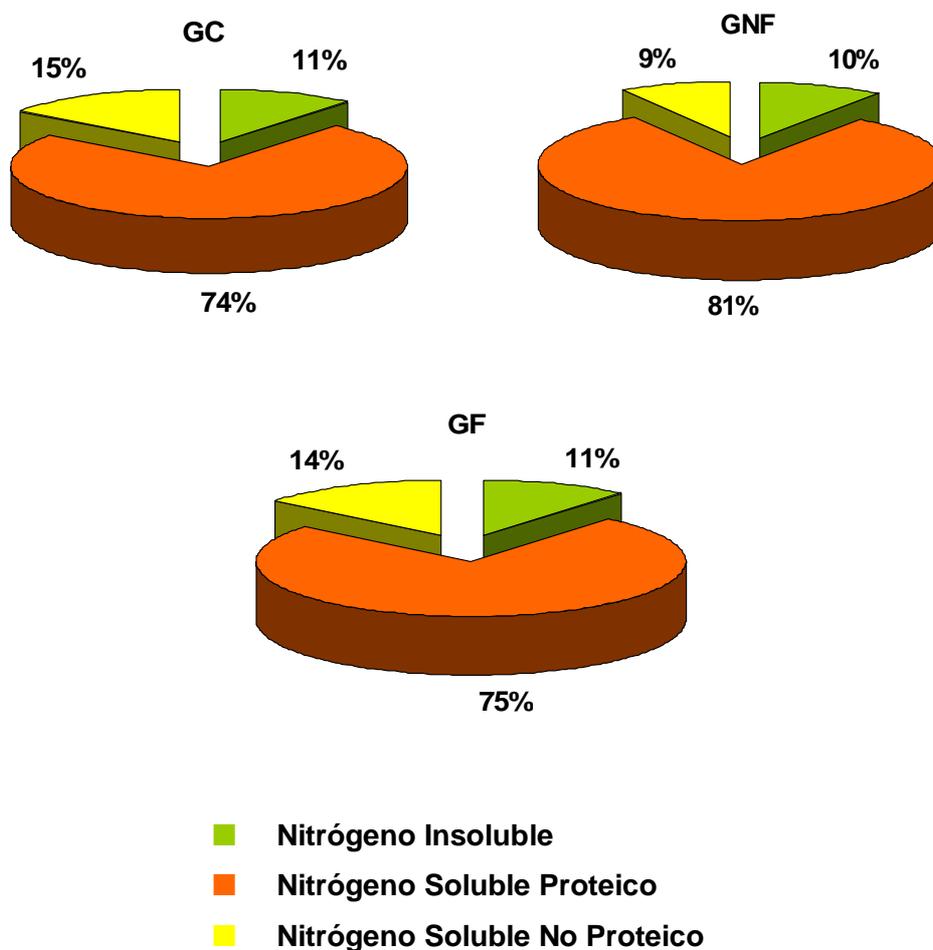
### 5.1. ANÁLISIS QUÍMICO DE LAS DIETAS ENSAYADAS

Es conocido que el procesado de legumbres produce importantes cambios en la composición química de las semillas de leguminosas (Frias y col, 1995a; Urbano y col., 1995; Frias y col., 1996b; Kozłowska y col., 1996; Bau y col, 1997; Fernández y col., 1997; Wang y col, 1997; Honke y col., 1998; Vidal-Valverde y col., 1998b; Wiryawan y Dingle, 1999; Fredrikson y col., 2001; Khalil, 2001 ; Martín-Cabrejas y col., 2003; Urbano y col., 2003; Lestienne y col., 2005a). Dichos cambios varían sustancialmente con el tipo, variedad de la legumbre y grosor de su cubierta, duración y condiciones del proceso de remojo (temperatura, pH) (Singh, 1985; Fernández y col., 1996; Nestares y col., 1996). Además, las considerables pérdidas de materia seca que se observan como consecuencia del procesado pueden tener un efecto compensatorio sobre la pérdida de ciertos nutrientes cuya concentración puede incluso verse significativamente aumentada con respecto a la semilla no procesada.

Tal como era esperable, el proceso de remojo en un tampón acetato y el proceso de remojo y adición de enzima fitasa dieron lugar a aun descenso del pH (6.3 en GC frente a 5.6 y 5.7 en GNF y GF, respectivamente) y el consiguiente aumento en la capacidad tamponadora de las dietas ensayadas (34 meq NaOH/kg SS en GC frente a 95.4 y 94 meq NaOH/kg SS en GNF y GF, respectivamente). El contenido de nitrógeno total, nitrógeno insoluble y nitrógeno soluble proteico y no proteico de la harina del guisante utilizado (Tabla 14) está dentro del rango de valores encontrados en la bibliografía (Figura 2) (Adsule y Kadam, 1989; Savage y Deo, 1989; Nikokyris y Kansylis, 1997; Periago y col., 1998; Alonso y col., 2000b). El proceso de remojo en agua durante 60 minutos y los cambios de pH respectivamente buscando el punto óptimo de actuación de la enzima fitasa disminuyen el contenido de nitrógeno total a pesar de que dicho nitrógeno debería haberse concentrado como consecuencia de las pérdidas de azúcares solubles y oligosacáridos  $\alpha$ -galactósidos, cenizas y fibra soluble (Tablas 15 y 18).

El contenido de nitrógeno insoluble de las harinas de guisante no se modifica (Figura 2) debido a que dicho nitrógeno insoluble está mayoritariamente asociado a las distintas fracciones de fibra insoluble (Martín-Cabrejas y col., 2003), formando

interacciones no covalentes o de puentes disulfuro entre distintas proteínas (Adsule y Kadam, 1989; Alonso y col., 2000b), y el tratamiento aplicado no ha sido capaz de movilizarlo. Por el contrario, otros procesos como el de germinación sí movilizan el nitrógeno insoluble y la proteína asociada a la fracción de fibra insoluble (Martín-Cabrejas y col., 2003; Urbano y col., 2005 a,b).



**GC.-** Harina de Guisante Crudo  
**GNF.-** Harina de Guisante Crudo procesado no adicionado de Fitasa  
**GF.-** Harina de Guisante Crudo procesado adicionado de Fitasa

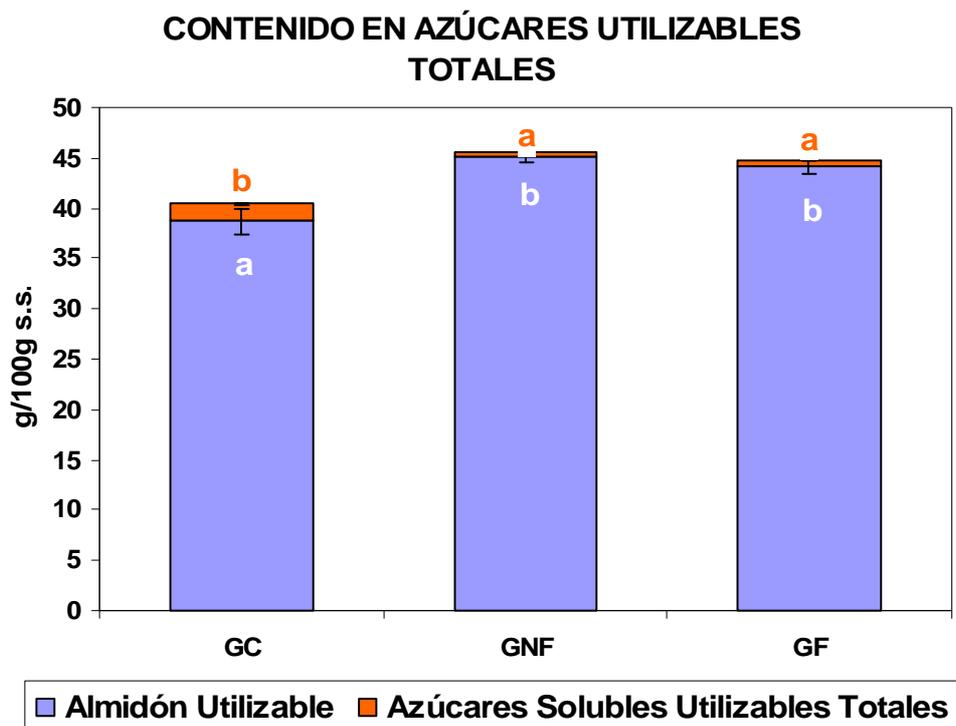
**Figura 2.** Efecto de la adición de fitasa comercial en el contenido en nitrógeno insoluble, nitrógeno soluble proteico y nitrógeno soluble no proteico de *Pisum sativum* L. var. *es/a*. Resultados expresados como porcentaje del nitrógeno total presente en la harina.

Las pequeñas pérdidas de nitrógeno total encontradas en la dieta control remojada y sin adición de fitasa se deberían a las pérdidas de nitrógeno soluble no proteico (Figura 2). Dicha fracción está compuesta normalmente por aminoácidos libres, péptidos o proteínas de bajo peso molecular, bases púricas o pirimidínicas y alcaloides (Adsule y Kadam, 1989; Kim y Barbeau, 1991). Por el contrario, en la dieta de harina adicionada de fitasa (GF), el descenso en el contenido de nitrógeno total cuando se compara con GNF se debe a las pérdidas obtenidas en la fracción de nitrógeno soluble proteico. Estas pueden deberse bien a que el preparado comercial enzimático tenga una pequeña actividad proteasa colateral a la enzima fitasa (Volfová y col., 1994; Rodríguez y col., 2000; Murai y col., 2002; Pepe y col., 2004) o bien a que la hidrólisis del ácido fítico por parte de la enzima fitasa pueda haber dado lugar a cambios en la estructura de la matriz proteica, ya que es conocido que el ácido fítico interacciona con las proteínas de la dieta formando enlaces iónicos a pH ácido o enlaces por puentes de calcio a pH neutro o básico (Cheryan, 1981). No obstante, los resultados obtenidos bajo nuestras condiciones experimentales para estos procesos de remojo y adición de enzima fitasa, indican que la posible actuación de las proteasas presentes en la legumbre que darían lugar a una pre-digestión de las proteínas, y las pérdidas de nitrógeno soluble proteico y no proteico ha sido muy pequeña en relación a lo que sucede en otros procesos como germinación y fermentación (incluir porcentajes de transformación y pérdida) (Urbano y col., 2005a y b; Porres y col., 2003a).

En relación al contenido de almidón y azúcares solubles, el procesado incrementa considerablemente la cantidad de almidón total y almidón utilizable.

Se han descrito en diversas legumbres (habas, lentejas, guisantes, garbanzos) numerosos procesos (remojo a distinto pH y cocinado, autoclavado, fermentación, germinación) que resultan ser efectivos para aumentar la cantidad de almidón total y utilizable y la digestibilidad *in vitro* de dicho nutriente (Jenkins y col., 1982; Wong y col., 1985; Frias y col., 1992; Vidal-Valverde y col., 1992; Frias y col., 1996 a y b; Akalu y col., 1998; Frias y col., 2000; Ratnayake y col., 2002; Urbano y col., 2005a y b). Frias (1992) observó un incremento en el contenido de almidón total y utilizable en lentejas después de 9 horas de remojo a temperatura ambiente. El proceso de remojo sin adición de fitasa (GNF) y la posterior adición de esta enzima (GF) también incrementan significativamente la cantidad de almidón total como consecuencia de la

pérdida de oligosacáridos  $\alpha$ -galactósidos y otros azúcares solubles (Tabla 15 y 18; Figura 3). Además hay un suave incremento en el contenido de almidón utilizable ligeramente superior a las pérdidas comentadas (Figura 3). Dicho aumento podría deberse a que durante el procesado se facilita la disociación y fragmentación de los gránulos de almidón ( Rao, 1969; Björck y col., 1984 a y b).



**GC.**- Harina de Guisante Crudo

**GNF.**- Harina de Guisante Crudo procesado no adicionado de Fitasa

**GF.**- Harina de Guisante Crudo procesado adicionado de Fitasa

**Figura 3.** Efecto de la adición de fitasa comercial en el contenido de Almidón Utilizable y Azúcares Solubles Utilizables Totales de *Pisum sativum* L. var. *esla*.

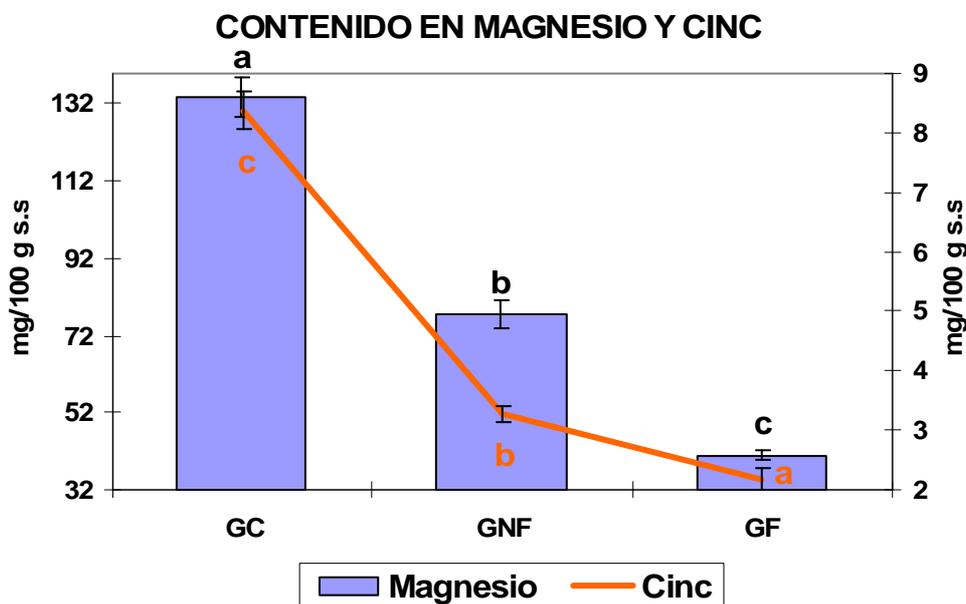
La pérdida elevada de las vitaminas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> se debió al remojo al que fueron sometidas las harinas y en concreto, a la solubilización en el medio acuoso y a su inestabilidad termal (Edijala, 1980; Abdel-Hamid, 1983; Frias y col., 1995; El-Adawy, 2002; Prodanov y col., 2004); esta disminución es análoga a los resultados obtenidos por Frias y col. (1995) en lentejas. Podemos observar como la adición de fitasa no

condujo a ninguna pérdida adicional de las vitaminas anteriormente mencionadas. Las dietas sometidas al remojo, con o sin adición de enzima, no cubren los requerimientos diarios estimados para estos nutrientes en ratas en crecimiento que corresponde a 0,4 mg/100g s.s., en el caso de vitamina B<sub>1</sub>, y 0,3 mg/100g s.s., en el caso de vitamina B<sub>2</sub> (NRC, 1995).

El contenido de cenizas, fósforo total, hierro y magnesio del guisante utilizado en nuestros experimentos está dentro del rango de valores encontrados en la bibliografía (Alonso y col., 2000a y 2001; Sandberg, 2002a; Koplík y col., 2004; Urbano y col., 2005c). Por el contrario, el contenido de cinc es superior a los valores normalmente encontrados, lo que se debe probablemente a las condiciones edáficas en las que ha sido cultivado (Urbano y col., 2005c).

En nuestras condiciones experimentales en las que la legumbre ha sido remojada en forma de harina y en las que se ha desechado el sobrenadante, las pérdidas de minerales totales son considerables (54.8%), debido a la solubilización de los minerales en el agua de remojo (Schlemmer y col., 1995; Saharan y col., 2001; Duhan y col., 2002; Habiba, 2002; Vidal-Valverde y col., 2002a; Lestienne y col., 2005), y superiores a otros procesos como germinación, remojo y cocinado o extracción de oligosacáridos  $\alpha$ -galactósidos (Fernández y col., 1996; Porres y col., 2003a y 2005; Aranda y col., 2004; Urbano y col., 2005c). Las pérdidas durante el remojo de la harina de legumbre son mayores que la semilla entera durante el remojo previo a la germinación (Urbano y col., 2005c) u otras semillas de legumbres.

Las pérdidas de magnesio y cinc (Figura 4) que se producen durante el proceso de remojo de la harina de guisantes sin adición de fitasa se deben a la elevada solubilidad de estos cationes que se incorporan al agua de remojo. Dichas pérdidas se deben a que los cationes se encuentran en forma libre y/o formando complejos solubles de pequeño tamaño, o bien asociado al ácido fítico que se moviliza durante el procesado en un elevado porcentaje (78%) (Figura 5) o a compuestos fenólicos cuya concentración disminuye como consecuencia de los procesos de remojo de esta legumbre y de otras legumbres descritas en la bibliografía (López-Amorós, 2000; El-Adawy, 2002; Vidal-Valverde y col., 2002a). Perlas y Gibson (2002), El-Adawy y col. (2000) y Urbano y col. (2005c) han observado pérdidas importantes de cinc y magnesio en soja, judía, lupino o guisante después de someterlas en distintos periodos a remojo en soluciones de agua o bicarbonato sódico.



**GC.**- Harina de Guisante Crudo

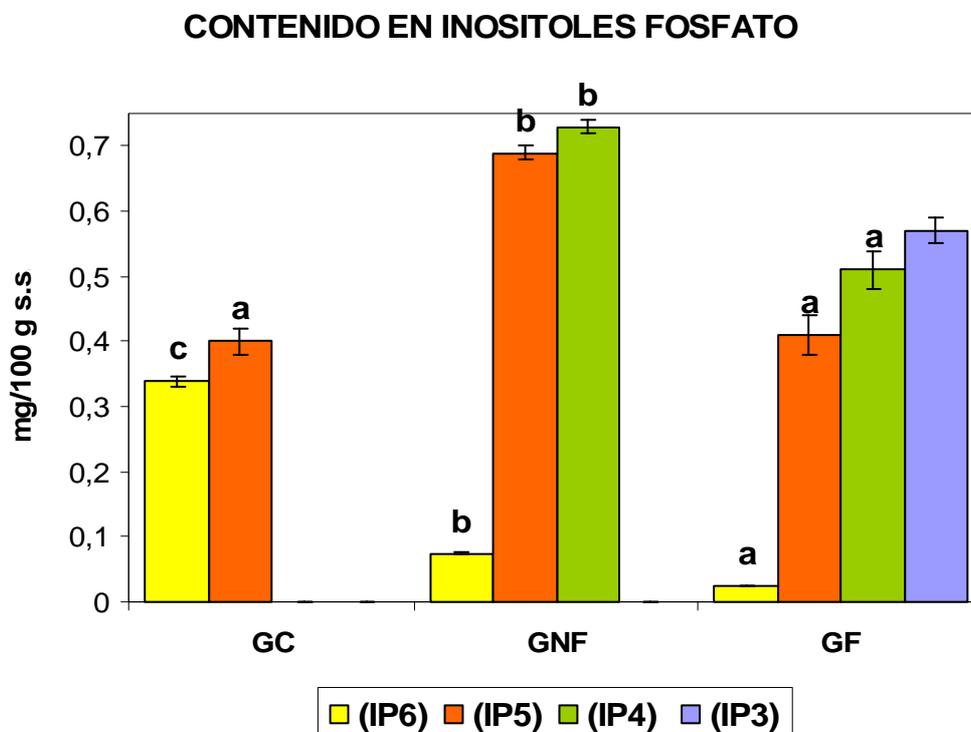
**GNF.**- Harina de Guisante Crudo procesado no adicionado de Fitasa

**GF.**- Harina de Guisante Crudo procesado adicionado de Fitasa

**Figura 4.** Efecto de la adición de fitasa comercial en el contenido de Magnesio y Cinc de *Pisum sativum* L. var. *esla*.

La adición de fitasa comercial durante el proceso de remojo hace que disminuya el contenido de inositolos fosfato totales y específicamente el IP6, el IP5 y el IP4, a consecuencia de lo cual se genera IP3 (Figura 5). Este descenso en el total de los inositolos fosfato coincide con la pérdida adicional de magnesio y cinc con respecto a la dieta GNF (Figura 4). Esto nos podría indicar que estos cationes se hayan unidos al ácido fítico y tras la actuación de la enzima fitasa se han liberado y solubilizado en el agua de remojo. Debe tenerse en cuenta que el grado de afinidad de magnesio y cinc es elevado en relación al inositol hexa- y pentafofosfato, disminuyendo considerablemente hasta casi desaparecer con respecto a los inositolos tetra-, trifosfato y de menor grado de fosforilación (Lønnerdal y col., 1989; Brink y Beynen, 1992; Sandström y Sandberg, 1992; Pallauf y col., 1998; Manary y col., 2002; Lestienne y col., 2005b). Lonnerdal et al. (1989) realizando estudios con ratas y Simpson and Wise (1990) empleando técnicas in vitro, observaron que la afinidad de

Ca y Zn por los inositol fosfato es alta en grados elevados de fosforilación. Sólo los inositol hexa y penta fosfato son capaces de inhibir dichos minerales mediante la formación de complejos insolubles.



**GC.**- Harina de Guisante Crudo

**GNF.**- Harina de Guisante Crudo procesado no adicionado de Fitasa

**GF.**- Harina de Guisante Crudo procesado adicionado de Fitasa

**Figura 5.** Efecto de la adición de fitasa comercial en el contenido de Inositol hexa fosfato (IP6), Inositol Penta fosfato (IP5), Inositol Tetra fosfato (IP4) e Inositol Tri fosfato (IP3) de *Pisum sativum* L. var. *esla*.

De acuerdo a Koplik y col. (2004) el hierro soluble/extraíble en condiciones óptimas y apropiadas para la extracción de la fracción de globulinas, albúminas y probablemente glutelinas es de un 56%, y de ese hierro un 14% se encuentra en forma inorgánica (ferroso, férrico), un 78% se encontraría unido a sustancias de alto peso molecular (150 kDa, metaloproteínas y ferritinas vegetales) y el 8% restante se encontraría unido a sustancias de peso molecular intermedio (14kDa). El 44% del

hierro no fue extraíble y podría encontrarse unido a componentes estructurales (fibra alimentaria a la que se encuentra también unida un porcentaje de proteína), de almacén en forma de fitatos, o bien unido a compuestos fenólicos en la cubierta de la semilla (Lestienne y col., 2005). De los resultados obtenidos por Koplík et al. (2004), puede deducirse que el contenido de Fe asociado a la ferritina es menor en el guisante que el descrito por otros autores para la soja (Theil y col., 2004; Beard y col., 1996) en la cual un 80% del contenido total de Fe presente en la semilla se encuentra asociada a esta proteína de almacén.

El contenido de hierro en todos los productos ensayados está por encima de los requerimientos nutricionales de la rata en crecimiento (NRC, 1995).

En nuestras condiciones experimentales en las que la legumbre ha sido remojada en forma de harina y en las que se ha desechado el sobrenadante, las pérdidas de minerales totales son considerables (54.8%) y superiores a otros procesos como fermentación, germinación, remojo y cocinado, autoclavado, microondas o extracción de oligosacáridos  $\alpha$ -galactósidos (Abd El-Rahman y Abd El-Aleem, 1996; Frias y col., 1996b; Wang y col., 1997; Khalil, 2001; Vidal-Valverde y col., 2002a y b; Frias y col., 2003b; Lestienne y col., 2005; Porres y col., 2005) en los que sin embargo el tratamiento tecnológico ha sido realizado utilizando la semilla entera. El procesado de remojo al que es sometida la harina de guisantes control se produce una pérdida de un 33% en el contenido de hierro. Esta pérdida puede haberse debido a diversos factores: En primer lugar el pH y la composición del tampón utilizado como solución de remojo (5.5) puede haber favorecido la solubilidad y posterior pérdida del mineral en forma inorgánica. Por otra parte, un elevado porcentaje de las pérdidas podría estar asociado a la disminución en los niveles de ácido fítico con elevada afinidad por este mineral, la concentración de ácido fítico ha disminuido considerablemente como consecuencia del remojo de la harina de guisante a pH 5.5, 37°C durante 60 minutos. La mayor parte de estas pérdidas se deberían a la salida de este componente no-nutricional al líquido de remojo, aunque no puede descartarse la posible acción de la fitasa endógena que se vería reflejada en el aumento de los niveles de IP5 e IP4 con respecto a la harina de guisante crudo. Sin embargo, esta disminución asociada a la fitasa endógena no sería muy elevada debido a que las condiciones óptimas de pH y el tiempo de duración del procesado no son los óptimos para una actividad efectiva de la fitasa endógena del guisante (Fredrikson y col., 2001). Otros componentes como la

ferritina vegetal o metaloproteínas podrían también haber contribuido, aunque en menor proporción, ya que las pérdidas en el contenido de nitrógeno proteico soluble, fracción del nitrógeno de la semilla en la que se encontrarían englobadas estas proteínas, no ha sido elevada como consecuencia del procesado (Urbano y col., 2003). En cuanto al Fe unido a los componentes estructurales, las pérdidas habrían sido mínimas, dado que los cambios en el contenido de fibra insoluble han sido apenas apreciables, observándose el aumento esperado por la sobre concentración que causa la pérdida de los distintos nutrientes presentes en la harina por causa del proceso de remojo (Urbano y col., 2003).

En los dos tratamientos de remojo (con o sin adición de fitasa), la pérdida de polifenoles de la harina de guisante podría llevar aparejada una pérdida de hierro, ya que es conocida la afinidad de este mineral por dichos componentes no nutricionales (Siegenberg y col., 1991; Brune y col., 1992; Hurrell y col., 1992; Lestienne y col., 2005) y se ha observado que el remojo da lugar a una pérdida importante de compuestos fenólicos (López, 2000).

La adición de enzima fitasa a la harina de guisantes en unas condiciones experimentales apropiadas para su actuación (pH, tiempo y temperatura) ha dado lugar a una ligera disminución adicional de IP6, IP5 e IP4 con respecto a la harina de guisante remojada, apareciendo IP3 y probablemente otros inositoles fosfato de menor grado de fosforilación no detectables con la metodología utilizada. La hidrólisis del ácido fítico por parte de la fitasa comercial hacia esperable una menor afinidad de este por el hierro, y por tanto una mayor liberación y pérdida de dicho catión al líquido de remojo. Sin embargo, esto no ha ocurrido y las cantidades de hierro presente en la harina GF son superiores a las presentes en la harina de guisante control sin adición de fitasa (GNF), detectándose la pérdida de tan solo un 7% del Fe cuando se compara con la harina de guisante crudo en vez del 33% observado para la harina remojada. Esto puede deberse a que la actuación de la fitasa comercial durante el proceso de remojo ha aumentado la cantidad de fósforo inorgánico en el líquido de remojo lo que puede haber dado lugar a la formación de complejos insolubles con el hierro como ha sido descrito por (Persson y col., 1998; Sandberg y col., 1999; Sandberg, 2002b). Esto coincide con la mayor proporción de fósforo total en la harina de guisante adicionado de fitasa en comparación a su control no adicionado (GNF).

El contenido de fibra total, fibra soluble y fibra insoluble del guisante utilizado

en este experimento está dentro del rango de valores descritos en la bibliografía (Mariscal-Landín y col., 2002; Salgado y col., 2002). El descenso en el contenido de fibra total como consecuencia del tratamiento (GNF y GF) se debe fundamentalmente a la pérdida de fibra soluble. Dicha fracción de la fibra alimentaria se compone mayoritariamente de ácidos urónicos, pectinas, gomas, mucílagos y ciertos tipos de hemicelulosas solubles y polisacáridos de reserva de la planta (Prosky y col., 1988), no modificándose el contenido de fibra insoluble que aumenta ligeramente. Un porcentaje considerable de la fibra insoluble del guisante se encuentra en forma de celulosa y en menor grado como lignina y polisacáridos no celulósicos entre los que se encontraría el almidón resistente (23.4%) (Martín-Cabrejas y col., 2003).

En numerosas experiencias se ha detectado la pérdida casi total de inhibidores de la tripsina como consecuencia de diferentes procesos térmicos como extrusión [guisantes, desde 6.32 a 0.34 TIU mg<sup>-1</sup> de SS (Alonso y col., 2000)], remojo y cocción [habas, desde 6.32 a 0.34 TIU mg<sup>-1</sup> de SS (Fernandez y col., 2003)], así como distintas formas de calentamiento: autoclavado a 121°C, cocción ordinaria y microondas [guisantes, desde 2.2 a n.d. TIU mg<sup>-1</sup> de SS (Habiba, 2002)]. Griffiths (1984) observó en habas como los TIA se mantienen estables en un rango de temperatura entre 60 y 100°C. En nuestras condiciones experimentales la reducción en el contenido de inhibidores de la tripsina (70%) fue razonable teniendo en cuenta la naturaleza termolábil y soluble de este factor no nutritivo. En numerosos estudios se describe como el cocinado y el tratamiento con calor húmedo (autoclave a 121°C durante 30 minutos) destruyen completamente el contenido en TIA de las legumbres (Adsule y Barat, 1984; Periago y cols, 1998; Habiba, 2002). No obstante, pensamos que a la temperatura de 37° C los TIA no se verían significativamente afectados (Liener y col., 1980) y su reducción se debería más bien a su solubilización en el medio ácido utilizado u otras condiciones del tratamiento de remojo. Por otra parte, no existen diferencias entre el grado de reducción en los inhibidores de la tripsina obtenidos en la dieta control sin adición de fitasa y la dieta tratada con fitasa, lo que nos indicaría que dicha reducción sería debida a las condiciones fisicoquímicas del proceso.

De una forma similar, la existencia de niveles inferiores de  $\alpha$ -galactósidos en las dietas procesadas es principalmente debido a la metodología del tratamiento y no a la acción de la fitasa. Como resultado del remojo, se activaron una serie de cambios metabólicos que dieron lugar a una reducción en los niveles de  $\alpha$ -galactósidos (Frias y

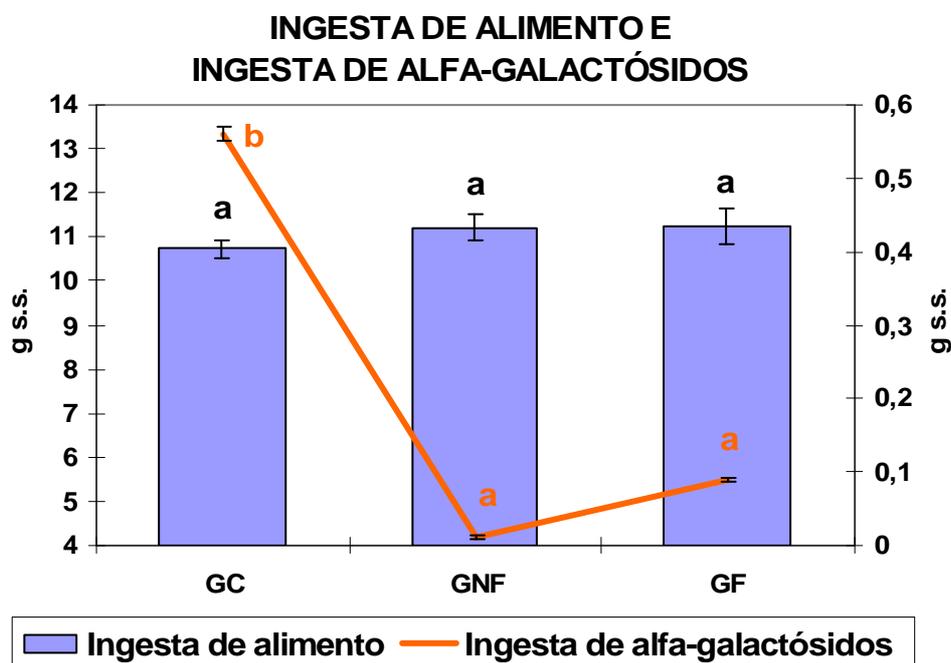
col., 1995b, 2000 y 2003b; Vidal-Valverde y col., 1992 y 2002a). Sin embargo, la reducción en el contenido de estos compuestos es superior en nuestras condiciones experimentales cuando se compara a otros trabajos en los que se somete la harina al remojo, ya que el sobrenadante es descartado, siendo estos carbohidratos solubilizados en el líquido de remojo. Iyengar y KulKarni (1977) demostraron que cuando el medio de remojo o cocinado se desecha tras el procesado, se produce una disminución en los factores antinutritivos termoresistentes que se han disuelto en dicho medio. Silva y Luh (1979) encuentran un alto porcentaje de eliminación de los oligosacáridos de la familia de la rafinosa durante el remojo de las legumbres en agua, soluciones alcalinas diluidas o disoluciones de sales. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Iyer y col. (1980), quienes encontraron que el remojo reducía la concentración de  $\alpha$ -galactósidos, inhibidores de la tripsina y ácido fítico en distintas variedades de *Phaseolus vulgaris*. Frias y col., 2003b observaron como a medida que se incrementa el periodo de tiempo al que es sometida la harina de guisante a remojo la proporción de pérdida de rafinosa, estaquiosa y verbascosa se incrementaba.

Hay numerosas experiencias donde se demuestran las pérdidas del ácido fítico durante diferentes tratamientos como remojo y cocinado (Fernández y col., 1997), germinación (Vidal-Valverde y col., 1994, 1998a y 2002b; Urbano y col., 2005b) y fermentación (Kozłowska y col., 1996; Porres y col., 2003a). La reducción en el contenido en ácido fítico del 78% en la dieta control sin adición de fitasa respecto a la dieta guisante crudo puede deberse a que en las condiciones experimentales en las que se ha elaborado dicha dieta se ha conseguido activar la fitasa endógena existente en la leguminosa (Fredrikson y col., 2001, Sandberg y Andlid, 2002) y al propio remojo. La adición de fitasa a la dieta reduce aún más el contenido en ácido fítico (93% respecto a la dieta RP), ya que la elaboración de la dieta con adición de fitasa se ha realizado en las condiciones experimentales óptimas para conseguir una mayor hidrólisis del ácido fítico de acuerdo con trabajos previos (Frias y col., 2003a). Esta reducción de inositol hexafosfato y pentafofosfato ha dado lugar a la aparición de inositoles de menor grado de fosforilización como inositol tetra y trifosfato y otros no perceptibles por la técnica (Figura 5).

## 5.2. VALORACIÓN BIOLÓGICA

### 5.2.1. INGESTA

El remojo que se aplicó a las dietas de guisantes produjo un descenso significativo en el contenido de factores no nutritivos - ácido fítico, inhibidores de proteasas y  $\alpha$ -galactósidos – sin embargo estos cambios no dieron lugar a un aumento en la ingesta de alimento (Figura 6).



**GC.**- Harina de Guisante Crudo

**GNF.**- Harina de Guisante Crudo procesado no adicionado de Fitasa

**GF.**- Harina de Guisante Crudo procesado adicionado de Fitasa

**Figura 6.** Efecto de la adición a *Pisum sativum* L. var. *esla* de fitasa comercial en la ingesta de alimento e ingesta de  $\alpha$ -galactósidos totales.

La ingesta de alimento (Tabla 19) de guisante crudo y procesado es elevada y similar a los resultados observados en harina de guisante por Urbano y col. (2005b y c), así como en de otras legumbres estudiadas como habas (Fernández y col., 1996 y 1997; Aranda y col., 2004), garbanzos (Nestares y col., 1993), judías (Nestares y col.,

2001) y lentejas (Porres y col., 2003b). El remojo que se aplicó a las dietas de guisantes (GNF y GF) produjo un descenso significativo en el contenido de factores no nutritivos  $\alpha$ -galactósidos y taninos (Somari y Balogh, 1993; Alonso y col., 2000c; Wang y col., 2003). Sin embargo, estos cambios no dieron lugar a una mejora de la ingesta de alimento a diferencia de lo observado en guisantes, garbanzos y habas. En estas legumbres, la reducción en el contenido de dichos factores no nutritivos después de un proceso de germinación (Urbano y col., 2005a,b) o procesos de remojo en distintas condiciones de pH y cocción (Nestares y col., 1993; Fernández y col., 1996) dieron lugar a un aumento considerable en la ingesta.

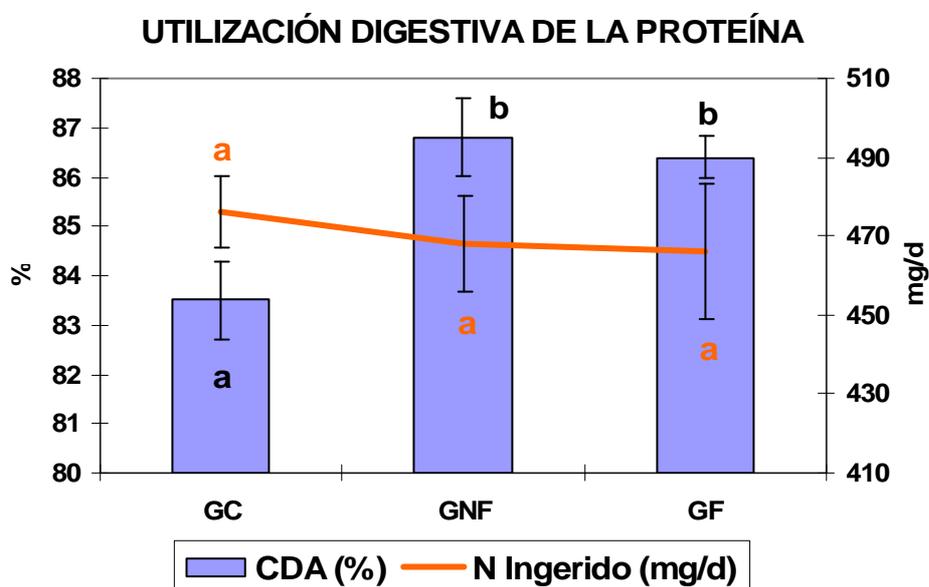
El distinto pH de las dietas experimentales (dieta RP pH 6.3; dieta PNP pH 5.6 y dieta PP pH 5.7) junto con la pérdida de azúcares solubles de bajo peso molecular que se ha observado tras el procesado podría haber enmascarado el aumento de la ingesta esperado en las dietas procesadas (Fernández y col., 1996; Nestares 2001).

## **5.2.2. UTILIZACIÓN DIGESTIVA Y METABÓLICA DE LA PROTEÍNA E HIDRATOS DE CARBONO**

La utilización digestiva de la proteína del guisante utilizado es elevada (Figura 7) y está dentro del rango de valores descritos en la bibliografía (Orúe y col., 2000), siendo similar a la obtenida para las habas (Fernández y col., 1996) y muy superior a la de las lentejas, garbanzos y judías (Urbano, 1995; Nestares, 1996 y 2001). Cuando las dietas se someten al remojo sin o con adición de fitasa se observa una disminución significativa de la excreción fecal de nitrógeno y una mejora significativa de la utilización digestiva de la proteína (83.5-86.8%) que hay que atribuir a la disminución de factores no nutritivos como los inhibidores de la tripsina (TIA) (70%), el ácido fítico (78%) y probablemente a los taninos (Siddhuraju y Becker, 2001).

Por lo que se refiere a los inhibidores de la tripsina, es un hecho ampliamente descrito en la bibliografía su capacidad para unirse a los enzimas tripsina y quimotripsina a los cuales bloquean, produciéndose una digestión incompleta de la proteína y un aumento de la excreción de la proteína endógena del animal. (Urbano y col., 1995; Frias y col., 1995). Esto trae consigo una reducción en la digestibilidad

aparente de los aminoácidos azufrados (Liener y Kakade, 1980), sin embargo, este efecto negativo de los inhibidores de la tripsina se elimina en gran parte por el procesamiento de nuestras dietas experimentales.



**GC.**- Harina de Guisante Crudo

**GNF.**- Harina de Guisante Crudo procesado no adicionado de Fitasa

**GF.**- Harina de Guisante Crudo procesado adicionado de Fitasa

**Figura 7.** Efecto de la adición a *Pisum sativum* L. var. *esla* de fitasa comercial en la Utilización Digestiva de la Proteína.

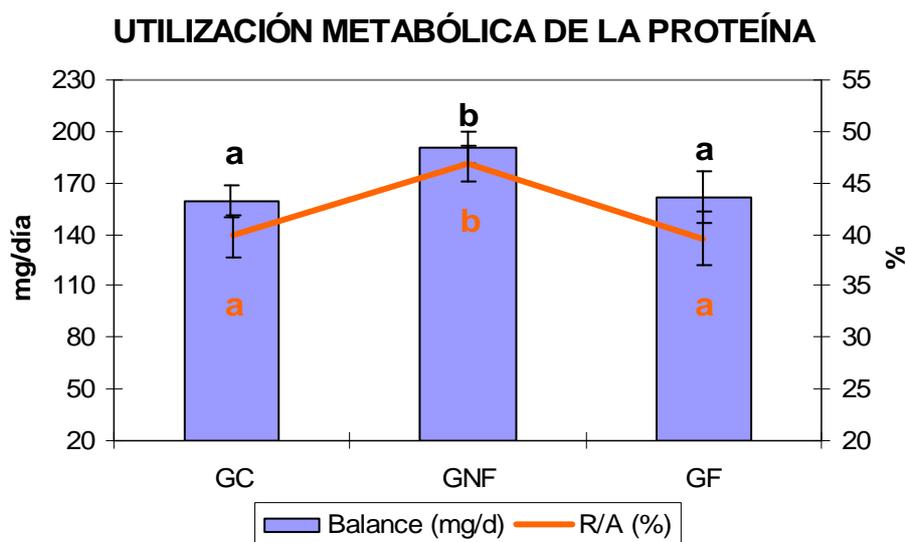
En relación a los taninos, su pérdida en las dietas procesadas es otro de los factores que podrían haber contribuido a la mejora en la utilización digestiva de la proteína (Sathe y Salunkhe, 1984; Deshpande y Cheryan, 1983). Los taninos tienen capacidad para formar enlaces con la proteína de la dieta, lo que hace a esta mucho menos susceptible al ataque por parte de las enzimas digestivas (Hagerman y Butler, 1981; Salunkhe y col., 1982; Jansman y Longstaff, 1993). Los taninos pueden además interaccionar con las propias enzimas digestivas reduciendo su actividad y provocando la consiguiente disminución en la eficacia de absorción de los nutrientes, además de incrementar la cantidad de nitrógeno endógeno que se pierde por las heces (Griffiths, 1981 y 1986; Reddy y col., 1985; Villanueva y col., 1987; Salunkhe y Kadam, 1989;

Reed y col., 1990; Jansman, 1993 y 1995).

En relación al efecto del ácido fítico sobre la absorción del nitrógeno, es conocido que el ácido fítico forma complejos con las proteínas tanto a pH ácido como a pH básico (Cheryan, 1980). Las implicaciones nutricionales de estos complejos fitato-proteína se relacionan con la menor solubilidad de la proteína que se produce y que puede afectar negativamente a algunas de sus propiedades funcionales dependientes del grado de hidratación y solubilidad y que las hacen más resistentes a la degradación proteolítica (Trugo & Baer, 1998; Knuckles y col.,1989; Chitra y col.,1996; Elkhail y col.,2001).

La mejora en la utilización digestiva de la proteína en los guisantes procesados sería la suma de la disminución en el contenido de los factores no nutritivos antes comentados. Sin duda la gran reducción de ácido fítico que se consigue con el remojo de nuestras dietas de guisantes es un factor clave para explicar la mejora del índice CDA observado, aunque no se produce un aumento adicional de la utilización digestiva del nitrógeno de la dieta cuando se añade fitasa, a pesar de que el ácido fítico experimenta un nuevo descenso aunque de menor cuantía.

La calidad nutritiva de la proteína de la dieta de guisantes crudos (Figura 8) juzgada por el balance y porcentaje de nitrógeno retenido en función del absorbido (Tabla 24) es elevada, ligeramente inferior a la de una dieta control de caseína-metionina, similar a la de habas (Fernández y col., 1996) y superior a la de otras legumbres como garbanzos, lentejas y judías (Fernández y col., 1996; Urbano y col., 1995; Nestares y col., 2001). La mejor utilización metabólica de la proteína que se obtiene en los animales que consumen la dieta GNF cuando se compara con las dietas GC y GF (Figura 8) es debido a que dichos animales excretan menor cantidad de nitrógeno por orina. En todas las dietas experimentales, la cantidad neta absorbida de nitrógeno ha sido la misma, de ahí que el porcentaje de nitrógeno retenido en función del absorbido sea significativamente mayor en los animales que consumen la dieta GNF. La mejora en el balance de nitrógeno de dichos animales podría deberse a que en las condiciones experimentales de remojo utilizadas, los hidratos de carbono se hacen más disponibles y se absorben mejor y el animal los utilizaría como fuente de energía, preservando así la proteína aportada por la dieta que podría entonces utilizarse con fines plásticos. Para su utilización disponen, a pesar de las considerables pérdidas originadas por el procesado, de vitaminas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>.



**GC.**- Harina de Guisante Crudo

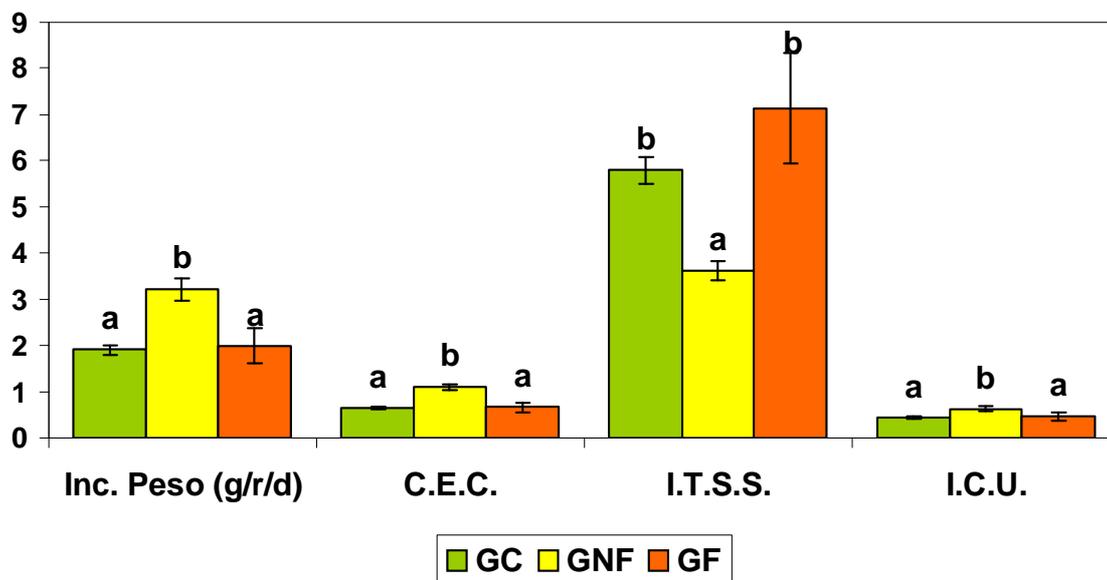
**GNF.**- Harina de Guisante Crudo procesado no adicionado de Fitasa

**GF.**- Harina de Guisante Crudo procesado adicionado de Fitasa

**Figura 8.** Efecto de la adición a *Pisum sativum* L. var. *esla* de fitasa comercial en la Utilización Metabólica de la Proteína.

El incremento de peso fue significativamente mayor en los animales que consumen la harina control remojada y no adicionada de fitasa, no existiendo diferencias significativas entre los animales alimentados con la harina de guisante crudo y la harina de guisante remojado y adicionado de fitasa (Urbano y col., 2003). El mayor incremento de peso (Tabla 23) en los animales que ingieren la dieta GNF no se puede atribuir a un mayor consumo de grasa, puesto que este macronutriente, fundamentalmente energético, fue añadido en igual cantidad a todas las dietas experimentales; tampoco se debe a una mayor cantidad de alimento ingerido porque el nivel de la ingesta fue el mismo en los tres grupos (Tabla 19). Hay que admitir que las ratas que ingieren la dieta remojada y no suplementada con fitasa alcanzan un mayor grado de crecimiento (Figura 9) entendiendo éste como una ganancia de peso asociada a una ganancia de proteína, ya que como es sabido un aumento de peso puede deberse a un aumento de grasa o a una retención de agua, factores éstos que no se relacionan con el crecimiento. El mayor grado de crecimiento probablemente se ha producido por una mejor absorción de los hidratos de carbono, como refleja el

aumento significativo del índice I.C.U. (Tabla 23), que valora la relación entre el incremento de peso y el total de hidratos de carbono disponibles ingeridos, que ha permitido preservar la proteína aportada por la dieta para crecer y utilizar la grasa y los hidratos de carbono como fuente de energía.



**GC.**- Harina de Guisante Crudo

**GNF.**- Harina de Guisante Crudo procesado no adicionado de Fytasa

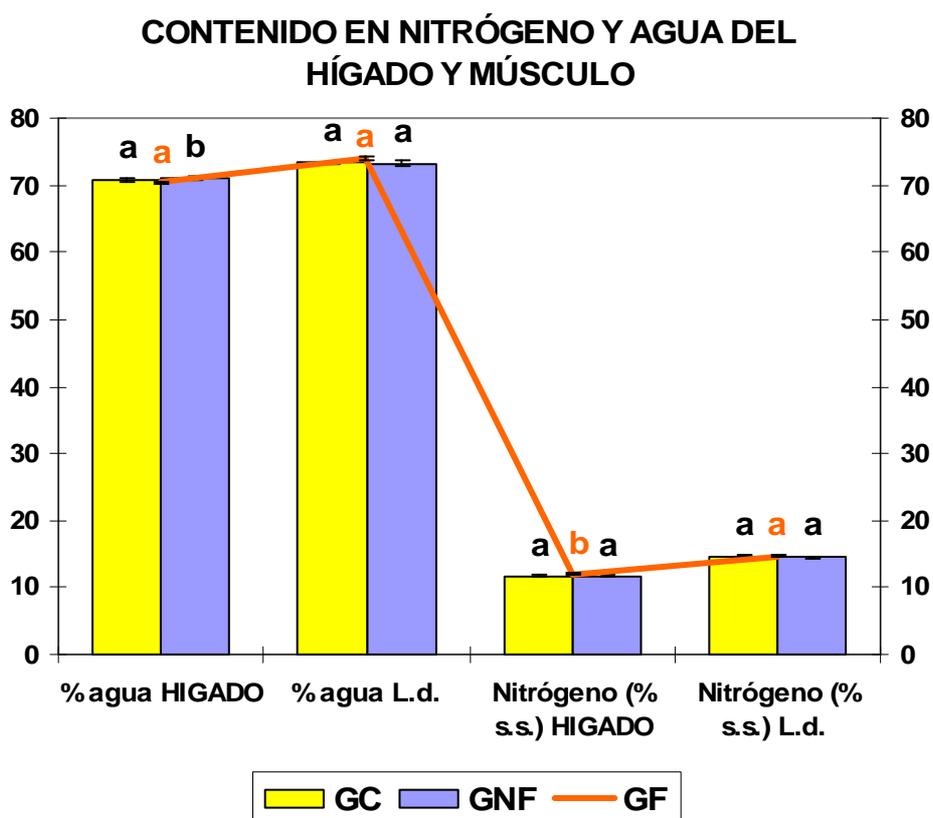
**GF.**- Harina de Guisante Crudo procesado adicionado de Fytasa

**Figura 9.** Efecto de la adición a *Pisum sativum* L. var. *esla* de fytasa comercial en el Incremento de Peso (Inc. Peso), Índice de Coeficiente de Eficacia en Crecimiento (C.E.C.), Índice de Transformación de Sustancia Seca (I.T.S.S.) e Índice de Carbohidratos Utilizables (I.C.U.).

Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por la valoración química de las dietas. Los resultados químicos muestran que el procesado incrementa, en ambas dietas y por igual, la cantidad de azúcares totales disponibles (Tabla 15) que podrían ser absorbidos y utilizados metabólicamente. Sin embargo, su utilización nutritiva no ha sido la misma, tal como demuestran los índices biológicos previamente comentados (Tabla 23; Figura 9).

Al estudiar la composición del hígado (Tabla 25) se observa un porcentaje de

agua significativamente superior en el grupo control sin adición de fitasa (GNF) (Figura 10). Es conocido que cada gramo de glucógeno se almacena en el hígado junto a 4 gramos de agua (Forbes, 1988). Esta elevada cantidad de agua podría indicar una mayor cantidad de hidratos de carbono almacenados en hígado por estas ratas lo que concuerda con la hipótesis de que el tratamiento control sin adición de fitasa facilita la utilización nutritiva de los hidratos de carbono y conduce a un mayor incremento de peso de estas ratas.



**GC.**- Harina de Guisante Crudo

**GNF.**- Harina de Guisante Crudo procesado no adicionado de Fitasa

**GF.**- Harina de Guisante Crudo procesado adicionado de Fitasa

**Figura 10.** Efecto de la adición a *Pisum sativum* L. var. *esla* de fitasa comercial en el contenido en agua y nitrógeno del hígado y músculo *Longissimus dorsi* (L.d.).

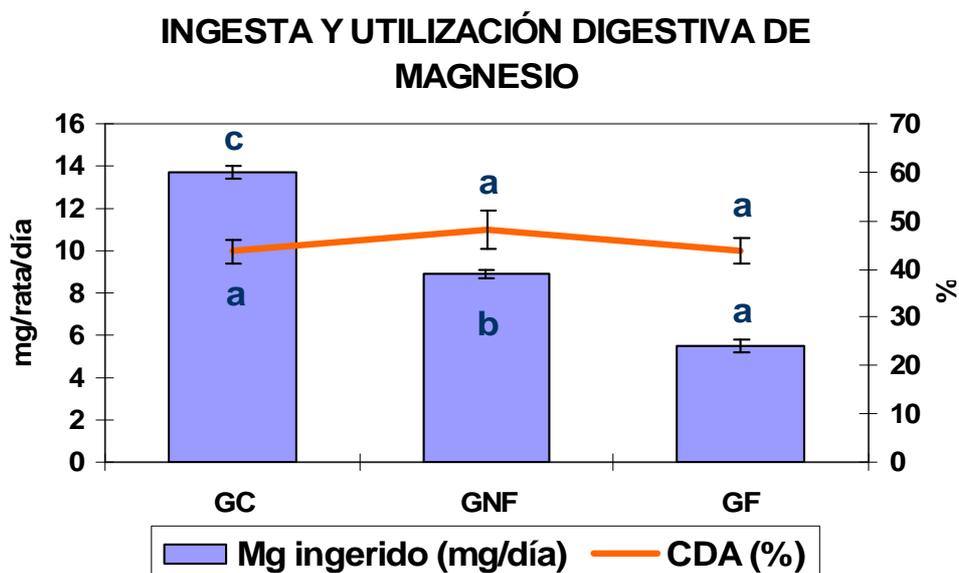
La adición de fitasa a la dieta, si bien reduce el contenido de nitrógeno proteico de la dieta y no produce mejoras sensibles en los índices de utilización nutritiva de la

proteína en estos animales, sí permite un mayor almacenamiento de nitrógeno en el hígado (Figura 10).

Por lo que se refiere al análisis del músculo *Longissimus dorsi* no se han apreciado cambios significativos ni en el contenido en nitrógeno ni en el de agua por lo que parece ser menos sensible a la utilización nutritiva de las dietas (Figura 10).

### 5.2.3. UTILIZACIÓN DIGESTIVA Y METABÓLICA DE MAGNESIO

Las diferencias en la cantidad de magnesio ingerido entre los distintos grupos experimentales son un reflejo de los cambios en el contenido de magnesio de las harinas de guisante crudo y procesado, ya que no existen diferencias significativas en la ingesta de alimento entre los tres grupos experimentales ensayados (Tabla 26).



**GC.**- Harina de Guisante Crudo

**GNF.**- Harina de Guisante Crudo procesado no adicionado de Fitasa

**GF.**- Harina de Guisante Crudo procesado adicionado de Fitasa

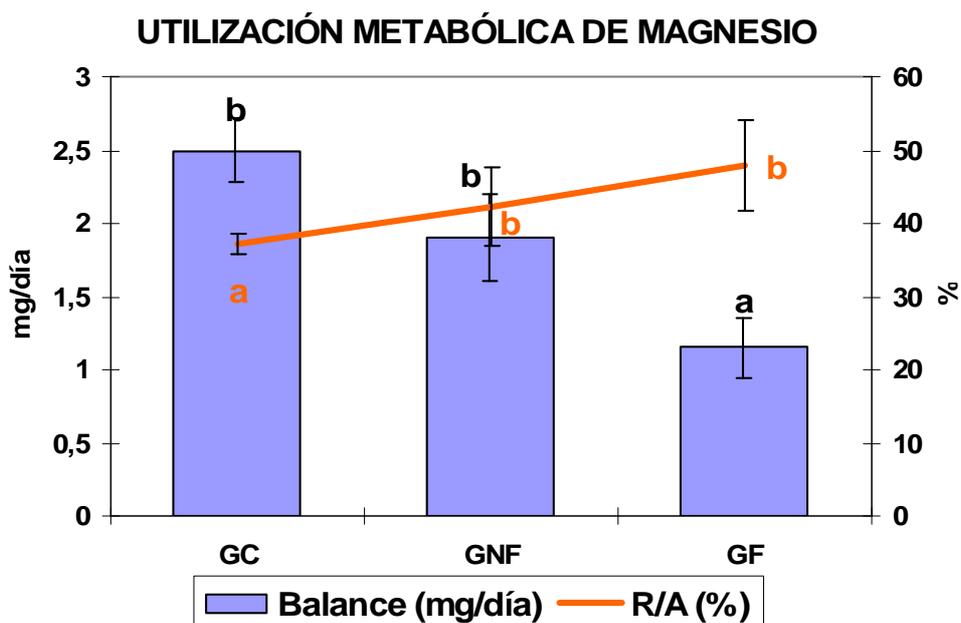
**Figura 11.** Efecto de la adición a *Pisum sativum* L. var. *esla* de fitasa comercial en la Ingesta y Utilización Digestiva de Magnesio.

El contenido de magnesio ingerido con la dieta de harina de guisante crudo es muy superior a los requerimientos nutricionales de la rata en crecimiento [50 mg Mg/100g SS en una ingesta aproximada de 15 g SS/rata/día; (NRC, 1995)]. En el caso de la harina de guisante remojada y sin adición de fitasa, la ingesta es numéricamente superior a las recomendaciones, mientras que en la dieta de harina de guisante remojado y adicionado de fitasa fue inferior. La homeostasis del magnesio en ingestas elevadas o disminuidas del mineral se consigue por la existencia de un mecanismo de regulación a nivel intestinal o renal. En nuestras condiciones experimentales, la regulación a nivel intestinal del magnesio no ha resultado muy eficaz, ya que la utilización digestiva de dicho catión en las tres dietas experimentales juzgada por el CDA no varía a pesar de las diferencias en la cantidad de magnesio ingerido (Figura 11), lo que se ve reflejado en una menor absorción neta de dicho catión en las dietas GNF y GF ( $P < 0.05$ ) con respecto a la dieta GC, existiendo así mismo diferencias significativas entre las dos dietas procesadas.

La menor utilización digestiva de magnesio en la dieta de harina de guisante crudo cuando se compara con una dieta control de caseína-metionina de contenido proteico similar a las dietas experimentales ensayadas (Aranda y col., 2004) se debería a múltiples factores entre los que cabe destacar en primer lugar el elevado contenido de magnesio de la harina de guisante crudo (133.6 mg/100g s.s.), así como la elevada cantidad de fibra de tipo insoluble y el ácido fítico presente en esta dieta que pueden interferir con la disponibilidad del mineral debido al arrastre por solvente en el caso de la fibra insoluble, aunque esto depende del porcentaje de celulosa presente en esta fracción de la fibra dietética, ya que los polisacáridos no celulósicos de la fibra insoluble pueden ser fermentados en el intestino grueso de la rata y contribuir a la buena utilización digestiva de minerales como magnesio o calcio (Younes y col. 1996; López y col., 1998, 2000a y b, 2001; Behall y col., 2002). No parece que en nuestras condiciones experimentales el procesado haya tenido influencia sobre la fibra de las dietas, ya que no aparecen diferencias significativas en el peso de las heces entre los distintos grupos experimentales ensayados (Tabla 23). Con respecto al ácido fítico, es bien conocido su efecto inhibitorio sobre la absorción de magnesio (Pallauf y col., 1998; Nestares y col., 1999; Rimbach y Pallauf, 1999) y otros minerales debido a la formación de complejos insolubles en el pH alcalino del intestino delgado que serán posteriormente excretados en las heces. En otras legumbres, en las que el contenido de magnesio es también elevado así como los niveles de fibra insoluble y ácido fítico,

la utilización digestiva del magnesio fue del mismo orden (Aranda y col., 2004; Urbano y col., 2005c). Otros factores como la relación Ca/Mg o el aporte de vitamina D no creemos que hayan tenido efecto sobre la digestibilidad de magnesio bajo nuestras condiciones experimentales, ya que la relación Ca/Mg no es elevada y el periodo experimental ensayado ha sido corto para que se observe un efecto de la vitamina D que se encuentra acumulada en buena proporción.

La utilización digestiva de magnesio en la dieta de harina de guisante remojado (GNF) (Figura 11) no se ha incrementado a pesar de la menor ingesta del mineral y el descenso en el contenido de inositoles fosfato. Esto puede deberse a que en el medio ácido utilizado para el remojo de la harina de guisante, se ha perdido una importante proporción de magnesio soluble y potencialmente utilizable para el animal, además del que pudiera estar ligado al ácido fítico. Por otra parte, el contenido de fibra insoluble aumenta ligeramente debido a la sobre concentración por efecto de la pérdida de otros componentes solubles como oligosacáridos  $\alpha$ -galactósidos o cenizas. La adición de fitasa a la dieta de harina de guisante remojado (GF) (Figura 11) no ha conducido tampoco a una mejora en la utilización digestiva de magnesio con respecto a las dietas GC o GNF a pesar del descenso adicional en el contenido de inositoles fosfato y de magnesio de la dieta que hace que la ingesta de este mineral esté por debajo de las recomendaciones nutricionales para la rata en crecimiento. Esto nos indicaría que o bien el magnesio remanente en la dieta no es disponible para el animal o bien que en las condiciones presentes en el intestino delgado la fibra insoluble y el mayor aporte de fosfato libre presente en esta dieta tengan gran capacidad de arrastre y complejación del mineral dificultando su absorción (Reinhold y col., 1976). Respecto a la relación entre la fibra dietética y el Mg, Nestares y col. (2003) estudiaron el efecto de la fibra detergente neutra (celulosa, hemicelulosa y lignina) en la utilización digestiva de magnesio sin observar reducciones en este mineral cuando se incrementaban los niveles de celulosa. Algunos artículos demuestran que la fibra dietética no afecta a la retención de minerales (Nickel y col., 1997), aunque muchos factores dietéticos y endógenos podrían influenciar en la biodisponibilidad de minerales cuando la fibra dietética es consumida (Kashumura y col., 1996; Coudray y col., 1997; Lönnerdal, 2000). Delzenne y col. (1995) establecieron que los problemas en la absorción de Mg debidos a la fibra dietética es debida al ácido fítico y el ácido urónico contenidos en las fracciones de fibra.



**Figura 12.** Efecto de la adición a *Pisum sativum* L. var. *esla* de fitasa comercial en la Utilización Metabólica de Magnesio.

El balance de magnesio (Figura 12) de los animales alimentados con la dieta de guisante crudo es significativamente menor que el obtenido para una dieta control de caseína-metionina con similar contenido proteico (Aranda y col.,2004). Este resultado nos indicaría, que a pesar de su elevada absorción similar a la de la dieta patrón, los animales han regulado su metabolismo a nivel renal y han excretado gran cantidad de magnesio por orina, de ahí que el porcentaje de mineral retenido en función del absorbido haya disminuido considerablemente. La excreción urinaria de magnesio en esta legumbre no se encuentra asociada a la proteinuria a diferencia de otras legumbres (Garbanzos, lentejas, judías), ya que la utilización metabólica de la proteína ha sido buena en el guisante (Urbano y col.,2003).

Cuando se compara el balance de magnesio de los animales alimentados con la dieta GNF frente a los que consumen la dieta GC comprobamos que la retención del

cación es muy similar a pesar de que los animales alimentados con la dieta GNF han absorbido mucho menos (Figura 12). Esto se debe a que la excreción urinaria de magnesio disminuyó significativamente en GNF. De ahí que el porcentaje de magnesio retenido en función del absorbido haya aumentado de forma significativa.

La utilización metabólica de magnesio, expresada como %R/A (Figura 12), de los animales alimentados con la dieta de guisante remojado y adicionado de fitasa ha sido también muy elevada y similar a los animales alimentados con la dieta GNF. Sin embargo, a pesar de la evidente regulación renal de magnesio que se observa en este grupo experimental, lo cual se ve reflejado en el descenso de la excreción urinaria, el balance de este mineral fue muy pequeño dada la baja absorción del catión por parte de este grupo experimental y es significativamente menor que en las otras dos dietas ensayadas.

En nuestras condiciones experimentales en las que los animales consumen la dieta durante un periodo de 10 días, la retención de magnesio no guarda relación con el incremento de peso dado que para dos balances significativamente distintos, como los obtenidos en las dietas GC y GF, el incremento de peso en g/rata/día ha sido el mismo, mientras que para dos balances entre los que no se observan diferencias significativas, como es el caso de las dietas GNF y GC, existe una diferencia apreciable ( $P < 0.05$ ) en el incremento de peso que fue 69.5% mayor en GNF. El balance de Mg de los animales alimentados con la dieta de guisante crudo y procesado es significativamente inferior que el obtenido para una dieta de Caseína+Metionina ( $3.11 \pm 0.17$  mg/d, Urbano y col., 2005c) y se debería a la elevada excreción urinaria de dicho catión, ya que la absorción neta es similar. El principal responsable de esta peor utilización sería la calidad de la proteína. Sin embargo, dicho balance es positivo a diferencia de lo observado en judías y garbanzos (Nestares y col., 1997, 2002 y 2003) en los que el balance es prácticamente nulo, a pesar de que la absorción neta de magnesio es similar a la obtenida en el guisante, pero como la calidad proteica obtenida para judías y garbanzos es mas baja que para el guisante (Nestares y col., 1997, 2001 y 2003) se produce una elevación en la proteinuria y se inhibe su reabsorción tubular por lo que se incrementa las pérdidas urinarias de este catión (Brink y col., 1991; Nestares y col., 1993, 1997, 2001 y 2003).

El balance de Mg en animales alimentados con harina de guisantes crudos o sometidos a procesado, con o sin adición de fitasa, guarda relación con la

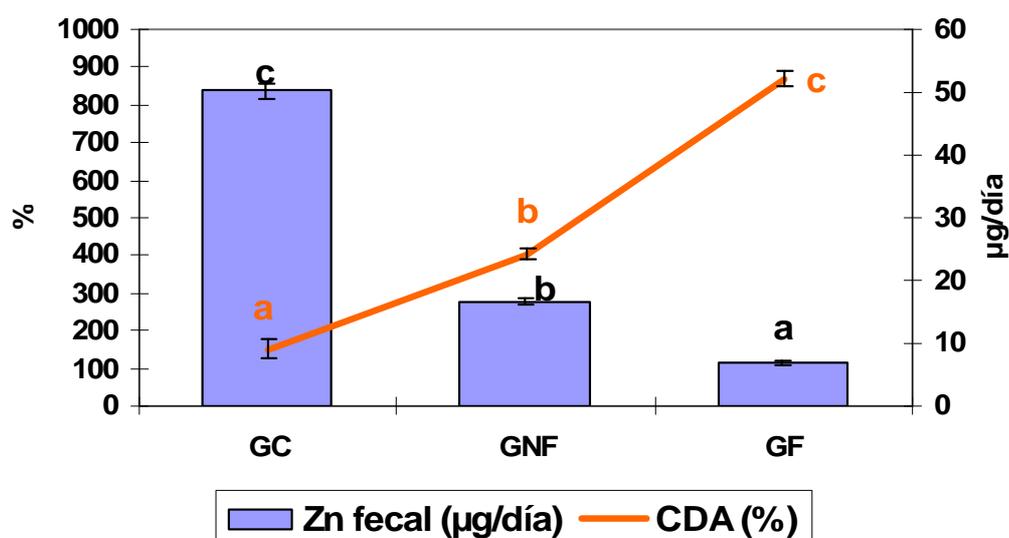
magnesemia, como sucede en otras legumbres (Aranda y col., 2003), y con el contenido de este mineral en esternón y fémur y en menor medida con los niveles sanguíneos. En el caso de riñón y corazón, solo balances muy reducidos parecen repercutir en su contenido.

#### **5.2.4. UTILIZACIÓN DIGESTIVA Y METABÓLICA DE CINCO**

La utilización Digestiva (CDA) de Zn en la dieta de harina de guisante crudo (Figura 13) por parte de los animales con un peso medio de 100 gramos fue superior a la obtenida con esta misma dieta en ratas de 50 gramos de peso (Urbano y col., 2005c) y a la obtenida en lentejas crudas y lentejas sometidas a autoclavado (120° C, 1 atm. durante 30 min.) donde es nula (Porres y col., 1996). Se ha observado que al someter al guisante a un proceso de germinación la utilización digestiva de Zn se eleva considerablemente (Urbano y col., 2005c). En nuestras condiciones experimentales, el CDA de la harina de guisante crudo fue inferior al de una dieta control de caseína-metionina ( $42.6 \pm 1.2\%$ , Urbano y col., 2005c) con similar contenido proteico (20%) debido a la elevada excreción fecal (Figura 13). Esta menor utilización digestiva puede estar causada por distintos factores como el menor contenido de metionina, aminoácido necesario para una buena absorción de este mineral (Schölmerich y col., 1987; House y col., 1997; King y Keen, 1999), la elevada ingesta de este catión (Lønnerdal, 2000), de fibra y de inositoles fostato en relación con el aporte de la dieta patrón (Urbano y col., 2005c). Además, una importante proporción de la fibra ingerida es de naturaleza insoluble y está formada por celulosa, lignina y otros polisacáridos. La celulosa y la lignina no son fermentables a su paso por el intestino grueso (Barry y col., 1995) y son excretados en las heces sin degradar, lo que se ve reflejado en alta peso de las heces observada en el presente experimento (Tabla 23). La dieta de guisante crudo tiene ligeramente menor cantidad de fibra detergente neutra (celulosa, hemicelulosa y lignina) que la judía (Nestares y col., 2003). Rossander y col. (1992) establecieron que la fibra dietética per se tiene un efecto pequeño e incluso nulo en la disponibilidad de Zn. Yonekura y Suzuki (2003) observaron como el quitosán, el almidón resistente (procedente de patata), la pectina y el ácido algínico no presentan efectos inhibidores en la absorción aparente de Zn en dietas libres de fitato, sin embargo, los carragenanos sí producen ligeros efectos

inhibidores sobre la absorción de este mineral. Los polisacáridos no celulósicos presentes en la fibra insoluble y la pequeña proporción de fibra soluble presente en el guisante pueden ser fermentados a su paso por el intestino grueso reduciendo el pH y liberando cinc que podría entonces absorberse (Fairweather-Tait y Wright, 1990; López y col., 1998b; Hara y col., 2001).

### EXCRECIÓN FECAL Y UTILIZACIÓN DIGESTIVA DE CINCO



**GC.**- Harina de Guisante Crudo

**GNF.**- Harina de Guisante Crudo procesado no adicionado de Fitasa

**GF.**- Harina de Guisante Crudo procesado adicionado de Fitasa

**Figura 13.** Efecto de la adición a *Pisum sativum* L. var. *esla* de fitasa comercial en la Excreción Fecal y Utilización Digestiva de Cinc.

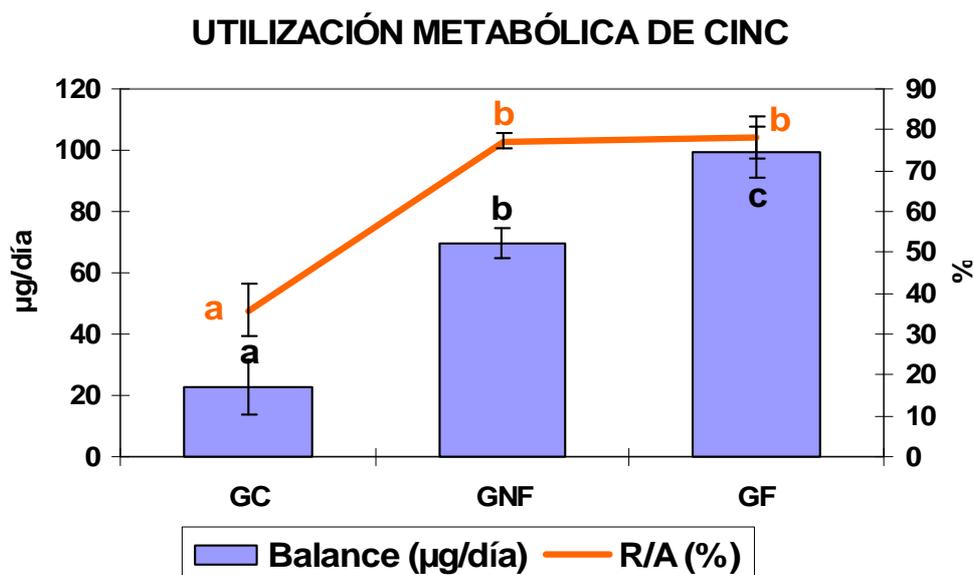
En definitiva la contribución de los distintos factores dietéticos (ácido fítico, fibra soluble, fibra insoluble, lignina) a la baja utilización digestiva de cinc obtenida en nuestras condiciones experimentales se debe fundamentalmente a la presencia de ácido fítico en la dieta. En las condiciones de pH presentes en el estómago, el cinc se libera del ácido fítico. Al llegar al intestino delgado y en las condiciones de pH básico presentes en este segmento del tracto gastrointestinal, el ácido fítico se carga negativamente y da lugar a la formación de complejos insolubles con el cinc de la dieta

y el procedente de las secreciones intestinales dificultando enormemente la absorción de este mineral en el intestino delgado (Zhou y col., 1992; Oberleas, 1996).

En los animales que consumen la dieta de harina de guisantes remojados, sin o con adición de fitasa (GF y GNF), que tienen un menor pH (debido a la presencia del acetato del tampón utilizado durante el remojo para conseguir el punto óptimo de actuación de la enzima fitasa), la utilización digestiva, expresada como CDA, mejoró significativamente (Figura 13) a pesar de que la ingesta de metionina y fibra es similar a la obtenida con la dieta GC y la ingesta de mineral es significativamente menor. En el caso de la dieta GF la utilización digestiva fue similar a la obtenida para una dieta control de Caseína-Metionina. La mejora en la utilización digestiva del cinc (Figura 13) en los animales de ambos grupos experimentales puede deberse no solo a la menor ingesta de cinc, ya que la absorción neta de dicho catión alcanza valores que son 1.5 y 2.2 veces mayores que los obtenidos en los animales alimentados con la dieta GC, sino también a las pérdidas en los niveles de IP6 e IP5 (93 y 3%, respectivamente) y también a la presencia de acetato procedente de la solución tampón utilizada para el remojo. Es conocido que la presencia de ácidos orgánicos puede favorecer la absorción de minerales como cinc o hierro (Pabon y Lönnerdal 1992; Lönnerdal, 2000). Al comparar la dieta GNF con GF se observa un aumento adicional y significativo de la utilización digestiva de cinc que se relaciona con el descenso adicional en la ingesta de cinc y de IP6 e IP5. Esto nos indicaría que al llegar al intestino delgado el cinc procedente de la dieta GF es muy disponible para su absorción y además, al ser la ingesta baja, el animal fuerza su utilización digestiva.

Los animales que consumen la dieta de harina de guisante crudo, a pesar de la baja absorción neta de cinc que presentan, no regulan su excreción urinaria siendo esta muy elevada, lo que ha conducido a una utilización metabólica muy baja juzgada en función del balance y el %R/A (Figura 14). Esta baja utilización metabólica similar a la obtenida para esta misma dieta ensayada en ratas de menor peso ( $32.2 \pm 8.9\%$ , Urbano y col., 2005c), podría atribuirse a que la regulación metabólica del cinc se lleve a cabo cuando la absorción neta del mineral es mayor que la encontrada en los animales alimentados con la dieta de harina de guisante crudo. Por otra parte, es de destacar que en esta dieta, la excreción urinaria de un mineral esencial como es el fósforo es extraordinariamente elevada originando a unos balances nulos de este ión, lo que podría haber dado lugar a una interacción con el cinc.

En las dietas GNF y GF en las que la absorción ha sido superior al GC a pesar de su baja ingesta, los animales han regulado su excreción urinaria disminuyéndola en relación al grupo de animales alimentados con la dieta de harina de guisante crudo y aumentando por tanto el balance y el %R/A (Figura 14). La mejora en la retención de cinc observada en los animales GNF y GF, análogamente a lo que sucedía para el magnesio, no puede justificarse en base al incremento de peso, ya que no existe correlación entre el balance de cinc y la ganancia de peso por parte de los animales.



**GC.-** Harina de Guisante Crudo

**GNF.-** Harina de Guisante Crudo procesado no adicionado de Fitasa

**GF.-** Harina de Guisante Crudo procesado adicionado de Fitasa

**Figura 14.** Efecto de la adición a *Pisum sativum* L. var. *esla* de fitasa comercial en la Utilización Metabólica de Cinc.

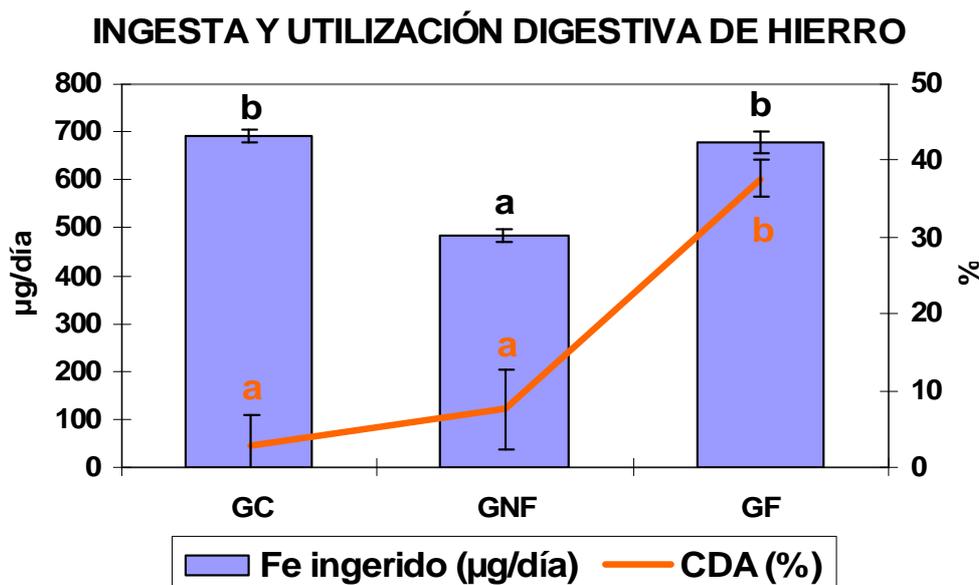
En nuestras condiciones experimentales, la retención de cinc no guarda correlación con el contenido de este mineral en ninguno de los tejidos ensayados, ya que el esternón, el fémur y el riñón de los animales que consumen las dietas GNF y GF en las que la retención de este catión es mayor, son los que tienen menor contenido de cinc, mientras que el contenido de este mineral en el corazón no se modifica.

### 5.2.5. UTILIZACIÓN DIGESTIVA Y METABÓLICA DE HIERRO

La ingesta de hierro por parte de los animales alimentados con las diferentes dietas ensayadas fue suficiente para cubrir los requerimientos nutricionales de la rata en crecimiento (NRC, 1995), incluso en la dieta GNF en el que las pérdidas de Fe han sido un poco más elevadas y en el que la ingesta de hierro es numéricamente inferior a las dietas GC y GF (Figura 15).

Tal como ha sido descrito por Hurrell (1997) y Winndisch (2002) la regulación de la homeostasis del hierro se realiza fundamentalmente a nivel digestivo, y como apenas existe excreción renal, la absorción de Fe sería un término sinónimo a biodisponibilidad.

En nuestras condiciones experimentales, puede considerarse que la utilización digestiva del hierro procedente de la harina de guisante crudo es nula (Figura 15). La práctica totalidad del Fe ingerido no ha sido absorbido de manera análoga a lo descrito por otros autores (Lynch y col., 1984; Fairweather-Tait y Wright, 1985; Alonso y col., 2001) que encuentran una absorción de Fe procedente del guisante nula o muy reducida en comparación a otros minerales como Ca, P o Mg. La baja absorción de Fe obtenida bajo nuestras condiciones experimentales podría deberse a una serie de factores entre los que se encontrarían: 1) La presencia de componentes inhibidores de la absorción de este mineral como inositoles fosfato, taninos, oxalato o componentes estructurales que acomplejan al hierro impidiendo su absorción al paso por el tracto gastrointestinal (Hazell, 1985; Hurrell y col., 1992 y 2003a y b; Lynch, 1997; Theil, 2004), 2) El distinto comportamiento de la ferritina del guisante en relación a la absorción de Fe cuando se compara con el Fe asociado a la ferritina de soja para el que Davila-Hicks y col. (2004) han encontrado una considerable disponibilidad al poderse absorber la ferritina intacta directamente y de forma eficaz en el enterocito, 3) La baja presencia de componentes de la semilla que promueven la absorción de Fe tales como ácidos orgánicos (ácido ascórbico, cítrico, málico, tartárico y láctico) y 4) La formación de péptidos durante la digestión de la proteína del guisante que tengan efecto inhibitor sobre la absorción de hierro al estilo de lo descrito para la conglicina (7S) de la soja (Lynch y col., 1994; Sandberg, 2002a) o las proteínas del altramuza (MacFarlane, 1988).



**GC.**- Harina de Guisante Crudo

**GNF.**- Harina de Guisante Crudo procesado no adicionado de Fitasa

**GF.**- Harina de Guisante Crudo procesado adicionado de Fitasa

**Figura 15.** Efecto de la adición a *Pisum sativum* L. var. *esla* de fitasa comercial en la Ingesta y Utilización Digestiva del Hierro.

Por otra parte, la fracción de hierro unida a los componentes estructurales de la semilla del guisante como es el caso de la fibra dietética, podría liberarse tras su fermentación en el intestino grueso de los animales donde se ha descrito su absorción (Elhardallou y Walker, 1992; Younes y col., 1996; Hara y col., 2000; Urbano y Goñi, 2002). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales no parece que esto haya contribuido significativamente a la absorción del mineral.

El remojo en las condiciones óptimas para la actuación de la fitasa exógena añadida a la harina de guisante no mejoró la absorción de Fe, (Figura 15), a pesar de que tras el remojo permanecería en la harina una cierta cantidad del ácido orgánico utilizado como tampón en la solución de remojo que podría mejorar la disponibilidad del mineral, y de que se observó una pérdida importante de IP6 y probablemente de compuestos fenólicos (Tabla 18). Esta baja utilización digestiva podría deberse a que la pequeña proporción de inositoles P que aun permanecen en la harina (IP6, IP5 e

IP4) son suficientes para inhibir la absorción de Fe. Esto concuerda con lo descrito por Sandberg y Svanberg (1991) que observan que concentraciones de Inositol hexafosfato por encima de 0.5  $\mu\text{mol/g}$  pueden interferir con la absorción de Fe. Lo cual se vería además corroborado por el aumento en la absorción de Fe que se obtiene al adicionar una enzima fitasa comercial durante el proceso de remojo (Figura 15), que da lugar a una disminución en el contenido de IP6 por debajo de las concentraciones molares antes descritas y de la disminución de los niveles de IP5 e IP4 con respecto a la harina remojada, aunque aumenta el contenido de IP3. Podría así mismo pensarse que la mayor absorción neta de Fe en la harina tratada con fitasa se debería a una mayor ingesta de este mineral. Sin embargo la utilización digestiva de dicho catión expresada como CDA, índice de la proporción de Fe absorbido en función del ingerido, también refleja un aumento significativo.

Los inositoles fosfato de menor grado de fosforilización (IP4 e IP3) complejan a un menor número y forman complejos más débiles con los minerales. En relación a la absorción de minerales, diversos estudios indican que cuando se añade separadamente a alimento IP6 e IP5 pero no IP4 e IP3 se inhibe la absorción de Fe y Zn (Sandberg y col., 1989, 1993; Lönnerdal, 1989; Sandström y Sandberg, 1992). Sin embargo, cuando en una mezcla de inositoles están presentes IP4 e IP3 pueden contribuir al efecto negativo en la absorción de Fe (Brune y col., 1992) mediante interacciones con los inositoles fosfato mas fosforilados a través de su unión a minerales (Sandberg y col., 1999). En la dieta de harina de guisante remojada y en la harina de guisante remojada y tratada con fitasa la suma total de inositoles fosfato es prácticamente igual. Es de esperar que debido a la menor proporción en esta última harina de inositoles fosfato con mayor grado de fosforilación (que tienen a nivel individual mayor afinidad por el hierro), a expensas de la generación de IP3, pueda haber dado lugar a la mejora observada en la utilización digestiva del hierro.

A pesar de que la digestibilidad ha aumentado, todavía queda un 70% del Fe que no se absorbe y podría estar asociado a componentes estructurales de la harina de guisante, productos de la digestión o componentes proteicos que no se digieran durante su paso por el tracto gastrointestinal. En la soja, la ferritina aparentemente no se digiere por los enzimas digestivos y pasa intacta al enterocito (Theil, 2001).

Los valores de hemoglobina, hematocrito, hematíes, e índices hematológicos

están dentro de los índices normales para animales de esta edad (Technical bulletin, 1982).

La baja absorción de Fe durante un periodo experimental de 10 días no se ha manifestado en ninguno de los índices que habitualmente se utilizan para el diagnóstico de la deficiencia de hierro por un bajo aporte nutricional como es el número de eritrocitos, hemoglobina o hematocrito (Beard y col., 1996; Chang y col., 2005). Por el contrario, el contenido de dicho catión en el esternón ha resultado ser un mejor indicador de la baja absorción de dicho catión en el periodo experimental estudiado, ya que aparecen diferencias significativas entre los grupos experimentales alimentados con los productos RP, GNF y GF. En nuestras condiciones experimentales, el contenido de Fe en corazón, riñón, y un hueso largo como es el fémur no han guardado relación con la absorción de Fe.

El contenido en Fe en fémur y esternón es superior a lo encontrado en la bibliografía para una dieta de caseína-metionina donde el hierro se encuentra en forma de sales citrato al 100% ( $6.2 \pm 0.3$  y  $9.8 \pm 0.8$  mg/100g s.s., respectivamente) o en una mezcla de citrato férrico (80%) y Fe hemo (20%) ( $5.4 \pm 0.4$  y  $10.3 \pm 1.6$  mg/100g s.s., respectivamente) (Lisbona y col., 1999) o en forma de sales citrato ( $6.4 \pm 0.3$  y  $9.6 \pm 3.0$  mg/100g s.s., respectivamente), sulfato ( $6.2 \pm 3.2$  y  $8.7 \pm 13.1$  mg/100g s.s., respectivamente) o ascorbato ( $7.2 \pm 3.1$  y  $7.5 \pm 9.9$  mg/100g s.s., respectivamente) (Pallares y col., 1996).

A nivel humano la mayoría de los factores corporales que afectan la absorción de hierro no reflejan su efecto hasta que transcurren varios días (Finch y col., 1978; Hahn y col., 1940). Este retraso es atribuido a los dos o tres días de vida media que tiene el enterocito (Conrad y col., 1987). Otra posibilidad es que esta situación requiere de varios días de retraso para que afecte a la eritropoyesis y a la producción de receptores de la transferrina.

## VI. CONCLUSIONES

### ***Influencia de la adición de fitasa en condiciones óptimas de actuación a *Pisum sativum*, L. var. Esla sobre la valoración biológica de proteína, hidratos de carbono, magnesio, cinc y hierro***

El procesado de la harina de guisantes en las condiciones óptimas de actuación de la enzima fitasa y posterior eliminación del agua y compuestos solubilizados después del procesado ha dado lugar a una mejora en la utilización digestiva de la proteína como consecuencia de la disminución de los inhibidores de la tripsina y a una buena utilización nutritiva de los hidratos de carbono que han sido utilizados con fines energéticos, favoreciendo el depósito de proteína y el incremento de peso de los animales. Además, aunque las pérdidas de cinc y magnesio han sido muy elevadas como consecuencia del procesado la eliminación de un 78% de ácido fítico ha dado lugar a un aumento en la biodisponibilidad de estos minerales remanentes en la legumbre, no modificándose la absorción de hierro.

La adición de fitasa a la harina de guisantes y la posterior eliminación del agua e inositoles fosfato solubilizados (93% de pérdida) ha dado lugar a una harina funcional de elevada calidad nutricional por la buena utilización digestiva y metabólica del hierro así como de la proteína, magnesio y cinc. La mejora de la utilización digestiva de hierro, cinc y magnesio causada por la adición de fitasa se debe a que el ácido fítico se ha transformado en inositoles fosfato de menor grado de fosforilación, que en el intestino delgado del animal no precipitan con tanta eficacia a los cationes estudiados, favoreciendo su absorción, cuando se compara al proceso de remojo sin adición de enzima fitasa.

### **CONCLUSIÓN GENERAL**

La harina funcional de guisantes obtenida mediante la adición de enzima fitasa presenta un contenido mínimo de factores no-nutritivos, una alta biodisponibilidad del hierro y una buena calidad nutricional del resto de los nutrientes estudiados, por lo que es de indudable interés para la preparación de productos dietéticos de alto valor nutritivo que pueden ser recomendados en nutrición humana en situaciones fisiológicas y/o patológicas de grandes demandas de aporte de hierro.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Moniem EM, Honke H, Bednorska A. 2000. Effect of frying various legumes under optimum conditions on amino acids, in vitro protein digestibility, phytate and oligosaccharides. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 57-62.
- Abd El-Rahman AA, Abd El-Aleem IM. 1996. Effect of microwave treatment on the antinutritional factors and proteins of field beans. *Ann. Agric. Sci. Moshtohot.*, 34, 235-247.
- Abdel-Hamid YAR. 1983. Effect of cooking on triptophan, basic amino acids, protein solubility and retention of some vitamins in two varieties of chickpea. *Food Chem.*, 11, 139-143.
- Abel-Gaward AS. 1993. Effects of domestic processing on oligosaccharide content of some dry legume seeds. *Food Chem.*, 46, 25-31.
- Adsule RN. 1976. Studies on the Effect of Sprouting and Cooking on Some Biochemical Factors Affecting Nutritive Value of Common Indian Pulses, Ph. D. thesis, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi.
- Adsule RN, Barat GK. 1984. Trypsin inhibitor activity in the seeds of common Indian pulses, National Seminar on New Dimensions in Pulses Research and Development, Jawaharlal Nehru Krishi Vishwa Vidyalaya, Jabalpur, India, May 21. Vol. 4, pp. 23-31.
- Adsule RN, Lawande KM, Kadam SS. 1989. Pea. In: *Handbook of World Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology and Utilization*. Eds. D. K. Salunkhe, S. S. Kadam. CRC Press, Boca Raton, Florida, Vol. III, pp. 215-251.
- Adsule RN, Kadam SS. 1989. Proteins. In: *Handbook of World Food Legumes*; Salunkhe, D. K., Kadam, S. S., Eds. CRC Press, Boca Raton, FL, Vol. I, pp 75-97.
- Agriculture and Agri-Food Canada. 2000. Dry peas: situation and outlook. *Bi-weekly Bulletin*, 13-19.
- AIN (American Institute of Nutrition). Reeves, PG, Nielsen, FH, Fahey Jr, GC. 1993. Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76<sup>a</sup> rodent diet. *J. Nutrition*. 123: 1939-1951.
- Akalu G, Tufvesson F, Jönsson C, Baboo M. 1998. Nair physico- chemical characteristics and functional properties of starch and dietary fibre in grass pea seeds. *Starch/Stärke* 50, (9) 374-382.
- Albrink MJ, Newman T, Davidson PC. 1979. Effect of high and low fiber diets on plasma lipids and insulin. *Am. J. Clin. Nutr.* 32, 1486-1491.
- Alfin-Slater RB. 1977. New concepts of the role of essential fatty acids, *J. Am. Oil*

- Chem. Soc., 34, 574-582.
- Ali R, Staub H, Coccoordrill G, Schambachert L. 1981. Nutritional significance of dietary fiber: effect on nutrient bioavailability and selected gastrointestinal functions, J. Agric. Food Chem., 29, 465-470.
- Almeida NG, Calderón de la Barca AM, Mauro EV. 1991. Effect of different heat treatments on the nutritional activity of *Phaseolus vulgaris* (variety Ojo de Cabra) lectin. J Agric. Food Chem. 39, 1627-1630.
- Alonso R, Grant G, Dewey P, Marzo F. 2000a. Nutritional assessment in vitro and in vivo of raw and extruded peas (*Pisum sativum* L.). J. Agric. Food Chem., 48, 2286-2290.
- Alonso R, Orúe E, Zabalza MJ, y col. 2000b. Effect of extrusion cooking on structure and functional properties of pea and kidney bean proteins. J. Sci. Food Agric., 80, 397-403.
- Alonso R, Aguirre A, Marzo M. 2000c. Effects of extrusion and traditional processing methods of antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba bean and kidney beans. Food Chem., 68, 159-165.
- Alonso R, Rubio LA, Muzquiz M, Marzo F. 2001. The effect of extrusion cooking on mineral bioavailability in pea and kidney bean seed meals. Anim. Feed Sci. Technol., 94, 1-13.
- Ambe S, Ambe F, Nozuki T. 1987. Mössbauer study of iron in soybean seeds. J Agric Food Chem., 35, 292-296.
- Andersen RL, Rackis JJ, Tallent WH. 1979. Biologically active substances in soy products. In Soy Protein and Human Nutrition; Wilcke, H.L., Waggle, D.H., Eds.: Academic: New York, 209-217.
- Anderson G. 1963. Effect of iron/phosphorus ratio and acid concentration on the precipitation of ferric inositol hexahosphate. J. Sci. Food Agric. 14, 352-357.
- Anderson H, Nävert B, Bingham SA, Englyst HN, Cummings JH. 1983. The effect of breads containing similar amounts of phytate but different amounts of wheat bran on calcium, zinc and iron balance in man. Br. J. Nutr., 50, 503-510.
- Anderson RJ. 1914. A contribution to the chemistry of phytin. J. Biol. Chem. 17, 171-176.
- Anon. 1975. PAG Statement 22: Upgrading human nutrition through the improvement of food legumes, in Nutritional Improvement of Food Legumes by Breeding, Milher, M., E., John Wiley & Sons, New York, 349-352.
- Anuario Estadístico de Agroalimentaria del 2000 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- AOAC. Official Methods of Analysis. 1995. 16 th ed.: Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC.

- Aranda P, Dostalova J, Frias J, Lopez-Jurado M, Kozłowska H, Pokorny J, Urbano G, Vidal-Valverde, Zdyunczyk Z. 2000. Nutrition en: Carbohydrates in grain legumes seeds. Improving nutritional quality and agronomic characteristics. (Ed) C.L. Hedley, CABI Publishing. Norwich. UK. pp 61-88.
- Aranda P, López-Jurado M, Fernández M, Moreu MC, Porres JM, Urbano G. 2004. Bioavailability of calcium and magnesium from faba beans (*Vicia faba* L var major), soaked in different pH solutions and cooked, in growing rats. *J. Sci. Food Agric.*, 84, 1514-1520.
- Aranda Ramírez C. 2004. Biodisponibilidad de proteínas, carbohidratos, magnesio y zinc de guisantes. Efecto de la germinación. Tesis Doctoral. Fac. de Farmacia. Univ. de Granada.
- Asada K, Tanaka K, Kasai Z. 1969. Formation of phytic acid in cereal grains. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 165, 801-807.
- Asp NG. 1989. Bioavailability of food carbohydrates as related to analytical methods. Nutrient availability: Chemical and biological aspects. D.A.T. Southgate, I.T. Johnson, G.R. Fenwick, eds. Royal Society of Chemistry, Cambridge., pp 301-309.
- August D, Janghorbani M, Young V. 1989. Determination of zinc and copper absorption at three dietary Zn-Cu ratios by using stable isotope methods in young adult and elderly subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 50, 1457-1463.
- Baba S, Ohta A, Ohtsuki M, Takizawa T, Adachi T, Hara H. 1996. Fructo-oligosaccharides stimulate the absorption of magnesium from the hindgut in rats. *Nutr. Res.* 16, 657-666.
- Bach Knudsen KE. 1997. Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Anim. Feed Sci. Technol.* 67, 319-338.
- Bacon Jr, Lambert N, Matthews P, Arthur AE, Duchene DJ. 1995. Genotype, environment and Genotype X environment effects on trypsin-inhibitor in peas. *J. Sci. Food Agric.*, 67, 101-108.
- Bagheri S, Fontaine N, Pointillard A, Guéguen L. 1982. Influence des fibres et des phytates sur l'utilisation des mine'raux chez le Porc. In *Physiologie digestiVe chez le Porc*; Laplace, J. P., Corring, T., Rerat, A., Eds.; Institut National de la Recherche Agronomique: Paris, France, pp 247-260.
- Bajaj S, Mickelsen O, Baker LR, Markarim D. 1971a. The quality of protein in various lines of peas, *Br. J. Nutr.* 25, 207-212.
- Bajaj S, Mickelsen O, Lillievil NA, Baker CR, Bergen WG, Gill JL. 1971b. Prediction of protein efficiency ratio of peas from their albumin content, *Crop Sci.* 11, 813-818.
- Ballot D, Baynes RD, Bothwell TH. 1987. The effects of fruit juices and fruits on the absorption of iron from a rice meal. *Br. J. Nutr.*, 57 (3), 331-343.

- Ballot DE, MacPhail AP, Bothwell TH, Gillooly M, Mayet FG. 1987. Fortification of curry powder with NaFe(111)EDTA in an iron-deficient population: Initial survey of iron status. *Am. J. Clin. Nutr.*, 49 (1), 156-161.
- Banduski RS, Axelrod B. 1951. Chromatography of biologically important esters. *J. Biol. Sci.* 193, 405-410.
- Barnes RH, Flala G, Kwong E. 1965. Prevention of coprophagy in the rat and the growth stimulating effects os methionine, cystine and penicillin when added to an unheated soybeans. *J. Nutr.* 85, 127-131.
- Barré MR. 1956. Influence de l'acide phytique sur la digestion pepsique de différentes proteines. *Ann. Pharm. Fr.* 14, 182-187.
- Barry JL, Hoebler C, Macfarlane GT, Macfarlane S, Mathers JC, Reed KA, Mortensen PB, Nordgaard I, Rowland IR, Rumney CJ. 1995. Estimation of the fermentability of dietary fibre in vitro: a European interlaboratory study. *Br. J. Nutr.*, 74, 303-322.
- Barton JC, Conrad ME, Parmley RT. 1983. Calcium inhibition of inorganic iron absorption in rats. *Gastroenterology.*, 84 (1), 90-101.
- Baten A, Ullah A, Tomazic VJ, Shamsuddin AM. 1989 .Inositol-phosphate-induced enhancement of natural killer cell activity correlates with tumor suppression. *Carcinogenesis.* 10, 1595–1598.
- Bau H-M, Villaume C, Nicolas J-P, Méjean L. 1997. Effect of germination on chemical composition, biochemical constituents and antinutritional factors of soya bean (*Glycine max*) seeds. *J. Sci. Food Agric.* 73, 1-9.
- Baudet J, Cousin R, Masse J. 1977. Topographical study of weight and protein content of the pea seed (*Pisum sativum*) following its localization on the plant in Protein Quality From Leguminous Crops, Commission of European Communities Coordination of Agricultural Research, 316-321.
- Beal L, Finney PL, Mehta T. 1984. Effects of germination and dietary calcium on zinc bioavailability from peas. *J. Food Sci.* 49, 637-642.
- Beal L, Mehta T. 1985. Zinc and phytate distribution in peas. Influence of heat treatment, germination, pH, substrate, and phosphorus on pea phytate and phytase. *J. Food Sci.* 50, 96-100.
- Becker R, Olson AC, Doris PF, Kon S, Gumbmann MR, Wagner JR. 1974. Conditions for the autolysis of alphagalactosides and phytic acid in California small white beans. *J. Food. Sci.* 39, 766-769.
- Beers S, Jongbloed AW. 1992. Effect of supplementary *Aspergillus ficuum* phytase in diets for piglets on their performance and apparent digestibility of phosphorus. *Anim. Prod.* 55, 425-430.
- Behall KM, Howe JC, Anderson RA. 2002. Apparent mineral retention is similar in control and hyperinsulinemic men after consumption of high amylose cornstarch. *Am. Soc. Nutr. Sci.* 1886-1991.

- Behall KM, Scholfield DJ, Lee K, Powell AS, Moser PB. 1987. Mineral balance in adult men: effect of four refined fibres. *Am. J. Clin. Nutr.* 46, 307-314.
- Bender AE and Miller DS. 1953. A new brief method of estimating net protein value. *Biochem. J.* 53: VIII.
- Berlyne GM, BenAri J, Nord E, Shaikin R. 1973. Beduoin osteomalacia due to calcium deprivation caused by high phytic acid content of unleavened bread. *Am. J. Clin. Nutr.* 26, 910-914.
- Berridge MJ, Irvine RF. 1989. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature.* 341, 197-205.
- Bettger WJ, O'Dell BL. 1993. Physiological roles of zinc in the membrane of mammalian cells. *J. Nutr. Biochem.* 4, 194-207.
- Beutler, E. 1988. The common anemias. *J. Am. Med. Assoc.*, 259 (16), 2433-2437.
- Bhatty RS, Wu KK. 1974. Determination of gross energy of cereals and legumes with a ballistic bomb calorimeter. *Can. J. Plant Sci.* 54, 439-445.
- Bianchetti R, Sartinara ML. 1967. The mechanism of the repression by inorganic phosphate of phytase synthesis in the germination wheat embryo. *Biochim. Biophys. Acta.* 145, 485-490.
- Biliaderis CG, Grant DR, Vose JR. 1979. Molecular weight distribution of legume starches by gel chromatography. *Cereal Chem.* 56, 475-481.
- Biliaderis CG, Maurice TJ, Vose JR. 1980. Starch gelatinization phenomenon studied by differential scanning calorimetry. *J. Food Sci.* 45, 1669-1674.
- Bishnoi S, Khetarpaul N. 1994. Saponin content and trypsin inhibitor of pea cultivars: effect of domestic processin and cooking methods. *J. Food Sci. Technol.* 31, 73-76.
- Bitar K, Reinhold JG. 1971. Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosae of rat, chicken, calf, and man. *Bioch. Biophysic. Acta*, 268, 442-452.
- Björck I, Asp NG, Birkhed D, Eliasson AC, Sjöberg LB, Lundquist I. 1984b. Effects of processing on starch availability in vitro and in vivo; II Drum-drying of wheat flours and starch. *J. Cer. Sci.* 2, 165-178.
- Björck I, Asp NG, Birkhed D, Lundquist I. 1984a. Effects of processing on availability of starch for digestion in vitro and in vivo; I Extrusion cooking of wheat flours and starch. *J. Cer. Sci.* 2, 91-103.
- Bohn T, Davidsson L, Walczyk T, Hurrell RF. 2004. Phytic acid added to white-wheat bread inhibits fractional apparent magnesium absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79, 418-423.

- Boling SD, Parsons CM, Baker DH. 1998. Citric acid improves phytate phosphorus utilization in broiler chicks fed corn-soybean meal diets. S. Poultr. Sci. Soc./S. Conf. on Avian Diseases Abstracts, 31S-37S.
- Bollmann O, Strother S, Hoffmann-Ostrehof O. 1980. The enzymes involved in the synthesis of phytic acid in *Lemna gibba*. (Studies on the biosynthesis of cyclitols. XL). Mol. Cel. Biol. 30, 171-175.
- Booth MA, Allan GL, Frances J, Parkinson S. 2001. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch (*Bidyanus bidyanus*) IV. Effects of dehulling and protein concentration on digestibility of grain legumes. Aquaculture., 196, 67-85.
- Bornet FRJ. Undigestible sugars in food products. Am J Clin Nutr 1994; 59: 763S-9S.
- Bos KD, Verbeek C, Peter van Eeden CH, Slump P, Wolters MGE. 1991. Improved determination of phytate by ion-exchange chromatography. J. Agric. Food. Chem. 39, 1770-1772.
- Bothwell TH, Charlton RW. 1979. Current problems of iron overload. Recent Results in Cancer Research. 69, 87-95.
- Bothwell TH, Baynes RD, MacFarlane BJ, MacPhail AP. 1989. Nutritional iron requirements and food iron absorption. J. Int. Med., 226 (5), 357-365.
- Bottinger L E, Carlson LA. 1980. Risk factors for ischaemic vascular death for men in the Stockholm perspective study. Atherosclerosis. 39, 389-408.
- Boulter D, Derbyshire E. 1971. Taxonomic aspects of the structure of legume proteins, in Chemotaxonomy of Leguminosae, Harborne, J. B., Boulter, D., and Turner, B. L., Eds., Academic Press, London, 285-295.
- Boulter D, Derbyshire E. 1978. The general properties, classification and distribution of plant proteins, in Plant Proteins, Norton, G., Ed., Butterworths, London, 3-9.
- Bressani R, Elias LG, Braham JE. 1982. Reduction of digestibility of legume proteins by tannins. J. Plant Foods. 4, 43-48.
- Bressani R, Elias LG. 1974. Legume foods, in New Protein Foods, Altschul, A. M., Ed., Academic Press, New York., Vol. 1, 230-238.
- Brighenti F, Casiraghi MC, Baggio C. 1998. Resistant starch in the Italian diet. Br. J. Nutr. 80, 333-341.
- Brink EJ, Dekker PR, Van Berestejin ECH, Beynen AC. 1991. Inhibitory effect of dietary soybean protein vs casein on magnesium absorption in rats. J. Nutr., 121, 1374-1381.
- Brink EJ, Beynen AC. 1992. Nutrition and magnesium absorption: a review. Prog. Food Nutr. Sci. 16, 125-162.

- Brune M, Rossander-Hulthen L, Hallberg L, Gleerup A, Sandberg AS. 1992. Iron absorption from bread in humans: inhibiting effects of cereal fiber, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups. *J. Nutr.* 122, 442-449.
- Bruno-Soares AM, Abreua JMF, Guedesb CVM, Dias-da-SilvaAnimal AA. 2000. Chemical composition, DM and NDF degradation kinetics in rumen of seven legume straws. *Feed Sci. Technol.*, 83, 75-80.
- Burel C, Boujard T, Tulli F, Kauskhik SJ. 2000. Digestibility of extruded peas, extruded lupin, and rapeseed meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 188, 285-298.
- Burkitt DP. 1973. Some diseases characteristic of moder western societies. *Br. Med. J.* 1, 274-278.
- Burton JW, Harlow C, Theil EC. 1998. Evidence for reutilization of nodule iron in soybean seed development. *J Plant Nutr.*, 21, 913–927.
- Butler LG, Bos KD. 1993. Analysis and characterization of tannins in faba beans, cereals and other seeds. A literature review. In: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seed*. A. F. B. van der Poel, J. Huisman and H.S. Saini (Eds.) Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands. pp. 81-90.
- Button C L, Thompson LU, Jenkins DJA. 1984. Activities of indigenous phytic acid and added sodium phytate in lowering the digestibility of legumes. *Proc. Can. Fed. Boil. Soc.* 27, 73-76.
- Button CL, Thompson LU, Jenkins DJA. 1985. Influence of phytic acid and calcium on starch digestibility, glycemic response and carbohydrate malabsorption. *Proc. Can. Fed. Boil. Soc.* 28, 137-142.
- Caldwell ML, Kung JT. 1953. A study of the influence of a number of factors upon the stability and activity of pancreatic amylase. *J. Am. Chem. Soc.* 75, 3132-3135.
- Calloway DH, Hickey CA, Murphy EL. 1971. Reduction of intestinal gas forming properties of legumes by traditional and experimental food processing methods. *J. Food Sci.* 36, 251-258.
- Campbell GI, van der Poel, AFB. 1993. Use of enzymes and process technology to inactivate antinutritional factors in legume seeds and rapessed. In *Recent Advances of Research in Antinutritional factors in Legume Seeds*; van der Poel, A. F. B., Huisman, J., Saini, H. S., Eds: Wageningen Pers: Wageningen, 1993; pp 419-434.
- Campbell J, Bellen JC, Baker RJ, Cook DJ. 1981. Technetium-99m calcium phytate optimisation of calcium content for liver and spleen scintigraphy. *J. Nucl. Med.* 22: 157-160.
- Camus MC, Laporte JD. 1976. Inhibition de la proteolyse pepsique in vitro par le ble de L'Acide Phytiquedes issues, *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 16, 719-724.

- Caribe N, Bach Knudsen KE, Eggum BO. 1997a. Digestibility and nitrogen balance in rats given dried and toasted peas (*Pisum sativum*) of different years of harvest. *J. Sci. Food Agric.*, 73, 21-33.
- Caribe N, Bach Knudsen KE. 1997b. Digestibility of dried and toasted peas in pigs. 1. Ileal and total tract digestibilities of carbohydrates. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 64, 293-310.
- Caribe N, Eggum BO. 1997c. Digestibility of dried and toasted peas in pigs. 2. Ileal and total tract digestibilities of amino acids, protein and other nutrients. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 64, 311-325.
- Carrington AL, Calcutt NA, Ettlinger CB, Gustafsson T, Tomlinson DR. 1993. Effects of treatment with myo-inositol or its 1,2,6-trisphosphate (PP56) on nerve conduction in streptozotocin-diabetic. *Eur. J. Pharmac.* 237, 257–263.
- Carrol RW, Hensley GW, Sittler CL, Wilcox EL, Graham WR Jr. 1953. Absorption of N and amino acids from soybean meal as affected by heat treatment or supplementation with aureomycin and methionine. *Arch. Biochem. Biophys.* 45, 260-269.
- Cawlay RW, Mitchell TA. 1968. Inhibition of wheat alpha amylase by brain phytic acid. *J. Sci. Food Agric.* 19, 106-110.
- Cerning-Beroard J, Filiatre A. 1976. A comparison of the carbohydrate composition of legume seeds: horse bean, peas and lupines. *Cereal Chem.* 53, 966-970.
- Challiss RA, Safrany ST, Potter BV, Nahorski SR. 1991. Intracellular recognition sites for inositol 1,4,5-triphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate. *Biochemical Society Transaction.* 19, 888-893.
- Champ M, Gourgue N, Faisant N, Leclerc C. 1994. Glycemic response to starchy food: Importance of dietary fiber per se versus fiber in relation to food structure. In *Physicochemical Properties of Dietary Fibre and Effect of Processing on Micronutrients Availability*; Amado R, Barry JL, Frollich W., Eds.; Commission of the European Communities: Belgium; pp 95-103.
- Champagne ET, Phillippy BQ. 1989. Effects of pH on calcium, zinc, and phytate solubilities and complexes following in vitro digestions of soy protein isolate. *J. Food. Sci.* 54, 587-592.
- Champagne ET. 1988. Effects of pH on mineral-phytate, protein-mineral-phytate, and mineral-fiber interactions. Possible consequences of atrophic gastritis on mineral bioavailability from high-fiber foods. *J. Am. Coll. Nutr.* 7, 499-508.
- Chang KC, Harrold RL. 1988. Changes in selected biochemical components, *in vitro* protein digestibility and amino acids in two bean cultivars during germination. *J. Food. Sci.*, 53, 783-787.
- Chang R. 1977. Phytate: removal from whole dry beans by enzymatic hydrolysis and diffusion. *J. Food Sci.* 42, 4-8.

- Charles C, Feillet-Coudray C, Grizard D, Tressol JC, Gueux E, Rayssiguier Y. 2002. fractional intestinal absorption of magnesium is directly proportional to dietary magnesium intake in rats. *Am. Soc. Nutr. Sci.* 2043-2047.
- Chau CF, Cheung PCK. 1997. Effect of various processing methods on antinutrientes and in vitro digestibility of protein and starch of two Chinese indigenous legume seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4773-4776.
- Chen LH, Pan SH. 1977. Decrease in phytate during germination of pea seeds (*Pisum sativum*). *Nutr. Rep. Int.* 16, 125-129.
- Chen LH, Thacker R. 1978. Germination and nitrogenous constituents of pea seeds (*Pisum sativum*). *J. Food Sci.* 43, 1884-1885.
- Chen LH, Wells CE, Fordham JR. 1975. Germinated seeds for human consumption. *J. Food Sci.*, 40, 1290-1294.
- Cherry JR, Fidantsef AL. 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology.*, 14, 438-443.
- Cheryan M, Anderson FW, Grynspan F. 1983. Magnesium-phytate complexes: effect of pH and molar ratio on solubility characteristics. *Cereal Chem.* 60, 235-237.
- Cheryan M. 1980. Phytic acid interactions in food systems, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 13, 297- 335.
- Chesson A. 1995. Oligosaccharides feed additives. In *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*. VCH Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim, Germany, 233-245.
- Chitra U, Singh U, Rao PV. 1996. Phytic acid, in vitro protein digestibility, dietary fiber and minerals of pulses as influenced by processing methods. *Plant. Food. Hum. Nutr.*, 49, 307-316.
- Cho CH. 1991. Zinc: absorption and role in gastrointestinal metabolism and disorders. *Diges. Dis.* 9, 49-60.
- Churella HR, Vivian VM. 1989. Effect of phytic acid level in soy protein based infant formulas of mineral bioavailability in the rat. *J. Agric. Food Chem.* 37, 1352-1357.
- Chutkow J. 1964. Sites of magnesium absorption and excretion in the intestinal tract of the rat. *J. Lab. Clin. Med.* 63, 71-79.
- Claxon A, Morris C, Blake D y col. 1990. The anti-inflammatory effects of d-myo-inositol-1,2,6-trisphosphate (PP56) on animal models of inflammation. *Agents Actions.* 29, 68-70.
- Comer FW, Fry MK. 1978. Purification, modification and properties of air-classified pea starch, *Cereal Chem.* 55, 818-822.

- Conan L., Carré B. 1989. Effect of autoclaving on metabolizable energy value of smooth pea seed (*Pisum sativum*) in growing chicks. *Anim. Feed Sci. Technol.* 26, 337-345.
- Condomina J, Zornoza-Sabina T, Granero L, Polache A. 2002. Kinetics of zinc transport in vitro in rat small intestine and colon: interaction with copper. *Eur. J. Pharm. Sci.* 16, 289-295.
- Conrad ME, Benjamin BI, Williams HL, Foy AL. 1967. Human absorption of hemoglobin-iron. *Gastroenterology.*, 53 (1), 5-10.
- Conrad ME, Parmley RT, Osterloh K. 1987. Small intestinal regulation of iron absorption in the rat. *J. Lab. Clin. Med.*, 110, 418-426.
- Conrad ME, Umbreit JN. 1993. A concise review: Iron absorption - The mucin-mobilferrin-integrin pathway. A competitive pathway for metal absorption. *Am.J. Hematology.*, 42 (1), 67-73.
- Contardi A. 1910. Phosphoric esters of some polyvalent alcohols and some carbohydrates. *Atti Acad. Naz. Lincei, Cl. Sci. Fis., Mat. Nat. Rend.* 19, 823-826.
- Cook JD, Barry WE, Hershko C. 1973. Iron kinetics with emphasis on iron overload. *Am. J. Pathology.*, 72 (2), 337-343.
- Cook JD, Monsen ER. 1976. Food iron absorption in human subjects. III. Comparison of the effect of animal proteins on nonheme iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.*, 29 (8), 859-867.
- Cook JD, Monsen ER. 1977. Vitamin C, the common cold, and iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.*, 30, 235-41.
- Cook JD, Morck TA, Skikne BS, Lynch SR. 1981. Biochemical determinants of iron absorption. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 77, 323-31.
- Cook JD, Bothwell TH, Crichton RR, Dallman PR, Drysdale JW, Hallberg L, Halliday J, Worwood M. 1990. Revised recommendations for the measurements of the serum iron in human blood. *Br. J. Haematology.*, 75 (4), 615-616.
- Cook JD, Reddy MB, Burri J, Juillerat MA, Hurrell RF. 1997. The influence of different cereal grains on iron absorption from infant cereal foods. *Am. J. Clin. Nutr.*, 65, 964-969.
- Cooper JR, Gowing HS. 1983. Mammalian small intestine phytase (EC 3.1.3.8). *Br. J. Nutr.* 50, 673-678.
- Cosgrove DJ. 1966. The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates. *Rev. Pure Appl. Chem.* 16, 209-211.
- Cosgrove DJ. 1970. Inositol phosphate phosphatases of microbial origin. *Aust. J. Biol. Sci.* 23, 1207-1220.

- Costello AJR, Glonek T, Myers TC. 1976. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance-pH titrations of myoinositol hexaphosphate. *Carbohydr. Res.* 46, 159-164.
- Coudray C, Bellanger J, Castiglia-Delavaud C, Rémésy C, Vermorel M, Rayssiguier Y. 1997. Effect of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. *Eur. J. Clin. Nutr.* 51, 375-380.
- Coudray C, Feillet-Coudray C, Grizard D, Tressol JC, Gueux E, Rayssiguier Y. 2002. Fractional intestinal absorption of magnesium is directly proportional to dietary magnesium intake in rats. *Am. Soc. Nutr. Sci.*, 2043-2047.
- Courtois J. 1947. Reserches sur la phytase. III. Essais de separation de l'activite glycerophosphatasique et de l'activite phytasique du son de ble. *Biochim. Biophys. Acta.* 1, 270-277.
- Crean DEC, Haisman DR. 1963. The interaction between phytate and divalente cations during cooking of dried peas. *J. Sci. Food Agric.* 14, 824-827.
- Creveu-Gabriel I, Carre B, Gomez J, Quillien L, Gueguen J, Berot S, Melcion JP. 1998. Pea (*Pisum sativum* L.) protein digestion in broilers. 3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes. Valladolid. Part I, 14-15.
- Crichton RR, Ponce-Ortiz Y, Koch MH, Parfait R, Stuhmann R. 1978. Isolation and Characterization of Phytoferritin from Pea (*Pisum sativum*) and Lentil (*Lens esculenta*). *Biochem. J.*, 171, 349-356.
- Cristofaro E, Mottu F and Wuhrman JJ. 1974. Involvement of raffinose family oligosaccharides in flatulence, in *Sugars in Nutrition*, Sipple, H. L. and McNatt, K. W., Eds., Academic Press, New York, 313-315.
- Cristofaro E, Mattu G, Wuhrmann JJ. 1975. *Sugars in Nutrition*. Academic Press, New York., pp. 313-317.
- Crofton RW, Gvozdanovic D, Gvozdanovic S, Khin CC, Brunt PW, Mowat NAG, Aggett PJ. 1989. Inorganic zinc and the intestinal absorption of ferrous iron. *Am. J. Clin. Nutr.*, 50 (1), 141-144.
- Cromwell GI, Coffey RD, Parker GR, Monegue HJ, Randolph JH. 1995. Efficacy of a recombinant derived phytase in improving the bioavailability of phosphorus in corn-soybean meal diets for pigs. *J. Anim. Sci.* 71, 1831-1840.
- Cruickshank EWH, Duckworth J, Kosterlitz HW, Warnock GM. 1945. The digestibility of the phytate-P of oatmeal in adult man. *J. Physiol.* 104, 41-46.
- Cruz-Suarez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, McCallum I, Hickling D. 2001. Assessment of differently processed feed pea (*Pisum sativum*) meals and canola meal (*Brassica* sp.) in diets for blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). *Aquaculture.*, 196, 87-104.

- Cummings JH, Englyst HN, Wiggins H. 1986. The role of carbohydrates in lower gut function. *Nutr. Rev.* 44, 50-54.
- Cummings JH. 1985. Diet and short chain fatty acids in the gut. In: *Food and the Gut*. Ed: Hunter, JO, Alun Jones, V. Bailliere Tindall. London. pp. 78-93.
- Cummings JH. 1993. Dietary fibre intakes in Europe: an overview. In J. Cummings, & W. Frolich, *Food Tecnology, dietary intake in Europe- a survey of the Cost 92 concerted action on "metabolic and physiological aspects of dietary fibre in food"* commission of the European communities Brussels: DG XII, B-1049 Rue de la Loi., Vol. 200, pp. 11-19.
- Christensen JM, Ghannam M, Ayres JW. 1984. Effects of divalent amino acids on iron absorption. *J. Pharm. Sci.*, 73 (9), 1245-1248.
- Dahlqvist A, Semenza G. 1985. Disaccharidases of small-intestinal mucosa. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 14, 857-867.
- Dallman, P.R. 1986. Biochemical basis for the manifestations of iron deficiency. *Ann. Rev. Nutr.*, 6, 13-40.
- Dalqvist A. 1964. Method for assay of intesimal disaccharidases. *Anal. Biochem.* 7, 18-21.
- Daniel D, Sundarraj P, Thulsidas G. 1957. *Botany of Field Crops*, The MacMillan Company of India, 1970-1973.
- Daveby YD, Razdan A, Aman P. 1998. Effect of particle size and enzyme supplementation of diets based on dehulled peas on the nutritive value for broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 74, 229-239.
- Davidsson L, Galan P, Kastenmayer P, Cherouvrier F, Juillerat MA, Hercberg S, Hurrell RF. 1994. Iron bioavailability studied in infants: The influence of phytic acid and ascorbic acid in infant formulas based on soy isolate. *Pediatric Research.*, 36, 816-822.
- Davidsson L, Galan P, Cherouvrier F, y col. 1997. Iron bioavailability from infant cereals by infants: the effect of dephytinization. *Am. J. Clin. Nutr.*, 65, 916-920.
- Davidsson L, Kastenmayer P, Szajewska H, Hurrell RF, Barclay D. 2000. Iron bioavailability in infants from an infant cereal fortified with ferric pyrophosphate or ferrous fumarate. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 1597-1602.
- Davidsson L, Dimitriou T, Walczyk T, Richard F, Hurrell RF. 2001. Iron absorption from experimental infant formulas based on pea (*Pisum sativum*)-protein isolate: the effect of phytic acid and ascorbic acid. *Br. J. Nutr.*, 85, 59-63.
- Davidsson L. 2003. Approaches to improve iron bioavailability from complementary foods. *J. Nutr.*, 133 (5), 1560S-1562S.
- Davidsson SS, Passmore R. 1970. In: *Human Nutrition and Dietetics*. Williams and

- Wilkins. Baltimore. Maryland. pp. 105-109.
- Davies DR. 1993. The pea crop, in: Peas, genetics, molecular biology and biotechnology. (Eds. R. Casey, D. R. Davies). CAB International, Oxon, pp. 1-12.
- Davies NT, Nightingale R. 1975. The effects of phytate on intestinal absorption and secretion of zinc and whole body retention of Zn, Cu, Fe and Mn in rats. *Br. J. Nutr.* 34, 243-247.
- Davies NT. 1982. Effects of phytic acid on mineral availability, in *Dietary Fiber in Health and Disease*, Vahouny, G. V. and Kritchevsky, O., Eds., Plenum Press, New York, 105-108.
- De Lumen BO. 1992. Molecular strategies to improve protein quality and reduce flatulence in legumes: a review. *Food Structure*, 11, 33-46.
- De Rham O, Jost TJ. 1979. Phytate protein interactions in soybean extracts and low phytate soy protein products. *J. Food Sci.* 44, 596-600.
- Delzenne NM, Aertssens J, Verplaetse H, Roccaro M, Roberfroid M. 1995. Effect of fermentable fructo-oligosaccharide on mineral, nitrogen and energy digestive balance in the rat. *Life Sci.* 57, 1579-1587.
- Delzenne NM, Roberfroid MR. 1994. Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. *Lebensm.-Wiss. U Technol.* 27, 1-6.
- Demjen A, Thompson LU. 1991. Calcium and phytic acid independently lower the glycemic response to a glucose load. In: *Proc. 34th Can. Fed. Biol. Soc. Meeting. Canadian Federation of Biological Societies. Ottawa. Canada.* pp. 53-58.
- Derman DP, Bothwell TH, Torrance JD. 1982. Iron absorption from ferritin and ferric hydroxide. *Scandinavian Journal of Haematology.*, 29 (1), 18-24.
- Deshpande SS, Cheryan M. 1984. Effects of phytic acid, divalent cations and their interactions on alpha amylase activity. *J. Food Sci.* 49. 516-519.
- Deshpande SS, Damodaran S. 1989. Effect of phytate on solubility, activity and conformation of trypsin and chymotrypsin. *J. Food Sci.* 54, 695-699.
- Donangelo CM, Woodhouse LR, King SM, Viteri FE, King JC. 2002. Supplemental zinc lowers measures of iron status in young women with low iron reserves. *Am. Soc. Nutr. Sci.* 1860-1864.
- Doughty J, Walker A. 1982. *Etude FAO: Alimentation et Nutrition*; FAO: Rome, Italy, 53-57.
- Duane WC. 1997. Effects of legume consumption on serum cholesterol, biliary lipids, and sterol metabolism in humans. *J. Lipid. Res.*, 38, 1120-1128.
- Duhan A, Khetarpaul N, Bishnoi S. 2002. Content of phytic acid and HCl-extractability

- of calcium, phosphorus and iron as affected by various domestic processing and cooking methods. *Food Chem.*, 78, 9-14.
- Duke JA. 1983. *Handbook of legumes of World Economic Importance*. Plenum Press, New York, 18-24.
- Duranti M, Gius C. 1997. Legume seeds: protein content and nutritional value. *Field Crops Res.* 53, 31-45.
- Eastwood D, Laidman DL. 1971. The mobilization of macronutrient elements in the germination of wheat grain. *Phytochem.* 10, 1275-1284.
- Ebihara K, Okano J, Miyata T. 1994. Comparison of ferrous and ferric iron bioavailability following rat cecal infusion. *Nutr. Res.*, 14 (2), 221-228.
- Edijala JK. 1980. Effects of processing on the thiamin, riboflavin and protein content of cowpeas (*Vigna unguiculata* (L) Walp.). I. Soaking, cooking and wet milling processes. *J. Food Technol.*, 15, 435-443.
- Edwards DG, Porter PD, Dean J. 1985. The responses of rats to various combinations of energy and proteins. 1. Diet made from purified ingredients. *Laboratory Animals.* 19, 328-335.
- Edwards HM. 1992. Dietary, 1,25-dihydroxycholecalciferol supplementation increases natural phytate phosphorus utilization in chickens. *J. Nutr.* 123, 567-577.
- Ekholm P, Virkki L, Ylinen M, Johansson L, Varo P. 2000. The effects of natural chelating agents on the solubility of some physiologically important mineral elements in oat bran and oat flakes. *Cereal Chem.*, 77, 562-566.
- Ekholm P, Virkki L, Ylinen M, Johansson L. 2003. The effect of phytic acid and some natural chelating agents on the solubility of mineral elements in oat bran. *Food Chem.*, 80, 165-170.
- EI Hendy HA, Yousef MI, El-Naga NIA. 2001. Effect of dietary zinc deficiency on hematological and biochemical parameters and concentrations of zinc, copper, and iron in growing rats. *Toxicol.* 167, 163-170.
- El-Adawy TA, Rahma EH, El-Bedawy A.A, Sobihah TY. 2000. Effect of soaking process on nutritional quality and protein solubility of some legume seeds. *Nahrung.*, 44, 339-343.
- El-Adawy TA. 2002. Nutritional composition and antinutritional factors of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) undergoing different cooking methods and germination. *Plant Foods Hum. Nutr.* 57(1), 83-97.
- Elhardallou SB, Walker AF. 1992. Binding of iron by three starchy legumes in the presence of iron alone, with calcium or with calcium, zinc, magnesium and copper. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 43, 61-68.

- Elhardallou SB, Walker AF. 1999. The effect of multi-mineral mix (Fe, Zn, Ca and Cu) on magnesium binding to starchy legumes under simulated gastrointestinal conditions. *Food Chem.* 67, 113-121.
- Elkhalil EAI, El Tinay AH, Mohamed BE, Elsheikk EAE. 2001. Effect of malt pretreatment on phytic acid and in vitro protein digestibility of sorghum flour. *Food Chem.* 72, 29-32.
- Elkowicz K, Sosulski FW. 1982. Antinutritive factors in eleven legues and their air classified proteína and starch fracción. *J. Food. Sci.* 47, 1301-1307.
- Ellis R, Morris ER, Hill AD, Andersson HLL, McCarron PB. 1986. Effect of level of calcium intake on in vivo hydrolysis of dietary phytate. *Fed. Proc.* 374-377.
- Ellis R, Morris ER, Philpot C. 1977. Quantitative determination of phytate in the presence of high inorganic phosphate. *Anal. Biochem.* 77, 537-541.
- El-Shami ZA. 1993. The effect of antinutrientes of soybean, lentil and faba bean on the rate of their protein digestibility by trypsin or pepsin. 4<sup>th</sup> Conf. Agric. Dev. Res., Ain-Shams Univ., Cairo, 13-18 Feb-1993. *Annals Agric. Sci.*, Sep. Issue, 1, 283-292.
- Empson KL, Labuza TP, Graf E. 1991. Phytic acid as a food antioxidant. *J. Food Sci.* 56, 560-563.
- Englyst HN, Bingham SA, Wiggins HS. 1982a. Nonstarch polysaccharides consumption in four Scandinavian populations. *Nutr. Cancer.* 4, 50-52.
- Englyst HN, Cummings JH, Trowell HW, Southgate DAT. 1987. Dietary fiber and resistant starch. *Am. J. Clin. Nutr.* 46, 873-874.
- Englyst HN, Wiggins HS, Cummings JH. 1982b. Clasification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur. J. Clin. Nutr.* 46, S33-S50.
- Eppendorfer WH, Bills SW. 1974. Amino Acid composition as a function of total N in pea seeds grown on two soils with P and K conditions. *Plant Soil.* 41, 33-37.
- Erdman JW Jr., 1981. Bioavailability of trace minerals from cereals and legumes. *Cereal Chem.* 58, 21-26.
- Ersöz A, Akgün H, Aras NK. 1990. Determination of phytate in turkish diet by phosphorus-31 fourier transform nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 38, 733-735.
- Eskin NAM, Wiebe S. 1983. Changes in phytase activity and phytate during germination of two fababean cultivars. *J. Food Sci.* 48, 270-271.
- Evans M, Boulter D. 1980. Crude protein and sulphur amino acid contents of some commercial varieties of peas and beans. *J. Sci. Food Agric.* 31, 238-242.
- Evans WJ, Martin CJ. 1988. Interactions of Mg (II), Co (II), Ni (II) and Zn (II) with phytic

- acid. VIII. A calorimetric study. *J. Inorg. Biochem.* 32, 259-264.
- Faergeman T. 1994. Food enzymes: specific and efficient process agents with a bright future. *Food Technol. Eur.*, 2, 42-44.
- Fairbanks DJ. 2000. Development of genetic resistance to iron-deficiency chlorosis in soybean. *J. Plant Nutr.*, 23, 1903-1913.
- Fairweather-Tait SJ, Wright AJ. 1985. Iron availability from peas (*Pisum sativum*) and bread containing added pea testa in rats. *Br. J. Nutr.*, 53, 193-197.
- Fairweather-Tait SJ, Wright AJ. 1990. The effects of sugar-beet fiber and wheat bran on iron and zinc absorption in rats. *Br. J. Nutr.*, 64, 547-552.
- Fairweather-Tait SJ, Hurrell RF. 1996. Bioavailability of minerals and trace elements. *Nutr. Res. Rev.*, 9, 295-324.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 1970. Amino Acid Content of Foods and Biological Data on Proteins, Food and Agriculture Organization, Rome., Nutritional studies No. 24.
- FAO. 1982. Production Year Book, Food and Agriculture Organization, Rome.
- FAO. 1998. FAOSTAT Database, Crops. Primary and Domain.
- FAO. 2000. FAOSTAT statistics database – Agriculture, Rome, Italy.
- FAO. 2000. Production Year Book, Food and Agriculture Organization, Rome.
- FAO. 2001. FAOSTAT statistics database.
- FAO/WHO, Report, 1977. Dietary Fats and Oils in Human Nutrition, Food and Agriculture Organization, Rome.
- FAO/WHO. 1966. Protein requirements. Meeting on Nutrition and Advances. FAO. Roma. nº 37.
- Favier AE. 1992. The role of zinc in reproduction: hormonal mechanisms. *Biol. Trace Elem. Res.* 32, 363-382.
- Ferket PR. 1991. Effect of diet on gut microflora of poultry. *Zootecnica Int.* 7-8, 44-49.
- Fernandez MM, Aranda P, López-Jurado M, Urbano G, Estrella I, Sotomayor C, Díaz C, Frias J, Prodanov M, Vidal-Valverde C. 1993. Effect of processing on some antinutritive factors of *Vicia faba*. Influence on protein digestibility and food intake in rats. In: Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds. Ed: A.F.B. Van der Poel, J. Huisman and H.S. Saini. H. S. Wageningen Press. Wageningen. The Netherlands. pp. 467-471.
- Fernandez MM, López-Jurado M, Moreu MC, Porres J, García-Fuentes MA, Frias J,

- Aranda P, Urbano G. 1994. Effect of processing on phytate phosphorus of faba bean (*Vicia faba* L. var. major). Influence on bioavailability of phosphorus in rats. In: Bioactive Substances in Food of Plant Origin. Eds: H. Kozłowska, J. Fornal, Z. Zdunczyk., 327-334.
- Fernandez, M.; Lopez-Jurado, M.; Aranda, P.; Urbano, G. 1996. Nutritional assessment of raw and processed faba bean (*Vicia faba* L.) cultivar major in growing rats. J. Agric. Food. Chem., 44, 2766-2772.
- Fernández M, Aranda P, Lopez-Jurado M, M.A. García - Fuentes, Urbano G. 1997. Bioavailability of phytic acid phosphorus in processed *Vicia faba* L. var. Major. J. Agric. Food Chem. 45, 4367-4371.
- Finch CA, Ragan HA, Dyer IA, Cook JD. 1978. Body iron loss in animals. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 159, 335-338.
- Fine KD, Santa Ana CA, Porter JL, Fordtran JS. 1991. Intestinal absorption of magnesium from food and supplements. J. Clin. Investig. 88, 396-402.
- Fisher H. 1992. Low-calcium diets enhance phytate-phosphorus availability. Nutr. Rev. 50, 170-171.
- Fleck H. 1981. Introduction to nutrition. Macmillan Publishing Co. New York, V. 8, 88-89.
- Fleming SE. 1981. A study of the relationship between flatus potential and carbohydrates distribution in legume seeds. J. Food Sci. 46, 794-803.
- Fleming SE. 1982. Influence of cooking method on digestibility of legume and cereal starches. J. Food Sci. 47, 1-6.
- Fontinhas-Fernandes A, Gomes E, Reis-Henriques MA, Coimbra J. 1999. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of Nile tilapia: digestibility and growth performance. Aquaculture Int.,7, 57-67.
- Forbes GB. 1988. Body composition: influence of nutrition, illness, growth and age. In Modern nutrition in Health and Disease, Shils, M. E., Young, L., Eds.; Williams and Wilkins: Baltimore, MD., pp 12-17.
- Forbes RM. 1964. Mineral utilization in the rat III. Effects of calcium, phosphorus, lactose and source of protein in zinc-deficient and in zinc-adequate diets. J. Nutr. 83, 225-233.
- Ford JR, Mustakas CG, Schmutz RD. 1978. Phytic acid removal from soybeans by a lipid protein concentrate process. J. Am. Oil. Chem. Soc. 55, 371-375.
- Fordyce EJ, Forbes RM, Robbins KR, Erdman Jr JW. 1987. Phytate x calcium/zinc molar ratios: are they predictive of zinc bioavailability? J. Food Sci. 52, 440-444.
- Fornal L, Ciepielewska D. 1991. Observation of pea flower feeding by influencing

- resistance of faba bean seeds to storage insect pests. *Nahrung*, 39, 295-301.
- Fox MRS, Tao SH. 1989. Antinutritive effects of phytic acid and other phosphorylated derivatives. *Nutr. Toxicol.* 3, 59-65.
- Fredrikson M, Larsson Alminger M, Carlsson NG, Sandberg AS. 2001. Phytate content and phytate degradation by endogenous phytase in pea (*Pisum sativum*). *J. Sci. Food. Agric.* 81, 1139-1144.
- Frias J. 1990. Estudio sobre los carbohidratos solubles y componentes de la fibra alimentaria en leguminosas crudas y procesadas. Memoria de Licenciatura. Fac. Farmacia. Univ. Alcalá de Henares.
- Frias, J. 1992. Eliminación de  $\alpha$ -galactosidos en lentejas (*Lens culinaris*) mediante procesado. Efecto en el contenido en almidón y en fibra alimentaria. Ph.D. Dissertation, Universidad de Alcalá de Henares, pp 170-184.
- Frias J, Hedley C, Price K, Fenwick GR, Vidal-Valverde C. 1994. Improved method of oligosaccharide analysis for genetic study of legume seeds. *J. Liquid. Chromatog.*, 17, 2469-2483.
- Frias J, Días-Pollan C, Hedley CL and Vidal-Valverde C. 1995a. Evolution of trypsin inhibitor activity during germination of lentils. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2231-2234.
- Frías J, Prodanov M, Sierra I, Vidal-Valverde C. 1995b. Effect of light on carbohydrates and hydrosoluble vitamins of lentils during soaking. *J. Food. Protection.* 58, 692-695.
- Frías J, Diaz-Pollan C, Hedley CL, Vidal-Valverde C. 1996a. Evolution and kinetics of monosaccharides, disaccharides and  $\alpha$ -galactosides during germination of lentils. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 202, 35-39.
- Frías J, Vidal-Valverde C, Kozłowska H, Tabera J, Honke J, Hedley CL. 1996b. Natural fermentation of lentils. Influence of time, flour concentration, and temperature on the kinetics of monosaccharides, disaccharides and alpha-galactosides. *J. Agric. Food Chem.* 44, 579-584.
- Frías J, Vicente G, Pascual-Montaner M, Morales P and Vidal-Valverde C. 1998. An assessment of variation of antinutritional factors in pea seeds. 3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes. Valladolid. Part II, 166-167.
- Frías J, Vidal-Valverde C, Sotomayor C, Diaz-Pollan C, Urbano G. 2000. Influence of processing on available carbohydrate content and antinutritional factors of chickpeas. *Eur. Food Res. Technol.*, 210, 340–345.
- Frías J, Doblado R, Vidal-Valverde C. 2001. Actino of endo/exo  $\alpha$ -galactosidas in the  $\alpha$ -galactoside content of legume seeds. 4<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes. Cracow. Part I, 140-141.
- Frías J, Doblado R, Antezana JR, Vidal-Valverde C. 2003a. Inositol phosphate degradation by the action of phytase enzyme in legume seeds. *Food Chem.* 81. 233-239.

- Frías J, Doblado R, Vidal-Valverde C. 2003b. kinetics of soluble carbohydrates by action of endo/exo  $\alpha$ -galactosidase enzyme in lentils and peas. Eur. Food Res. Technol., 216, 199-203.
- Fritz HP, Lippert B, Possinger K, Hartenstein R. 1977. Investigations of biologically active ligands. XII. Metal complexes of maleic acid hydrazide and their physiologic action on Yoshida sarcoma ascites cells. Z. Naturforsch. Ausg. B., 32 (4), 393-400.
- Funk T, Pahl H, Carlon JR. 2001. Advantages and restrictions of grain legume production in Spain. 4<sup>th</sup> European Conference on Grain Legumes. Cracow. Part II, 343-347.
- Gad SS, Mohamed MS, El-Zalaki EM, Mohasseb ZS. 1982. Effect of processing on phosphorus and phytic acid contents of some Egyptian varieties of legumes. Food Chem., 8, 11-19.
- Galan P, Preziosi P, Durlach V, Valeix P, Ribas L, Bouzid D, Favier A, Hercberg S. 1997. Dietary magnesium intake in a French adult population. Magnes. Res. 10, 321-328.
- Ganiats TG, Norcross WA, Halverson AL, Burford PA, Palinkas LA. 1994. Does Beano prevent gas? A double-blind cross-over study of oral alpha-galactosidase to treat dietary oligosaccharide intolerance. Journal of Family Practice, 39, 441-445.
- García-Villanova R, García-Villanova R, Ruiz de Lope C. 1982. Determination of phytic acid by complexometric titration of excess of iron (III). Analyst. 107, 1503-1506.
- Gargova S, Roshkova Z, Vancheva G. 1997. Screening of fungi for phytase production. Biotechn. Techn. 11, 221-224.
- Gatel F and Grosjean F. 1990. Composition and nutritive value of peas for pigs: a review of European results. Lives. Prod. Sci. 26, 155-175.
- Gatel F, Champ M. 1998. Grain legumes in human and animal nutrition- up to date result and question marks. 3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes. Valladolid. Part II, 7-11.
- Gatel F. 1994. Protein quality of legume seeds for non-ruminant animals- a literature review. Anim. Feed Sci. Technol. 45, 317-348.
- Gazy MA. 1990. Effect of gamma-irradiation on some antinutritional factors in kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. J. Agric. Res. Dev., 30, 734-739.
- Geervani P and Theophilus F. 1981. Studies on digestibility of selected legume carbohydrates and its impact on the pH of the gastrointestinal tract in rats. J. Sci. Food Agric. 32, 71-76.
- Geervani P, and Devi U. 1988. Effect of maturation on nutritive composition of selected vegetables legumes. J. Sci. Food Agric., 46, 243-248.

- Gelencsér E, Hajós G, Zdunczyk Z and Jedrychowski L. 1998. Content of lectins in respect to the levels of protein and other antinutritional factors in polish pea cultivars. 3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes. Valladolid. Part II, 170-171.
- Gentry HS. 1971. Pisum resources: a preliminary survey, Plant Genet. Resources Newsl. 25, 3-6.
- Giami SY, Cibor BS, Edebiri KE, Achinewhu SC. 1999. Changes in nitrogenous and other chemical constituents, protein fractions and in vitro protein digestibility of germination fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis Hook*) seed. Plant Foods Hum. Nutr., 53, 333-342.
- Giese J. 1994. Proteins as ingredients: types, functions, applications. Food Technol. 48, 50-60.
- Gifford-Steffen SR and FM Clydesdale. 1993. Effect of varying concentrations of phytate, calcium and Zinc on the solubility of protein, calcium, zinc, and phytate in soy protein concentrate. J. Food. Prot. 56, 24-26.
- Gillooly M, Bothwell TH, Charlton RW. 1984. Factors affecting the absorption of iron from cereals. Br. J. Nutr., 51 (1), 37-46.
- Gitzelman P and Auricchio S. 1965. The handling of soy alpha-galactosidase by a normal and galactosemic child. Pediatrics 56, 231-232.
- Goodlad JS, Mathers JC. 1992. Digestion of complex carbohydrates and large bowel fermentation in rats fed on raw and cooked peas (*Pisum sativum*). Br. J. Nutr. 67, 475-488.
- Gopalan C, Ramasastri BV and Subramanian SC. 1982. Nutritive Value of Indian Foods, National Institute of Nutrition, Indian Council of Medical Research, Hyderabad, pp. 59-64.
- Gorospe MJ, Vidal-Valverde C, Frías J. 1992. The effect of processing on phytic acid content of lentils. In: Proceedings of the 1<sup>st</sup> European Conference on Grain Legume. Angers, France. pp. 425-426.
- Gouveia A, Davies SJ. 1998. Preliminary nutritional evaluation of pea seed meal (*Pisum sativum*) for juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture., 166, 311-320.
- Grady JK, Chen Y, Chasteen ND, Harris DC. 1989. Hydroxyl radical production during oxidative deposition of iron in ferritin. J. Biol. Chem., 264 (34), 20224-20229.
- Graf E, Dintzis FR. 1982. Determination of phytic acid in foods by high performance liquid chromatography. J. Agric. Food Chem. 30, 1094-1099.
- Graf E, Mahoney JR, Bryant RG, Eaton JW. 1984. Ironcatalysed hydroxyl radical formation: stringent requirements for free iron coordination site. J. Biol. Chem. 259, 362-365.

- Graf E, Eaton JW. 1985. Dietary suppression of colonic cancer: fiber or phytate? *Cancer*. 56, 717-718.
- Graf E, Eaton JW. 1993. Suppression of colonic cancer by dietary phytic acid. *Nutr. Cancer*. 19, 11-19.
- Grala W, Verstegen MWA, Jansman AJM, Huisman J, Van Leeuwen P. 1999. Apparent protein digestibility and recovery of endogenous nitrogen at the terminal ileum of pigs fed diets containing various soybean products, peas or rapeseed hulls. *Animal Feed Sci. Tech.*, 80, 231-245.
- Grant DF, Lawrence JM. 1979. Effects of sodium dodecyl sulphate and other dissociating reagents on the globulins of peas. *Arch. Biochem. Biophys.* 108, 552-557.
- Grant G, Dorward PM, Buchan WC, Armour JC and Pusztai A. 1995. Consumption of diets containing raw soybeans (*Glycine max*), kidney beans (*Phaseolus vulgaris*), cowpeas (*Vigna unguiculata*) or lupinseeds (*Lupinus angustifolius*) by rats for up to 700 days: effects on body composition and organ weights. *British J. Nutr.* 73, 17-29.
- Grant G, Dorward PM, Pusztai A. 1993. Pancreatic enlargement is evident in rats fed diets containing raw soybeans (*Glycine max*), cowpeas (*Vigna unguiculata*) for 800 days but not in those fed diets based in kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) or lupinseeds (*Lupinus angustifolius*). *J. Nutr.*, 123, 2207-2215.
- Graude F, Anderson JT, Keys A. 1965. Effect of carbohydrates of leguminous seeds, wheat and potatoes on serum cholesterol concentration in man. *J. Nutr.* 86, 313-316.
- Greenwood CT, Thomas J. 1962. Physiocochemical studies on starches-fractionation and characterization of starches of various plant origins. *J. Chem. Soc.* 54, 222-227.
- Greenwood JS, Bewley JD. 1984. Subcellular distribution of phytin in the endosperm of developing castor bean: a possibility for its synthesis in the cytoplasm prior to deposition within protein bodies. *Planta*. 160, 113-120.
- Greiner R, Haller E, Konietzny U, Jany K-D. 1997. Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 341, 201-206.
- Greiner R, Konietzny U, Jany K-D. 1993. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 303, 107-113.
- Griffiths DW. 1981. Polyphenolic content and enzyme inhibitor activity of testas from bean (*Vicia faba*) and pea (*Pisum spp.*) varieties. *J. Sci. Food Agric.* 32, 797-802.
- Griffiths D.W. 1984. The trypsin and chymotrypsin inhibitor activities of various pea (*Pisum spp.*) and field bean (*Vicia faba*) cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 35, 481-487.

- Grizard D, Barthomeuf C. 1999. Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of production and beneficial effects on animal and human health. *Reproduction Nutrition Development*, 39, 563-588.
- Gueguen J, Van Oort MG, Quillien L, Helsing M. 1993. The composition, biochemical characteristics and analysis of proteinaceous antinutritional factors in legume seeds. A review. In: *Recent advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds*. A.F.B. Van der Poel, J. Huisman and H.S. Saini (Eds) Wageningen, The Netherlands. pp, 9-30.
- Guillon F, Champ MMJ. 1996. Grain legumes and transit in humans. *Grain Legumes*, Ed: AEP., 11-18
- Guillon F, Champ MMMJ. 2002. Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *Br. J. Nutr.*, 88, 293-306.
- Gujaska E, Khan K. 1991. Feed moisture effects on functional properties, trypsin inhibitor and hemagglutinating activities of extruded bean high starch fractions. *J. Food Sci.* 56, 443-447.
- Gulewicz P, Szymaniec S, Bubak B y col., 2002. Biological activity of alpha-galactoside preparations from *Lupinus angustifolius* L. and *Pisum sativum* L. seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 384-389.
- Gupta SK, Ventakasubramaniam TA. 1975. Production of aflatoxin in soybeans. *Appl. Microbiol.* 29, 834-837.
- Gupta YP. 1987. Anti-nutritional and toxic factors in food legumes: a review. *Plant Fds. Hum. Nutr.* 37, 201-228.
- Gustafsson EL, Sandberg AS. 1995. Phytate reduction in brown beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *J. Food Sci.* 66, 149-152
- Gwiazda S, Schwenke KD and Rutkowski A. 1980. Isolation and partial characterization of proteins from pea (*Pisum sativum* L.). *Die Nahrung.* 24, 939-950.
- Habiba RA. 2002. Changes in anti-nutrients, protein solubility, digestibility, and HCl-extractability of ash and phosphorus in vegetable peas as affected by cooking methods. *Food Chem.*, 77, 187-192.
- Hagemeister H, Barth CA. 1993. The influence of soybean trypsin inhibitor(s) on absorption of exogenous and loss of endogenous protein. In: *Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds*. Ed: Van der Poel, A. F. B., Huisman, J., Saini, H. S. Wagenigen Press. Wagenigen. The Netherlands. pp. 179-182.
- Hahn PF, Bale WF, Ross JF, Balfour WM, Whipple GH. 1940. Radioactive iron absorption by the gastrointestinal tract; Influence of anemia, anoxia and antecedent feeding; distribution in growing dogs. *J. Exp. Med.*, 71, 731-736.

- Hallberg L, Brune M, Rossander L. 1989. Iron absorption in man: Ascorbic acid and dose-dependent inhibition by phytate. *Am. J. Clin. Nutr.*, 49 (1), 140-144.
- Han O, Failla ML, Hill AD, Morris ER, Smith JC. 1994. Inositol phosphates inhibit uptake and transport of iron and zinc by a human intestinal cell line. *J. Nutr.*, 124, 580-587.
- Hara H, Nagata M, Ohta A, Kasai T. 1996. Increases in calcium absorption with ingestion of soluble dietary fibre, guar-gum hydrolyse, depend on the caecum in partially nephrectomized and normal rats. *Br. J. Nutr.*, 76, 773-784.
- Hara H, Konishi A, Kasai T. 2000. Contribution of the cecum and colon to zinc absorption in rats. *J. Nutr.* 130, 83-89.
- Hara H, Hayashi K, Aoyama Y. 2001. Intestinal absorption of zinc is promoted by low-level intake but inhibited by high-level intake of corn husk fiber in rats. *Nutr. Res.*, 21, 627-637.
- Haraldsson AK, Veide J, Andlid T, Larsson Alminger M, Sandberg AS. 2005. Degradation of Phytate by High-Phytase *Saccharomyces cerevisiae* Strains during Simulated Gastrointestinal Digestion. *Agric. Food Chem.*, 53, 5438-5444.
- Hardwick LL, Jones MR, Brautbar N, Lee DB. 1990. Site and mechanism of intestinal magnesium absorption. *Miner. Electrolyte Metab.* 16, 174-180.
- Harland BF, Oberleas D. 1977. A modified method for phytate analysis using an ion exchange procedure. Application to textured vegetable proteins. *Cereal Chem.* 54, 827-832.
- Harland BF, Oberleas D. 1986. Anion-Exchange method for determination of phytate in foods: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69, 667-670.
- Harland BF, Oberleas D. 1987. Phytate in foods. *World Review of Nutrition and Dietetics.* 52, 121-129.
- Harrington ME, Flynn A, Cashman KD. 2001. Effects of dietary fibre extracts on calcium absorption in the rat. *Food Chem.*, 73, 263-269.
- Hartig T. 1855. Weitere Mittheilungen uber Klebermehl. *Bot. Ztg.* 14, 257-260.
- Hartig T. 1856. Ubes dar Klebermehl. *Bot. Ztg.* 13, 881-884.
- Hartman GH Jr. 1979. Removal of phytate from soyproteins. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 56, 731-736.
- Hayes JE, Simpson RJ, Richardson AE. 2000. The growth and phosphorus utilisation of plants in sterile media when supplied with inositol hexaphosphate, glucose 1-phosphate or inorganic phosphate. *Plant and Soil*, 220, 165-174.

- Hazell T. 1985. Minerals in foods: dietary sources, chemical forms, interactions, bioavailability. *World Review of Nutrition and Dietetics.*, 46, 1-123.
- Heaney RP, Weaver CM, Fitzsimmons MC. 1991. Soybean phytate content: effect on calcium absorption. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 745-747.
- Hellendoorn EW. 1969. Intestinal effects following ingestion of beans. *Food Technol.* 23, 795-798.
- Herkelman KL, Cromwell GL, Stahly TS, Pfeiffer TW, Knabe DA. 1992. Apparent digestibility of aminoacids in raw and heated conventional and low trypsin inhibitor soybean for pigs. *J. Anim. Sci.* 70, 818-826.
- Heubner W, Stadler H. 1914. Uber eine titrationmethode zur bestimmung des phytins. *Biochem. Z.* 64, 422-437.
- Hilbert G E, McMasters M M. 1946. Pea starch, a starch of high amylose content. *J. Biol. Chem.*, 162, 299-302.
- Hill CH, Matrone G. 1970. Chemical parameters in the study of in vivo and in vitro interactions of transition elements. *Federation Proceedings.*, 29 (4), 1474-1481.
- Hira CK, Kaur AP. 1993. Phytate/Zinc and Phytate x Calcium/Zinc ratios of common cereals, legumes and their combinations. *J. Food Sci. Technol.* 30, 213-215.
- Holt NW, Sosulski FW. 1979. Amino acid composition and protein quality of field peas. *Can. J. Plant Sci.* 59, 653-658.
- Holub BJ. 1987. The cellular forms and functions of inositol phospholipids and their methabolic derivates. *Nutr. Rev.* 45, 65-71.
- Honke J, Kozłowska H, Vidal-Valverde C, Frías J, Gorecki R. 1998. Changes in quantities of inositol phosphates during maturation of legume seeds. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 206, 279-283.
- House W.A, Van Campen DR, Welch RM. 1997. Dietary methionine status and its relation to the bioavailability to rats of zinc in corn kernels with varying methionine content. *Nutr. Res.*, 17, 65-76.
- House W. 1999. Trace element bioavailability as exemplified by iron and zinc. *Field Crops Research.*, 60, 115-141.
- Hsu D, Leung HK, Finney PL, Morad MM. 1980. Effect of germination on nutritive value and baking properties of dry peas, lentils and faba beans. *J. Food Sci.* 45, 87-92.
- Hsu HW, Vavak DL, Saterlee LD, Miller GA. 1977. Multi-enzyme technique for estimating protein digestibility. *J. Food Science.*, 42, 1269-1273.
- Huisman J, Le Guen MP. 1991. Effects of pea ANF's and pea carbohydrates on ileal protein digestibility of piglets. In: *Digestive Physiology in Pigs. Proc. of the Vth*

- Symp. on Digestive Physiology in Pigs. Ed: Verstegen, M. W. A., Huisman, J., Hartog, L. A. Wagenigen. NL. pp. 99-103.
- Huisman J, van der Poel AFB, Mouwen JMVM. 1990. Performance and organ weights of piglets, rats and chickens fed diets containing *Pisum sativum*. J. Anim. Phys. Anim. Nutr., 63, 272-279.
- Huisman J. 1994. Nutritional and toxicological aspects of plant enzyme inhibitors. In: Proceedings of the International Euro Food Tox IV Conference: Bioactive substances in food of plant origin. Edit: Kozłowska, H., Fornal, J., Zdunczyk, Z. Olsztyn, Poland. 1, 214-220.
- Hurich J, Parzysz H and Przybylska J. 1977. Comparative study of seed proteins in the genus *Pisum*. II. Amino acid composition of different protein fractions. Genet. Pol. 18, 241-245.
- Hurley LS, Tao S. 1972. Alleviation of teratogenic effects of zinc deficiency by simultaneous lack of calcium. Am. J. Physiol. 222, 322-325.
- Hurrell RF, Lynch SR, Trinidad TP, Dassenko SA, Cook JD. 1988. Iron absorption in humans: Bovine serum albumin compared with beef muscle and egg white. Am. J. Clin. Nutr., 47 (1), 102-107.
- Hurrell RF, Juillerat MA, Reddy MB, Lynch SR, Dassenko SA, Cook JD. 1992. Soy protein, phytate and iron absorption in humans. Am. J. Clin. Nutr. 56, 573-578.
- Hurrell RF, Davidsson L, Reddy M, Kastenmayer P, Cook JD. 1998. A comparison of iron absorption in adults and infants consuming identical infant formulas. Br. J. Nutr., 79, 31-36.
- Hurrell RF, Reddy MB, Burri J, Cook JD. 2000. An evaluation of EDTA compounds for iron fortification of cereal-based foods. Br J Nutr., 84, 903-910.
- Hurrell RF. 2003. Influence of Vegetable Protein Sources on Trace Element and Mineral Bioavailability. Am. Soc. Nutr. Sci. 2973S-2977S.
- Hurrell RF, Reddy MB, Juillerat MA, Cook JD. 2003. Degradation of phytic acid in cereal porridges improves iron absorption by human subjects. Am. J. Clin. Nutr., 77, 1213-1219.
- Hussain A, W Buschuk. 1992. Interference of phytic acid with extration of proteins from grain legumes and wheat with acetic acid. J. Agric. Food Chem. 40, 1938-1942.
- Ibrahim SS, Habiba RA, Shatta AA, Embaby HE. 2002. Effect of soaking, germination, cooking and fermentation on antinutritional factors in cowpeas. Nahrung/Food, 46, 92-95.
- Igbasan FA, Guenter W. 1997. The influence of feeding yellow-, green- and brown-seeded peas on production performance of laying hens. J. Sci. Food Agric., 73, 120-128.

- Iqbal TH, Lewis KO, Cooper BT. 1994. Phytase activity in the human and rat small intestine. *Gut*. 35, 1233–1236.
- Irvine RF. 1992. Inositol phosphates and Ca<sup>2+</sup> entry: toward a proliferation or a simplification?. *FASEB J.*, 6, 3085-3091.
- Irving GCJ, Cosgrove DJ. 1972. Inositol phosphate phosphatases of microbial origin: The inositol pentaphosphate products of *Aspergillus ficuum* phytase. *J. Bacteriol.* 112, 434-438.
- Ismail-Beigi F, Faradji B, Reinhold JG. 1977. Binding of zinc and iron to wheat bread, wheat bran, and other components. *Am. J. Clin. Nutr.* 30, 1721-1725.
- Iyengar AK, KulKarni PR. 1977. Oligosaccharide levels of processed legumes. *J. Food Sci. Technol.* 14, 22-26.
- Iyer V, Salunkhe DK, Sathe SK, Rockland LB. 1980. Quick cooking bean (*Phaseolus vulgaris*). I. Investigations on quality, Qual. Plant. *Plant Foods Hum. Nutr.* 30, 27-31.
- Iyer V, Salunkhe DK, Sathe SK, Rockland LB. 1980. Quick cooking beans (*Phaseolus vulgaris*). II. Phytates, oligosaccharides and antienzymes. Qual. Plant. *Plant Foods. Hum. Nutr.* 30, 45-52.
- Jackson JF, Jones G, Linskens HF. 1982. Phytic acid in pollen. *Phytochemistry.* 21, 1255-1258.
- Jaffe WG and Lette CLV. 1968. Heat-labile growth inhibiting factors in beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Nutr.* 94, 203.
- Jaffe WG. 1950. Protein digestibility and trypsin inhibitor activity of legume seeds. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 75, 219.
- Janoria MP, Gour VK and Singh CB. 1984. Perspectives in Grain Legumes, Jawarharlal Nehru Krishi Vishwa Vidyalaya, Jabalpur, India.
- Jansman AJM, Verstegen MWA, Huisman J, van den Berg JWO. 1995. Effects of hulls of faba beans (*Vicia faba* L.) with a low or high content of condensed tannins on the apparent ileal and fecal digestibility of nutrients and the excretion of endogenous protein in ileal digesta and faeces of pigs. *J. Anim. Sci.* 73, 118-127.
- Jany KL-D. 1993. Mechanism of the degradation of inositol phosphates in the gut. In: Proceedings of Bioavailability'93. Nutritional, Chemical and Food Processing Implications of Nutrient Availability. Ed: Schlemmer, U., 2, 58-62.
- Jariwalla RJ, Sabin R, Lawson S, Herman ZS. 1990. Lowering of serum cholesterol and triglycerides and modulation of divalent cations by dietary phytate. *J. Applied Nutr.* 42, 18–28.
- Jenkins DJA. 1980. Dietary fiber and carbohydrate metabolism. En: *Medical Aspects of*

- Dietary Fiber. Ed: Spiller, G.A., Kay, R.M. Plenum Medical Book Co. London. U.K. pp. 175-192.
- Jenkins DJA, Wolever TMS. 1981. Slow release carbohydrates and the treatment of diabetes. Proc. Nutr. Soc. 40, 227-235.
- Jenkins DJA, Wolever TMS, Taylor TRH, Griffith C, Krezminska K, Lawrie JA, Bennet CM, Goff DV, Sarson DL, Bloom SR. 1982. Slow release carbohydrate improves second meal tolerance. Am. J. Clin. Nutr. 35, 1339-1346.
- Jenkins DJ, Thorne MJ, Camelon K, Jenkins A, Rao AV, Taylor RH, Thompson LU, Kalmusky J, Reichert R, Francis T. 1982. Effect of processing on digestibility and the blood glucose response: a study of lentils. Am. J. Clin. Nutr., 36, 1093-1101.
- Jondreville C, Grosjean F, Buron G, Peyronnet C, Beneytout JL. 1992. Comparison of four pea varieties in pig feeding through digestibility and growth performance results. J. Anim. Phys. Anim. Nutr. 68, 113-122.
- Jones RGM, Jones DA, Hedley C. 1998. Partitioning of carbon into starch and soluble carbohydrates during the development and maturation of pea seeds. In: Proceedings of the 3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes. Valladolid. Part I, 76-77.
- Jongbloed AW, Mroz Z, Kemme PA. 1992. The effect of supplementary *Aspergillus niger* phytase in diets for pigs on concentration and apparent digestibility of dry matter, total phosphorus and phytic acid in different sections of the alimentary tract. J. Anim. Sci. 70, 1159-1168.
- Jongbloed AW, Ohmann A, van Diepen JTM, van der Klis JD, Knap IH, Versteegh HAJ. 1997. Comparison of pigs and broilers in their response to microbial phytase. J. Anim. Sci. 75 (1), 185-191.
- Jonhson LF, Tate ME. 1969. Structure of phytic acids. Can. J. Chem. 47, 63-73.
- Jonualafadda SS, Sabharwal P, Pratt CA, Barbeau W. 1991 The effect of dry heat on the bioavailability of iron in soy flours. JAOAC J., 68, 944-948
- Jood S, Mehta U, Singh R. 1986. Effect of processing on carbohydrates in legumes. J. Afric. Food Chem. 34, 417-420.
- Kadlec P, Skulinova M, Kaasova J, Bubnik Z, Pour V, Dostalova J. 2001. Influence of microwave treatment on the soluble carbohydrates of germinated pea. In: Proceedings of the 4<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes. Cracow. Poland. Part II, 420-421.
- Kakade ML, Hoffa DE, Liener IE. 1973. Contribution of trypsin inhibitors to the deleterious effects of unheated soybeans fed to rats. J. Nutr. 103, 1772-1778.
- Kakade ML, Rackis JJ, McGhee JE, Evans RJ. 1974. Determination of trypsin inhibitor

- activity of soy bean products: A collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chem.* 51, 36-382.
- Kapsokefalou M, Miller DD. 1993. Lean beef and beef fat interact to enhance nonheme iron absorption in rats. *J. Nutr.*, 123 (8), 1429-1434.
- Kapsokefalou M, Miller DD. 1995. Iron speciation in intestinal contents of rats fed meals composed of meat and non meat sources of protein and fat. *Food Chem.*, 52 (1), 47-56.
- Karbach U, Schmitt A, Saner FH. 1991. Different mechanism of magnesium and calcium transport across rat duodenum. *Dig. Dis. Sci.* 36, 1611-1618.
- Kashimura J, Kimura M, Itokawa Y. 1996. The effects of sugar-beet fibre and wheat bran on iron and zinc. *Biol. Trace Elem. Res.*, 54, 239-250.
- Katayama N, Suzuki H. 1980. Possible effect of gibberellin on phytate degradation in germinating barley seeds. *Plant Cell Physiol.* 21, 115-123.
- Kaur M, Kawatra BL. 2002. Effect of domestic processing on zinc bioavailability from ricebean (*Vigna umbellata*) diets. *Plant Foods Hum. Nutr.* 57, 307-318.
- Kayne LH, Lee DB. 1993. Intestinal magnesium absorption. *Miner. Electrolyte Metab.* 19, 210-217.
- Kemme PA, Jongbloed AW, Mroz Z, Kogut J, Beynen AC. 1999. Digestibility of nutrients in growing-finishing pig is affected by *Aspergillus niger* phytase, phytate and lactic acid levels. 2. Apparent total tract digestibility of phosphorus, calcium and magnesium and ileal degradation of phytic acid. *Lives. Prod. Sci.* 58, 119-127.
- Kerovuo J, Lauraeus M, Nurminen P, Kalkinen N, Apajalahti J. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2079-2085.
- Khalil AH, Mansour EH. 1995. The effect of cooking, autoclaving and germination on the nutritional quality of faba beans. *Food Chem.* 54, 177-182.
- Khalil MN. 2001. Effect of soaking, germination, autoclaving on chemical and biological value of guar compared with faba bean. *Nahrung.*, 45 (4), 246-250.
- Kim YA, Barbeau WE. 1991. Changes in the nutritive value of soy protein concentrate during autoclaving. *Plant Foods Hum. Nutr.* 41, 179-192.
- Kim YO, Kim HK, Bae KS, Yu JH, Oh TK. 1998. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp.DS11. *Enz. Microbiol. Technol.* 22, 2-7.
- King JC, Keen CL. 2002. *Cinc. En Nutrición en Salud y Enfermedad*, 9ª Edición.; Shils, M. E., Olson, J. A., Shike, M., Ross, C. A., Eds.; McGraw-Hill Interamericana, Vol 1, pp. 257-276.
- King RD, Puwastien P. 1987. Effects of germination on the proximate composition and

- nutritional quality of winged bean seeds. *J. Food. Sci.* 52, 106-108.
- Knox TA, Kassarian Z, Dawson-Hughes B, Golner BB, Dalal GE, Arora S, Russell RM. 1991. Calcium absorption in elderly subjects on high-and low-fiber diets: effect of gastric acidity. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 1480-1486.
- Knuckles BE, Kuzmicky DD, Betschart AA. 1985. Effect of phytate and partially hydrolysed phytate on in vitro protein digestibility. *J. Food. Sci.* 50, 1080-1086.
- Knuckles BE, Kuzmicky DD, Gumbmann MR, Betschart AA. 1989. Effect of myo-inositol phosphate esters on in vitro protein digestibility. *J. Food. Sci.* 54, 1348-1350.
- Konietzny U, Greiner R. 2002. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *Int. J. Food Sci. Technol.* 37, 791-812.
- Konietzny U, Greiner R. 2002. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *Int. J. Food Sci. Technol.* 2002, 37, 791-812
- Koo M, Rao AV. 1991. Long term effect of bifidobacteria and neosugar on precursor lesions. *Nutr. Cancer.* 16, 249-257.
- Koplík R, Mestek O, Komínková J, Borková M, Suchánek M. 2004. Effect of cooking on phosphorus and trace elements species in peas. *Food Chem.*, 85, 31-39.
- Kornegay ET, Denbow DM, Zhang Z. 1997. Phytase supplementation of corn-soybean meal broiler diets from three to seven weeks of age. *Poult. Sci. Abstr.* 76, 6-11.
- Kozłowska H, Honke J, Sadowska J, Frías J, Vidal-Valverde C. 1996. Natural fermentation of lentils: Influence of time, concentration and temperature on the kinetics of hydrolysis of inositol phosphates. *J. Sci. Food Agric.* 71, 367-375.
- Kritchovsky D, Storey JA. 1974. Binding of bile salts in vitro by non-nutritive fiber. *J. Nutr.* 104, 458-463.
- Kuhn LC. 1989. The transferrin receptor: A key function in iron metabolism. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift.*, 119 (39), 1319-1326.
- Kummersow FA. 1975. Lipids on atherosclerosis. *J. Food Sci.* 40, 12-17.
- Kunz C, Lönnerdal B. 1990. Calcium retention from human milk infant formula and preterm formula. *FASEB J.*, 4, 521-527.
- Kurashi M, Inomata K. 1989. Role of parotid amylase in starch digestion in the gastrointestinal tract of rats. *J. Dent. Res.* 68, 1366-1369.
- Kuvaeva EB, Kretovich VL. 1978. Phytase of germinating pea seeds. *Soviet Plant Physiol.* 25, 290-295.
- Lalles JP, Jansman AJM. 1998. Recent progress in the understanding of the mode of

- action and effects of antinutritional factors from legume seeds in non-ruminant farm animals. In: Jansman, A.J.M., Hill, G.D., Huisman, J., van der Poel, A.F.B. (Eds.), Proc. 3rd Int. Workshop On Antinutritional Factors in Legume Seeds and Rapeseed, Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands, pp. 219-232.
- Lamartiniere CA. 2000. Protection against breast cancer with genistein: a component of soy. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71, 1705S-1709S.
- Lambrechts C, Boze H, Moulin G, Galzy P. 1992. Utilization of phytate by some yeasts. *Biotech. Letters*. 14, 61–66.
- Lamprey MS and Walker BL. 1976. A possible essential role for dietary linolenic acid in the development of the young rat. *J. Nutr.* 106, 86.
- Lantsch HJ, Scheuermann SE, Menke KH. 1988. Gastrointestinal hydrolysis of phytate from wheat, barley and corn in young-pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 59, 273-284.
- Larsson M, Sandberg AS. 1991. Phytate reduction in bread containing oat flour, oat bran or rye bran. *J. Cereal Sci.* 14, 141-149.
- Larsson M, Sandberg AS. 1992. Phytate reduction in oats during malting. *J. Food Sci.* 57, 994-997.
- Larsson M, Sandberg AS. 1995. Malting of oat in pilot-plant process. Effect of heat treatment, storage and soaking conditions on phytate reduction. *J. Cereal Sci.* 21, 87-95.
- Larsson M, Rossander-Hulthen L, Sandstrom B, Sandberg AS. 1996. Improved zinc and iron absorption from breakfast meals containing malted oats with reduced phytate content. *Br. J. Nutr.*, 76, 677– 88.
- Latta M, Eskin M. 1980. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *J. Agric. Food Chem.* 28, 1313-1315.
- Layrisse M, Martinez-Torres C, Cook JD, Walker R, Finch CA. 1973. Iron fortification of food: its measurement by the extrinsic tag method. *Blood.*, 41 (3), 333-352.
- Leakey C. 1994. Progress in breeding non-flatulent *Phaseolus* beans. *Grain Legumes*, 5, 18-19.
- Lee HH, Prasad AS, Brewer GJ, Owyang C. 1989. Zinc absorption in human small intestine. *Am. J. Physiol.* 256, 87S-91S.
- Lehrfeld J. 1989. High-Performance liquid chromatography analysis of phytic acid on a pH-stable, macroporous polymer column. *Cereal Chem.* 66, 510-515.
- Lei XG, Ku PK, Miller ER, Ullrey DE, Yokoyama MT. 1993. Supplemental microbial phytase improves bioavailability of dietary zinc to weanling pigs. *J. Nutr.* 123, 1117-1123.

- Lei XG, Ku PK, Miller ER, Yokoyama MT, Ullrey DE. 1994. Calcium level affects the efficacy of supplemental microbial phytase in corn soybean meal diets of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 72, 139-143.
- Leske DL, Akavanichan O, Cheng TK y Coon CN. 1991. Effect of ethanol extract on nitrogen-corrected true metabolizable energy for soybean meal with broilers and roosters. *Poult. Sci.* 70, 892-895.
- Lestienne I, Icard Verniere C, Mouquet C, Picq C, Treche S. 2005a. Effects of soaking whole cereal and legume seeds on iron, zinc and phytate contents. *Food Chem.* 89, 421-425.
- Lestienne I, Besancon P, Caporiccio B, Lullien-Pé Llerin V, Treche S. 2005b. Iron and zinc in vitro availability in pearl millet flours (*Pennisetum glaucum*) with varying phytate, tannin, and fiber contents. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 3240-3247.
- Leterme P, Beckers Y, Thewis A. 1990. Trypsin inhibitor in peas: varietal effect and influence on digestibility of crude protein by growing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 29, 45-55.
- Leterme P, Monmart T, Thewis A. 1992. Varietal distribution of trypsin inhibitors in peas. In: *Proceedings of the 1<sup>st</sup> European Conference on Grain Legumes*. June 1-3, 1992. Angers France. pp. 417-418.
- Levitt J. 1972. *Response of Plants to Environmental Stress*, Academic Press, New York., pp. 25-29.
- Levrat MA, Remesy C, Demigne C. 1991. High propionic acid fermentations and mineral accumulation in the ceccum of rats adapted to different levels of inulin. *J. Nutr.*, 121, 1730-1737.
- Li BW, Schuhmann PJ, Wolf WR. 1985. Chromatographic determinations of sugars and starch in a dietary composite reference material. *J. Agric. Food Chem.* 33, 531-536.
- Liener IE, Kakade ML. 1980. Protease Inhibitors. In *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*, Liener, I. E., Ed.; Academic Press: NY, pp 7-71.
- Liener IE. 1962. Toxic factors in edible legumes and their elimination. *Am. J. Clin. Nutr.* 11, 281-286.
- Liener IE. 1976. Legume toxins in relation to protein digestibility. A review. *J. Food Sci.*, 41, 1076-1081.
- Liener IE. 1979. Significance for humans of biologically active factors in soybeans and other food legumes. *J. Am. Oil. Chemists Soc.* 56, 121-129.
- Liener IE. 1989. Antinutritional factors in legume seeds: state of the art. In: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds*: J. Huisman, A.F.B., Van der Poel and Liener (Eds). PUDOC. Wageningen, 6-14.

- Lisbona F, Reyes-Andrada MD, López-Aliaga I, Barrionuevo M, Alférez MJM, Campos M. 1999. The importance of the proportion of heme/nonheme iron in the diet to minimize the interference with calcium, phosphorus, and magnesium metabolism on recovery from nutritional ferropenic anemia. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2026-2032.
- Lo GS, Settle SL, Steinke FH, Hopkins DT. 1981. Effect of Phytate: Zinc molar ratio and isolated soybean protein on zinc bioavailability. *J. Nutr.* 111, 2223-2235.
- Lolas GM, Markakis P. 1977. The phytase of navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Sci.* 42, 1094-1106.
- Lönerdal B, Sandberg AS, Sandström B, Kunz C. 1989. Inhibitory effects of phytic acid and other inositol phosphates on zinc and calcium absorption in suckling rats. *J. Nutr.* 119, 211-214.
- Lönerdal B. 1989. Intestinal absorption of zinc. En *Zinc in Human Biology*; Mills, C. F., Ed.; International Life Sciences Institute: London, pp. 33-58.
- Lönerdal B. 2000. Dietary factors influencing zinc absorption. *J. Nutr.*, 130, 1378S-1383S.
- Lopez HW, Coudray C, Bellanger J, Younes H, Demigne C, Remesy C. 1998a. Intestinal fermentation lessens the inhibitory effects of phytic acid on mineral utilization in rats. *Am. Soc. Nutr. Sci.*, 1192-1198.
- Lopez HW, Coudray C, Bellanger J, Younes H, Demigne C, Remesy C. 1998b. Intestinal fermentation lessens the inhibitory effects of phytic acid on mineral utilization in rats. *J Nutr.*, 128, 1192-1198.
- Lopez HW, Coudray C, Bellanger J, Levrat-Verny MA, Demigne C, Remesy C, Payssiguiet Y. 2000a. Resistant starch improves mineral assimilation in rats adapted to a wheat bran diet. *Nutr. Res.* 20, 141-55.
- Lopez HW, Coudray C, Levrat-Verny MA, Feillet-Coudray C, Demigne C, Remesy C. 2000b. Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. *J. Nutr. Biochem.* 11, 500-508.
- Lopez HW, Levrat-Verny MA, Coudray C, Besson C, Krespine V, Messenger A, Demigne C, Remesy C. 2001. Class 2 resistant starches lower plasma and liver lipids and improve mineral retention in rats. *J. Nutr.* 131, 1283-1289.
- López Amorós ML. 2000. Estudio de compuestos fenólicos en legumbres. Influencia de la variedad y del proceso de germinación. Tesis Doctoral., pp. 287. Madrid, Universidad Autónoma de Madrid. España.
- Lynch SR, Cook JD. 1980. Interaction of vitamin C and iron. *Annals of the New York Academy of Sciences.*, 355, 32-44.
- Lynch SR, Beard JL, Dassenko SA, Cook JD. 1984. Iron absorption from legumes in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 40, 42-47.

- Lynch SR, Hurrell RF, Dassenko SA, Cook JD. 1989. The effect of dietary proteins on iron bioavailability in man. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 249, 117-132.
- Lynch SR. 1997. Interaction of iron with other nutrients. *Nutr. Rev.* 55, 102-110.
- Lynch SR. 2000. The effect of calcium on iron absorption. *Nutr. Res. Rev.*, 13 (2), 141-158.
- Maddaiah VT, Kurnick AA, Reid BL. 1964. Phytic acid studies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 115, 391-393.
- Macfarlane BJ, Bezwoda WR, Bothwell TH, Baynes RD, Bothwell JE, MacPhail AP, Lamparelli RD, Mayet F. 1988. Inhibitory effect of nuts on iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.*, 47 (2), 270-274.
- Macfarlane BJ, Van Der Riet WB, Bothwell TH, Baynes RD, Siegenberg D, Schmidt U, Tal A, Mayet F. 1990. Effect of traditional oriental soy products on iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.*, 51 (5), 873-880.
- Maenz DD, Engele-Schaan CM, Newkirk RW, Classen HL. 1999. The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal. *Anim. Feed Sci. Technol.* 81, 177-192.
- Mahoney AW, Reynolds K, Tso T-B, Hendricks DG. 1985. Influence of varying dietary calcium level on the iron status of rats fed meat as the iron source. *Nutr. Rep. Int.*, 31 (4), 973-977.
- Makower RU. 1970. Extraction and determination of phytic acid in beans (*Phaseolus vulgaris*). *Cereal Chem.* 47, 288-295.
- Manary MJ, Hotz C, Krebs NC, Gibson RS, Westcott JE, Broadhead RL, Hambidge KM. 2002. Zinc homeostasis in Malawian children consuming a high-phytate, maize-based diet. *Am. J. Clin. Nutr.*, 75, 1057-1061.
- Marero LM, Payumo EM, Aguinaldo AR, Matsumoto I, Homma S. 1991. The antinutritional factors in weaning foods prepared from germinated legumes and cereals. *Lebensmittelwissenschaft Technol.*, 24, 177-181.
- Mariani A, Spadoni MA. 1979. Rat models in protein quality evaluation. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 56, 154-156.
- Mariscal-Landín G, Lebreton Y, Séve B. 2002. Apparent and standardised true ileal digestibility of protein and amino acids from faba bean, lupin and pea, provided as whole seeds, dehulled or extruded in pig diets. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 97, 183-198.
- Marklinder M, Larsson M, Fredlund K, Sandberg AS. 1995. Degradation of phytate by using varied sources of phytases in an oat-based nutrient solution fermented by *Lactobacillus plantarum* strain 299 V. *Food Microbiol.* 12, 487-495.

- Marlett JA, Vollendorf NW. 1993. Dietary fiber content and composition of vegetables determined by two methods of analysis. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1608-1612.
- Marrese RJ, Duell RW, Sprague MA. 1961. A comparison of three current methods for the analysis of phytin phosphorus. *Crop. Sci.* 1, 80-84.
- Martin EA, Nolan JV, Nitsan Z, Farrell DJ. 1998. Strategies to improve the nutritive value of rice bran in poultry diets. IV. Effects of addition of fish meal and a microbial phytase to duckling diets on bird performance and amino acid digestibility. *Br. Poult. Sci.* 39, 612-621.
- Martín-Cabrejas MA, Ariza N, Esteban R, Mollá E, Waldron K, López-Andréu FJ. 2003. Effect of germination on the carbohydrate composition of the dietary fiber of peas (*Pisum sativum* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1254-1259.
- Martínez C, Ros G, Periago MJ, 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 Agric.* 77, 414-420.
- Marzo F, Aguirre A, Castiella MV, Alonso R. 1997. Fertilization effects of phosphorus and sulfur on chemical composition of seeds of *Pisum sativum* L. and relative infestation by *Bruchus pisorum* L. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1829-1833.
- Masters DG, Keen CL, Lönnnerdal B. 1983. Comparative aspects of dietary copper and zinc deficiencies in pregnant rats. *J. Nutr.* 113, 905-912.
- Mataix J, Mañas M, Llopis J, Martínez de Victoria E, Sánchez JJ, Borregón A. 1998. *Tabla de Composición de Alimentos Españoles*. Mataix, J., Mañas, M., Eds.; Editorial Universidad de Granada.
- Mathur KS, Singhal SS and Sharma RD. 1964. Effect of Bengal gram in experimentally induced high levels of cholesterol in tissues and serum in albino rats. *J. Nutr.* 84, 201-206.
- Mauron J. 1985. Influence of processing on protein quality. *Bibl. Nutr. Dieta.* 56-81.
- Mazzanti R, Srani KS, Debnam ES, Boss AM, Gentilini P. 1987. The effect of chronic ethanol consumption on iron absorption in rats. *Alcohol and alcoholism.*, 22 (1), 47-52.
- Mazzola EP, Phillippy BQ, Harland BF, Miller TH, Potemra JM, Katsimpiris EW. 1986. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopic determination of phytate in foods. *J. Agric. Food Chem.* 34, 60-62.
- Mbithi-Mwikya S, Van Camp J, Rodríguez R, Huyghebaert A. 2001. Effects of sprouting on nutrient and antinutrient composition of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* var. Rose coco). *Eur. Food. Res. Tech.* 212, 188-191.
- McCance RA, Widdowson EM. 1935. Phytin in human nutrition. *Biochem. J.* 29, 2694-2699.

- McCance RA, Widdowson EM. 1942a. Mineral metabolism of healthy humans on white and brown bread varieties. *J. Physiol.* 101, 44-48.
- McCance RA, Widdowson EM. 1942b. Mineral metabolism on dephytinized bread. *J. Physiol.* 101, 304-306.
- McCollum EV, Hart EB. 1908. On the occurrence of a phytin-splitting enzyme in animal tissue. *J. Biol. Chem.* 4, 497-500.
- McCready RM, Guggolz J, Silveira V and Owen RS. 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. *Anal. Chem.* 22, 1156-1158.
- McPhee KE, Muehlbauer FJ. 2002. Improving the nutritional value of cool season food legumes. En: *Quality improvement in field crops.* (ed) Food Product Press, the Haworth Press. pp. 101-211.
- McQueen RE, Nicholson JWG. 1979. Modification of the neutral-detergent fiber procedure for cereals and vegetables by using  $\alpha$ -amylase. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 62, 676-679.
- Melcion JP, van der Poel, AFB. 1993. Process technology and antinutritional factors: principles, adequacy and process optimization. In *Recent Advances of Research in Antinutritional factors in Legume Seeds*; van der Poel, A. F. B., Huisman, J., Saini, H. S., Eds: Wageningen Pers: Wageningen, 1993; pp 419-434.
- Mellanby E. 1925. *Med. Res. Counc. Spec. Rep. Ser. (G.B.).* SRS, 61-64.
- Mellanby E. 1950. Some points in the chemistry and biochemistry of phytic acid and phytase. In: *A Story of Nutritional Research.* Pp. 248-282. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Menke KH, Gruber F and Gaus G. 1983. The product of amino acid functions (PAF) as a measure of protein quality for pigs. En: *4<sup>th</sup> International Symposium on Protein Metabolism and Nutrition.* Ed: Pion, R., Arnal, M., Bonin, D., Publ. No. 31, 431-434.
- Messina MJ. 1999. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 70, 4398-4508.
- Michell B. 1986. A second messenger function for inositol tetrakisphosphate. *Nature.* 324, 613-614.
- Millerd A, Thompson JA, Randall PJ. 1979. Heterogeneity of sulphur content in the storage proteins of pea cotyledons. *Planta.* 146, 463.
- Millerd A, Thompson JA, Schroeder HE. 1978. Cotyledonary storage proteins in *Pisum sativum*. III. Patterns of accumulation during development. *Aust. J. Plant Physiol.* 5, 519-521.
- Milne DB, Canfield WK, Mahalko JR. 1984. Effect of oral folic acid supplements on

- zinc, copper, and iron absorption and excretion. *Am. J. Clin. Nutr.* 39, 535-539.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1984. Una fuente de proteínas. Alubias, garbanzos y lentejas. Servicio de publicaciones, Madrid.
- Mitchell DB, Vogel K, Weimann BJ, Pasamontes L, Van Loon APGM. 1997. The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. *Microbiol.* 143, 245–252.
- Mitchell HH. 1923. A method of determining the biological value of protein. *J. Biol. Chem.* 58, 873- 903.
- Mitchell RS, Casimir DJ. 1959. The chemistry and technology of the preservation of green peas. *Adv. Food Sci.* 9, 61-63.
- Miyazawa E, Iwabuchi A, Yoshida T. 1996. Phytate breakdown and apparent absorption of phosphorus, calcium and magnesium in germfree and conventionalized rats. *Nutr. Res.* 16, 603-613.
- Miyazawa T, Ito S, Fujino Y. 1975. Fatty acid composition of glycerides and stereospecific analysis of triglycerides in pea seeds. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 21, 137-140.
- Mod RR, Ory RL, Morris NM, Normand FL. 1981. Chemical properties and interactions of rice hemicellulose with trace minerals in vitro. *J. Agric. Food Chem.*, 29, 449-454.
- Modlin M. 1980. Urinary phosphorylated inositols and renal stone. *Lancet.* 2, 1113–1114.
- Mole S. 1989 Polyphenolics and the nutritional ecology of herbivores. In *Toxicants of Plant Origin, Phenolic*; Cheeke, P.R., Ed: CRC Press, Boca Raton, FL, Vol. IV, 191-223.
- Monsen, E.R. 1988. Iron nutrition and absorption: dietary factors which impact iron bioavailability. *J. Am. Diet. Assoc.*, 88 (7), 786-790.
- Monteze Guimaraes V, Tavares de Rezende S, Alves Moreira M, y col. 2001. Characterization of  $\alpha$ -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. *Phytochem.*, 58-67.
- Moore E, Helly VR, Coneely OM, Ward PP, Power RF, Headon DR. 1995. Molecular cloning, expression and evaluation of phosphohydrolases for phytate-degrading activity. *J. Ind. Microbiol.* 14, 396–402.
- Moore RJ, Veum TL. 1982. Effect of dietary phosphorus and yeast culture level on the utilization of phytate phosphorus by the rat. *Nutr. Rep. Int.* 25, 221-225.
- Morris ER, Ellis R. 1979. Phytate and phosphorus balance in human subjects:

- Dephytinized versus nondephytinized whole wheat bran. *Cereal Foods World*. 24, 461-463.
- Morris ER, Ellis R. 1980. Effect of dietary phytate/zinc molar ratio on growth and bone zinc response of rats fed semipurified diets. *J. Nutr.* 110, 1037-1045.
- Morris ER, Ellis R. 1985. Trace element nutriture of adult men consuming three levels of phytate. In: *Trace Elements in Man and Animals*. Ed: Mills, C.F., Bremner, I., Chesters, J.K. Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough, England. Vol 5. pp. 443-452.
- Morris ER, Bodwell CE, Miles CW, Mertz W, Prather ES, Canary JJ. 1987. Long-term consumption of beef extended with soy protein by children, women and men: III. Iron absorption by adult men. *Plant foods for human nutrition.*, 37 (4), 377-389.
- Morris ER, Ellis, R. 1989. Usefulness of the dietary Phytic Acid/Zinc molar ratio as an index of zinc bioavailability to rats and humans. *Biol. Trace. Elem. Res.* 19, 107-117.
- Morrow B. 1991. The rebirth of legumes. *Food Technol.* 45, 121-127.
- Mosse J, Huet JC, Baudet J. 1987. Changement de la composition en acides aminés des graines de pois en fonction de leur taux d'azote. *Sci. Aliments.* 7, 301-324.
- Muel F, Carroee B, Grosjean F. 1998. An assessment of variation of antinutritional factors in pea seeds. 3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes. Valladolid. Part II, 164-165.
- Munoz JM. 1986. Overview of the effects of dietary fiber on the utilization of minerals and trace elements. In: Spiller GA, ed. *CRC Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition*, Boca Raton: CRC Press, pp. 193-200.
- Murai A, Kobayashi T, Okada T, Okumura J. 2002. Improvement of growth and nutritive value in chicks with non-genetically modified phytase product from *Aspergillus niger*. *Br. Poultry Sci.*, 43, 687-695.
- Munro HN, Suter PM, Russell RM. 1987. Nutritional requirements of the elderly. *Ann. Rev. Nutr.* 7, 23-49.
- Murphy EL. 1975. The possible elimination of legume flatulence by genetic selection, in *Nutritional Improvement of Food Legumes by Breeding*, Milner, M., Ed., John Wiley & Sons, New York, pp. 273-279.
- Murray DR. 1979. Storage role for albumins in pea cotyledons. *Plant Cell. Environ.* 2, 221-224.
- Nahapetian A, Young VR. 1980. Metabolism of <sup>14</sup>C-phytate in rats: Effect of low and high dietary calcium intakes. *J. Nutr.* 110, 1458-1472.

- Nakamura. Y, Fukuhara H, Sano K. 2000. Secreted phytase activities of yeasts. *Bioscience, Biotechn. Biochem.* 64, 841–844.
- Namkung H, Leeson S. 1999. Effect of phytase enzyme on dietary nitrogen-corrected apparent metabolizable energy and the ileal digestibility of nitrogen and amino acids in broiler chicks. *Poult. Sci.* 78, 1317-1319.
- National Research Council. Nutrient Requirements of Laboratory Animals. 1978. 3<sup>th</sup> ed., National Academy of Science: Washington DC. USA.
- National Research Council. Nutrient Requirements of poultry. 1994. 9<sup>th</sup> ed., National Academy Press, Washington D.C. USA.
- National Research Council. Nutrient Requirements of Laboratory Animals. 1995. 4<sup>th</sup> ed., National Academy Press: Washington, D.C. USA.
- National Research Council. Nutrient Requirements of swine. 1998. 10<sup>th</sup> ed., National Academy Press, Washington D.C. USA.
- Nayini NR, Markakis P. 1986. Phytases. In E. Graf (Ed.), *Phytic acid: Chemistry and applications*. Minneapolis: Pilatus Press, 95-102 .
- Nelson RL, Yoo SJ, Tanure JC, Andrian-Opoulos G, Misumi A. 1989. The effect of iron on experimental colorectal carcinogenesis. *Anticancer Res.* 9, 1477-1480.
- Nelson TS, Daniels JB, Hall JR, Shields LG. 1976. Hydrolysis of natural phytate phosphorus in the digestive tract of calves. *J. Anim. Sci.* 42, 1509.
- Nelson TS, Kirby LK. 1979. Effect of age and diet composition on the hydrolysis of phytate phosphorus by rats. *Nutr. Rep. Int.* 20, 729-734.
- Nelson TS, Shieh TR, Wodzinski RJ and Ware JH. 1971. Effect of supplemental phytase on the utilization of phytate phosphorus by chicks. *J. Nutr.* 101, 1289-1293.
- Nelson TS. 1976 The hydrolysis of phytate phosphorus by chicks and laying hens. *Poult. Sci.* 55, 2262-2265.
- Nestares T, Barrionuevo M, López-Frías M, Urbano G, Prodanov, Frías J, Estrella E, Vidal-Valverde C. 1993. Effect of processing on some antinutritive factors of chickpea: Influence on protein digestibility and food intake in rats. In *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds*; Van der Poel, A.F.B., Huisman, J.H., Saini, S., Eds; Wageningen Press: Wageningen, The Netherlands, pp 487-491.
- Nestares T, López-Frías M, Barrionuevo M, Urbano G. 1996. Nutricional assessment of raw and processed chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein in growing rats. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 2760-2765.

- Nestares T, Urbano G, Lopez-Frías M, Barrionuevo M. 1997. Nutritional assessment of magnesium from raw and processed chickpea (*Cicer arietinum* L.) in growing rats. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3138-3142.
- Nestares T, Barrionuevo M, Urbano G, López-Frías M. 1999. Effect of processing methods on the calcium, phosphorus and phytic acid contents and nutritive utilization of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2807-2812.
- Nestares T, Barrionuevo M, Urbano G, López-Frías M. 2001. Nutritional assessment of protein from beans (*Phaseolus vulgaris* L.) processed at different pH values, in growing rats. *J. Sci. Food Agric.*, 81, 1522-1529.
- Nestares T, Barrionuevo M, López-Frías M, Vidal C, Urbano G. 2003. Effect of different soaking solutions on nutritive utilization of minerals (calcium, phosphorus, and magnesium) from cooked beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in growing rats. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 515-520.
- Neuberg C. 1908. Beziehung des cyclischen inosits zu den aliphatischen zuckern. *Biochem. Z.* 9, 551-553.
- Nickel KP, Nielsen SS, Smart DJ, Mitchell ACA, Belury MA. 1997. Calcium bioavailability of vegetarian diets in rats: potential application in a bioregenerative life-support system. *J. Food Sci.*, 62, 619-621.
- Nielsen SS. 1991. Digestibility of legume proteins. *Food Technol.* 9, 112-118.
- Nikokyris, P. N.; Kansylis, K. 1997. Feed protein fractions in various solvents of ruminant feedstuffs. *J. Sci. Food Agric.*, 75, 198-204.
- Noah L, Guillon F, Bouchet B, Buléon A, Molis C, Gratas M, Champ M. 1998. Digestion of carbohydrate from white beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in healthy humans. *J. Nutr.*, 128, 977-985.
- Nolan KD, Duffin PA, McWeeny DJ. 1987. Effects of phytate on mineral bioavailability. In: *vitro* studies on  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  and  $Zn^{+2}$  (also  $Cd^{+2}$ ) solubilities in the presence of phytate. *J. Sci. Food Agric.* 40, 79-85.
- Noonan SC, Savage GP. 1999. Oxalate content of foods and its effects on humans. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* 8 (1), 64-74.
- Noor I, Bressani R, Elias LG. 1980. Changes in chemical and selected biochemical components, protein quality and digestibility of mung bean (*Vigna radiata*) during germination and cooking. *Qual. Plant. Plant Foods Hum. Nutr.*, 30, 235-239.
- O'Brien KO, Allen LH, Quatromoni P, Sui Caldera ML, Vieira NE, Perez A, Holick MF, Yergey AL. 1993. High fiber diets slow bone turnover in young men but have no effect on efficiency of intestinal calcium absorption. *J. Nutr.*, 123, 2122-2128.
- O'Dell BL, Savage JE. 1960. Effect of phytic acid on zinc availability. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 103, 304-306.

- O'Dell BL, Yohe JM, Savage JE. 1963. Zinc availability in the chicks as affected by phytate, calcium and ethylenediamine tetraacetate. *Poult. Sci.* 43, 415-418.
- O'Dell BL. 1979. Effect of soy protein on trace mineral bioavailability. In: *Soy Protein and Human Nutrition*. Ed: Wilcke, H.L., Hopkins, D.T., Waggle, D.H. Academic Press. New York. pp. 187-189.
- O'Dell BL. 1989. Mineral interactions relevant to nutrient requirements. *J. Nutr.*, 119 (12), 1832-1838.
- O'Neill IK, Sargent M, Trimble ML. 1980. Determination of phytate in foods by phosphorus-31 fourier transform nuclear magnetic resonance spectrometry. *Anal. Chem.* 52, 1288-1291.
- Oberleas D, Muhrer ME, O'Dell BL. 1966. Dietary metal-complexing agents and zinc availability in the rat. *J. Nutr.* 90, 56-62.
- Oberleas D. 1973. Phytates. In: *Toxicants Occurring Naturally in Foods*. 2<sup>nd</sup> Edit. Natl. Acad. Sci. Washington, D. C. pp. 363-366.
- Oberleas D. 1996. Mechanism of zinc homeostasis. *J. Inorg. Biochem.* 62, 231-241.
- Oberleas D, Chan HC. 1997. Cation complexation by phytate. *Trace Elem. Electr.*, 14 (4), 173-176.
- Ohkawa T, Ebisuno S, Kitagawa M, Morimoto S, Miyazaki Y, Yasukawa S. 1984. Rice bran treatment for patients with hypercalciuric stones: experimental and clinical studies. *J. Urology.* 132, 1140-1145.
- Ohta A, Ohtsuki M, Baba S, Adachi T, Sakata T, Sakaguchi E. 1995a. Calcium and magnesium absorption from the colon and rectum are increased in rats fed fructooligosaccharides. *J. Nutr.*, 125, 2417-2424.
- Ohta A, Ohtsuki M, Baba S, Takizawa T, Adachi T, Kimura S. 1995b. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of iron, calcium and magnesium in iron deficient anemic rats. *J. Nutr. Sci. Vitam.* 41, 281-291.
- Okada A, Takagi Y, Nezu R, Sando K, Shenkin A. 1995. Trace element metabolism in parental and enteral nutrition. *Nutr.* 11, 106-113.
- Okubo K, Myers DV, Iacobucci GA. 1976. Binding of phytic acid to glycinin. *Cereal Chem.* 137, 1140-1145.
- Okubo K, Waldrop AB, Iacobucci GA, Myers DV. 1975. Preparation of low phytate soybean protein isolate and concentrate by ultrafiltration. *Cereal Chemistry.* 52, 263-265.
- Olivares AB, Martinez C, Lopez G, Ros G. 2001. Influence of the design of a product on in Vitro mineral availability of homogenized weaning foods. *InnoVatiVe Food Sci. Emerging Technol.*, 2, 181-187.

- Olson A, Gray GM, Mei-Chen C. 1987. Chemistry and analysis of soluble dietary fiber. *Food Technol.* 41, (2), 71-80.
- Olson AC, Gray GM, Gumbmann MR, Wagner JR. 1982. Nutrient composition of and digestive response to whole and extracted dry beans. *J. Agric. Food Chem.* 30: 26-32.
- Orr E. 1978. Sources of plant proteins: world supply and demand, in *Plant Proteins*, Norton, G., Ed., Butterworths, London, 155-159.
- Ory RL, Henningsen KW. 1969. Enzymes associated with protein bodies isolated from ungerminated barley seeds. *Plant Physiol.* 44, 1488-1498.
- Osborne TB, Mendel LB, Ferry EL. 1919. A method of expressing numerically the growth-promoting value of proteins. *J. Biol. Chem.* 37, 223-229.
- Osmosaiye O, Cheryan M. 1979. Low phytate, full fat soy protein product by ultrafiltration of aqueous value of proteins. *J. Biol. Chem.* 56, 58-61.
- Pabon M, Lönnerdal B. 1992. Effect of citrate on zinc bioavailability from milk, milk fractions and infant formulas. *Nutr. Res.* 13, 103-111.
- Pahl H. 2001. Suitability of grain legumes for european farming systems. 4<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes. Cracow. Part I, 41-45.
- Pallares I, Lisbona F, Lopez Aliaga I, Barrionuevo M, Alferez MJM, Campos MS. 1993. Effect of iron deficiency on the digestive utilization of iron, phosphorus, calcium and magnesium in rats. *Br. J. Nutr.*, 70 (2), 609-620.
- Pallarés I, López-Aliaga I, Lisbona F, Moratalla A, Gómez-Ayala AE, Barrionuevo M, Hartiti S, Alferez MJM, Campos MS. 1996. Effects of iron replenishment on iron, calcium, phosphorus and magnesium metabolism in iron-deficient rats. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 66, 158-165.
- Pallauf J, Rimbach G, Pippig S, Schindler B, Most E. 1994. Effect of phytate supplementation to a phytate rich diet based on wheat, barley and soya on the bioavailability of dietary phosphorus, calcium, magnesium, zinc and protein in piglets. *Agribiological Research-Zeitschrift für Agrarbiologie Agrikulturchemie Ökologie.* 47, 39-48.
- Pallauf J, Pietsch M, Rimbach G. 1998. Dietary phytate reduces magnesium bioavailability in growing rats. *Nutr. Res.* 18 (6), 1029-1037.
- Pallauf VJ, Hohler D, Rimbach G. 1992. Effect of microbial phytase supplementation to a maize-soya diet on the apparent absorption of Mg, Fe, Cu, Mn, and Zn and parameters of Zn status in piglets. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 68, 1-8.
- Parrish FW, Madacsi JP, Phillippy BQ, Wilfred AG, Bucu SM. 1990. Determination of phytic acid in cottonseed by near-infrared reflectance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 38, 407-409.

- Patwardhan VN. 1937. The occurrence of phytin-splitting enzyme in the intestine of albino rats. *Biochem. J.* 31, 560-564.
- Patwardhan VN. 1962. Pulses and beans in human nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 11, 12-15.
- Pen J, Van Ooyen AJJ, Van den Elzen PJM, Quax WJ, Hoekema A. 1993a. Efficient production of active industrial enzymes in plants. *Ind. Crops Prod.* 1, 241-250.
- Pen J, Verwoerd TC, Van Paridon PA, Beudeker RF, Van den Elzen PJM, Greerse K, Van der Kils, Versteegh HAJ, Van Ooyen AJJ, Quax WJ, Hoekema A. 1993b. Phytase-containing transgenic seed as a novel feed additive for improved phosphorus utilization. *Bio/Technol.* 11, 811-814.
- Pepe O, Blaiotta G, Anastasio M, Moschetti G, Ercolini D, Villani F. 2004. Technological and molecular diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented sourdoughs system. *Appl. Microbiol.*, 27, 443-453.
- Pérez-Llamas F, Garaulet M, Martínez JA, Marín JF, Larqué E, Zamora S. 2001. Influence of dietary protein type and iron source on the absorption of amino acids and minerals. *J. Physiol. Biochem.*, 57, 321-328.
- Pérez-Maldonado RA, Mannion PF, Farrell DJ. 1999. Optimum inclusión of field peas, faba beans, chick peas and sweet lupins in poultry diets. I. Chemical composition and layer experiments. *Br. Poult. Sci.*, 40, 667-673.
- Periago MJ, Ros G, Englyst HN, Rincón F. 1994. Variation in the dietary fiber content of peas (*Pisum sativum* L.) as function of variety, size and analytical method. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Alim.*, 34, 565-575.
- Periago MJ, Ros G, López G, Martínez MC, Rincón F. 1993. Componentes de la fibra dietética y sus efectos fisiológicos. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Alim.* 33, 229-246.
- Periago MJ, Ros G, Martínez MC, Rincón F, López G, Ortuño J, Ros F. 1996a. In vitro estimation of protein and mineral availability in green peas as affected by antinutritive factors and maturity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technology*, 29, 481-488.
- Periago MJ, Englyst HN, Hudson GJ. 1996b. The influence of thermal processing on the non-starch polysaccharides (NSP) content and in vitro digestibility of starch peas. *Lebensm-Wiss. u Techn.*, 29, 33-40.
- Periago M, Ros G, Martínez C, Rincón F. 1996c. Variations of non-protein nitrogen in six Spanish legumes according to the extraction method used. *Food. Res. Int.*, 29, 489-494.
- Periago MJ, Vidal ML, Ros G, Rincón F, Martínez MC, López G, Rodrigo J, Martínez I. 1998. Influence of enzymatic treatment on the nutritional and functional properties of pea flour. *Food Chem.*, 63, 71-78.

- Perlas LA, Gibson RS. 2002. Use of soaking to enhance the bioavailability of Fe and Zn from rice-based complementary foods used in the Philippines. *J. Sci. Food Agric.*, 82, 1115-1121.
- Pernollet, JC. 1978. Protein bodies of seeds: ultrastructure, biosynthesis and degradation. *Phytochem.* 17, 1473-1480.
- Persson H, Nair BM, Frolich W, Nyman M, Asp N. 1987. Binding of mineral elements by some dietary fiber components. *In Vitro (II)*. *Food Chem.*, 26, 139-148.
- Persson H, Türk M, Nyman M, Sandberg AS. 1998. Binding of Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, and Cd<sup>2+</sup> to inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3194-3200.
- Phillippy BQ, Bland JM. 1988. Gradient ion chromatography of inositol phosphates. *Anal. Biochem.* 175, 178-181.
- Phillips RC, Abbey BW. 1989. Composition and flatulence producing of commonly eaten Nigeria and American legumes. *Food Chem.*, 33, 271-275.
- Pierce AB, Doige CE, Bell JM, Owen BD. 1977. Availability of phytate phosphorus to the growing pig receiving isonitrogenous diets based on wheat corn. *Can. J. Anim. Sci.* 57, 573-576.
- Platt SR, Clydesdale FM. 1985. Binding of iron by lignin in the presence of various concentrations of calcium, magnesium and zinc. *J. Food Sci.* 50, 1322-1325.
- Pointillart A, Fourdin A, Fontaine N. 1987. Importance of cereal phytase activity for phytate phosphorus utilization by growing pigs fed diets containing triticale or corn. *J. Nutr.* 117, 907-913.
- Porres J, López-Jurado M, Aranda P, Urbano G. 1996. Effect of processing on the bioavailability of phytic acid and zinc in lentils. En COST 98. Effects of antinutrients on the nutritional value of legume diets. Ed. Bardocz S, Muzquiz M, Puzstai A. Directorate-General Science, Research and Development, European Commission. Vol. 4., pp. 28-31.
- Porres JM, Aranda P, López-Jurado M, Urbano G. 2003a. Effect of natural and controlled fermentation on chemical composition and nutrient dialyzability from beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 51, 5144-5149.
- Porres JM, López-Jurado M, Aranda P, Urbano G. 2003b. Effect of heat treatment and mineral and vitamin supplementation on the nutritive value of protein and calcium from lentils (*Lens culinaris* M.) in growing rats. *Nutrition.*, 19, 451-456.
- Porres JM, Aranda P, López-Jurado M, Urbano G. 2005. Nutritional potential of raw and free  $\alpha$ -galactosides lupin (*Lupinus albus* Var. *multolupa*) seed flours. Effect of phytase treatment on nitrogen and mineral dialyzability. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 3088-3094.

- Posternak S. 1900. *Rev. Gen. Bot.* 12, 5-24.
- Posternak S. 1903. Sur la matiere phospho-organique de reserve des plantes a chlorophylle. Procédé de preparation. *Compt. Rend. Seances Acad. Sci.* 137, 202-204, 337-339.
- Posternak S. 1904. *Bull. Soc. Chim.* 33, 116-120.
- Posternak S. 1905. Sur la composition chimique et la signification des grains d'aleurone. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 140, 322-325.
- Posternak S. 1921. The synthesis of inositolhexaphosphoric acid. *Helv. Chim. Acta.* 4, 150. *Chem. Abstr.* 15, 1891-1893.
- Potter AL, Silveira V, McCready RM, Owen RS. 1953. Fractionation of starches from smooth and wrinkled seeded peas: molecular weights, group assays and iodine affinities of the fractions. *J. Am. Chem. Soc.* 75, 1335-1338.
- Potter BVL. 1990. Recent advances in the chemistry and biochemistry of inositolphosphates of biological interest. *Natural Products Reports.* 7, 1-23.
- Potter SM. 1995. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *J. Nutr.* 125, 606S-611S.
- Powar VK, Jagannathan V. 1982. Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 151, 1102-1108.
- Powell SR. 2000. The antioxidant properties of Zinc., *Am. Soc. Nutr. Sci.*, 1447S-1453S.
- Prasad AS. 1993. *Biochemistry of Zinc.* Plenum Press, NewYork. pp. 78-86.
- Preet K, Punia D. 2000. Proximate composition, phytic acid  $\zeta$ , poliphenols and digestibility (in vitro) of our four brown cowpea varieties. *International J. Food Sci. Nutr.* 51, 189-193.
- Price KP, Lewis J, Wyatt GM, Fenwick GR. 1988. Flatulence causes, relation to diet and remedies. *Die Nahrung,* 32, 609-623.
- Prodanov M, Sierra I, Vidal-Valverde C. 2004. Influence of soaking and cooking on the thiamin, riboflavin and niacin contents of legumes. *Food Chem.,* 84, 271-277.
- Prosky L, Asp N-G, Furda I, De Vries JW, Schweizer TF, Harland BF. 1984. Determination of total dietary fiber in foods, food products, and total diets: interlaboratory study. *J. Assoc. Off. Ana. Chem.* 67, 1044-1052.
- Prosky L, Asp N-G, Schweizer TF, De Vries JW, Furda I. 1992. Determination of insoluble and soluble dietary fiber in food products: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.,* 75, 360-367.

- Pruthi IS, Saxena AC, Manan JK. 1980. Studies on the determination of optimum conditions of preservation of fresh vegetables in acidified sulphited brine for subsequent use in Indian style curries, etc. *Indian Food Packer*. 34, 9-13.
- Pusztai A, Grant G, Buchan WC, Bardocz S, de Carvalho AF, Ewen W. 1998. Lipid accumulation in obese Zucker rats is reduced by inclusion of raw kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) in the diet. *Br. J. Nutr.*, 79, 213-221.
- Pusztay A, Grant G, Brown DJ, Stewart JC, Bardocz S. 1992. Nutritional evaluation of the trypsin (EC3.4.21.4) inhibitor from cow pea (*Vigna unguiculata* Walp.). *Br. J. Nutr.* 68, 783-791.
- Qian H, Gregory EM, Kornegay ET. 1999. Characterisation of *Aspergillus niger* phytase and investigation of the inhibitory effect of cations on the phytase activity. *J. Anim. Sci.*, 74, 8-13.
- Qian H, Kornegay ET, Denbow DM. 1997. Utilization of phytate phosphorus and calcium as influenced by microbial phytase cholecalciferol and the calcium: total phosphorus ration in broiler diets. *Poult. Sci.*, 76, 37-46.
- Quamme GA, de Rouffignac C. 2000. Epithelial magnesium transport and regulation by the kidney. *Front. Biosci.* 1, D694-D711.
- Rackis JJ, Anderson RL. 1977. Mineral availability in soy protein products. *Food Prod. Dev.* 11, 38-41.
- Rackis JJ. 1974. Biological and physiological factors in soybean. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 51, 161-164.
- Rackis JJ. 1975. Physiological effects of Food Carbohydrates. Eds Jeanes A. and Hodge J., American Chemical Society, Washington, DC, pp. 207-222.
- Ranhotra GS, Loewe RJ, Puyat LV. 1974. Effect of dietary phytic acid on the availability of iron and phosphorus. *Cereal Chem.* 51, 323-326.
- Ranhotra GS, Loewe RJ. 1975. Effect of wheat phytase on dietary phytic acid. *J. Food Sci.* 40, 940-942.
- Rao PS. 1969. Studies on the digestibility of carbohydrates in pulses. *Indian J. Med. Res.* 57, 2151-2153.
- Rapoport S, Leva E, Guest GM. 1941. Phytase in plasma and erythrocytes of various species of vertebrates. *J. Biol. Chem.* 139, 621-639.
- Ratnayake WS, Hoover R, Warkentin T. 2002. Pea starch: composition, structure and properties – a review. *Starch/Stärke.* 54, 217-234.
- Ravindran V, Cabahug S, Ravindran G, Bryden WL. 1999. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broilers. *Poult. Sci.* 78, 699-706.

- Rayssiguier Y, Mazue A, Durlach J. 2001. Advances in magnesium research; nutrition and health. John Libbey & Company Limited, London, UK. pp. 63-79.
- Rea R, Thompson LU, Jenkins DJA. 1985. Lectin in foods and their relation to starch digestibility. *Nutr. Res.* 5, 919-929.
- Reddy MB, Cook JD. 1997. Effect of calcium intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. *Am. J. Clin. Nutr.*, 65 (6), 1820-1825.
- Reddy NR, Balakrishnan CV, Salunkhe DK. 1978. Phytate phosphorus and mineral changes during germination and cooking of black gram (*Phaseolus mungo*) seeds. *J. Food Sci.* 43, 540-543.
- Reddy NR, Pierson MD, Sathe SK. 1984. Chemical, nutritional and physiological aspects of dry bean carbohydrates-a review. *Food Chem.* 13, 25-68.
- Reddy NR, Pierson MD, Sathe SK, Salunkhe DK. 1989. Phytates in Cereals and Legumes. Boca Raton, FL: CRC Press Inc. pp. 1-86.
- Reddy NR, Salunke DK, Sharma RP. 1980. Flatulence in rats following ingestion of cooked and germinated black gram and a fermented product of blackgram and rice blend. *J. Food Sci.* 45, 1161-1164.
- Reddy NR, Sathe SK, Salunkhe DK. 1982. Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food. Res.* 28, 1-92.
- Reichert RD, Mackenzie SL. 1982. Composition of peas (*Pisum sativum*) varying widely in protein content. *J. Agric. Food Chem.* 30, 312-318.
- Reinhold JG, Nasr K, Lahimgarzadeh A, Hedayati H. 1973. Effects of purified phytate and phytate rich bread upon metabolism of zinc, calcium, phosphorus and nitrogen in man. *Lancet.*, 1, 283-286.
- Reinhold JG, Ismail-Beigi F, Faradji B. 1975. Fibre and phytate as determinant of the availability of calcium, zinc, and iron of bread stuffs. *Nutr. Rep. Int.* 12, 75-78.
- Reinhold JG, Faradji B, Abadi P, Ismail-Beigi F. 1976. Decreased absorption of calcium, magnesium, zinc and phosphorus by humans due to increased fibre and phosphorus consumption as wheat bread. *J. Nutr.*, 106, 493-503.
- Remesy C, Levrat-Verny MA, Gamet L, Demigne C. 1993. Cecal fermentations in rats fed oligosaccharides (inulin) are modulated by dietary calcium level. *Am. J. Physiol.* 264, G855-G862.
- Richardson AE, Hadobas PA. 1997. Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. *Can. J. Microbiol.* 43, 509-516.
- Riemer J, Whittaker JB. 1989. Air pollution and insect herbivores: observed interactions and possible mechanism. In *Insect-Plant Interactions*; Bernays, E. A., Ed: CRC Press: Boca Raton, FL, 1989; pp 74-98.

- Riensefeld G, Sklan D, Bar A, Eisner U, Hurwit S. 1980. Glucose adsorption and starch digestion in the intestine of the chicken. *J. Ntr.* 110, 117-121.
- Rimbach G, Pallauf J. 1993. Enhancement of zinc utilization from phytate-rich soy protein isolate by microbial phytase. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft.* 32, 308-315.
- Rimbach G, Pallauf J. 1999. Effect of dietary phytate on magnesium bioavailability and liver oxidant status in growing rats. *Food Chem. Toxicol.* 37, 37-45.
- Roberfroid MB. 1997. Health benefits of non-digestible oligosaccharides. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 427, 211-219.
- Roberfroid MB. 1998. Prebiotics and symbiotics: concepts and nutritional properties. *Br. J. Nutr.*, 80, 197-202.
- Rodriguer R, Raina BL, Kalra CL, Varadarajan AR, Teotia MS. 1979. Studies on evaluation of pea varieties for processing. *Indian Food Packer.* 33, 38-42.
- Rodriguez E, Mullaney EJ, Lei XG. 2000. Expression of the *Aspergillus fumigatus* phytase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Communic.*, 268, 373-378.
- Ros G, Rincón F. 1990. Indices of quality and maturity for different commercial sizes of pea seed for canning. *Food Chem.*, 38, 1-10.
- Rossander L. 1987. Effect on dietary fiber on iron absorption in man. *Scan J. Gastroenterol.*, 129, 68-72.
- Rossander-Hulthen L, Gleerup A, Hallberg L. 1990. Inhibitory effect of oat products on non-haem iron absorption in man. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 44 (11), 783-791.
- Rossander L, Sandberg A-S, Sandström B. 1992. The influence of dietary fibre on mineral absorption and utilization. In T. F. Schweizer, & C. A. Edwards (Eds.), *Dietary fibre a component of food* London: Springer-Verlag. pp. 197–216.
- Rowland I, Rummey C, Silvi S, Cresci A, Pool-Zobel B. 1998. Effect of non digestible oligosaccharides and resistant starch on biochemical and mucosal biomarkers of colonic neoplasia in rats. *Proceedings of Profibre. Lisbon.*, pp. 26-34.
- Rude RK. 1998. Magnesium deficiency: a cause of heterogeneous disease in humans. *J. Bone Miner. Res.* 13, 749-758.
- Ruf JC, Ciavatti M, Gustafsson T, Renaud S. 1991. Effects of PP-56 and vitamin E on platelet hyperaggregability, fatty acid abnormalities, and clinical manifestations in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetis.* 40, 233–239.
- Ryan CA. 1973. Proteolytic enzymes and their inhibitor in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24, 173-196.

- Saharan K, Khetarpaul N, Bishnoi S. 2001. HCl-extractability of minerals from ricebean and fababean: influence of domestic processing methods. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.*, 2, 323-325.
- Saio K, Koyama E, Watanabe T. 1967. Protein-calcium-phytic acid relationships in soybean. I. Effects of calcium and phosphorus on solubility characteristics of soybean meal protein. *Agric. Biol. Chem.* 31, 110-114.
- Sakamoto K, Vucenic I, Shamsuddin AM. 1993. [<sup>3</sup>H] phytic acid (inositol hexaphosphate) is absorbed and distributed to various tissues in rats. *J. Nutr.* 123, 713-720.
- Salgado P, Freire JPB, Mourato M, Cabral F, Toullec R, Lalles JP. 2002. Comparative effects of different legume protein sources in weaned piglets: nutrient digestibility, intestinal morphology and digestive enzymes. *Lives. Prod. Sci.*, 74, 191-202.
- Salunkhe DK, Kadam SS. 1989. Introduction, In: *Handbook of World Food Legume. Nutritional, Chemistry, Processing, Technology and Utilization*. Ed: Salunkhe, D.K. Kadam, S.S. CRC. Press. Boca Raton. Florida. Vol 1, 1-4.
- Salunkhe DK, Pao SK and Dull GG. 1974. Assessment of nutritive value, quality and stability of cruciferous vegetables during storage and subsequent processing, in *Storage, Processing and Nutritional Quality of Fruits, and Vegetables*, Salunkhe, D. K., Ed., CRC Press, Cleveland, OH, 1-65.
- Salunkhe DK, Sathe SK and Reddy NR. 1982. Legume lipids, in *Chemistry and Biochemistry of Legumes*, Arora, S. K., Ed., Oxford and IBH, New Delhi, 51-84.
- Sánchez, J., Rama, R. 1988. Effect of ethanol on the iron uptake by rat reticulocytes. *Revista española de fisiología.*, 44 (2), 231-232.
- Sandberg AS, Hasselblad C, Hasselblad K, Hulten L. 1982. The effect of wheat bran on the absorption of minerals in the small intestine. *Br. J. Nutr.*, 48, 185-191.
- Sandberg AS, Ahderinne R. 1986. HPLC-method for determination of inositol tri-, tetra-, penta- and hexaphosphates in foods and intestinal contents. *J. Food Sci.* 51, 547-550.
- Sandberg AS, Anderson H, Carlsson N, Sandstrom B. 1987. Degradation products of bran phytate formed during digestion in human small intestine: Effect of extrusion cooking on digestibility. *J. Nutr.* 117, 2061-2065.
- Sandberg AS, Anderson H. 1988. Effect of dietary phytase on the digestion of phytate in the stomach and small intestine of humans. *J. Nutr.* 118, 469-473.
- Sandberg AS, Svanberg U. 1991. Phytate hydrolysis by phytase in cereals. Effects on in vitro estimation of iron availability. *J. Food Sci.* 56, 1330-1333.
- Sandberg AS. 1991. The effect of food processing on plantate hydrolysis and

- availability of iron and zinc. Proceedings of Nutritional and toxicological Consequences of Food processing AIN Symposium, Washington, 1990. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 289, 499–508.
- Sandberg AS, Rossander Hulthen L, Türk M. 1996. Dietary *Aspergillus niger* phytase increases iron absorption in humans. *J. Nutr.* 126, 476–480.
- Sandberg AS, Brune M, Carlsson NG, Hallberg L, Skoglund E, Rossander-Hulthen L. 1999. Inositol phosphates with different number of phosphate groups influence iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 240-246.
- Sandberg AS, Andlid T. 2002 . Phytogenic and microbial phytases in human nutrition. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37, 823-833.
- Sandberg AS. 2002a. bioavailability of minerals in legumes. *Br. J. Nutr.*, 88, 281-285.
- Sandberg AS. 2002b. In vitro and in vivo degradation of phytate. In: *Food Phytates* (edited by N.R. Reddy & S.K. Sathe). Boca Raton, London, New York, Washington DC: CRC Press. pp. 139-155.
- Sandstead HH. 1995. Is zinc deficiency a public health problem? *Nutr.*, 11, 87-92.
- Sandstead HH. 2000. Causes of iron and zinc deficiencies and their effects on brain. *J. Nutr.* 130, 347-353.
- Sandström B, Arvidsson B, Cederblad A, Bjorn-Rasmussen E. 1980. Zinc absorption from composite meals. I. The significance of wheat extraction rate, zinc, calcium, and protein content in meals based on bread. *Am. J. Clin. Nutr.* 33, 739-745.
- Sandström, B.; Sandberg, A. S. 1992. Inhibitory effects of isolated inositol phosphates on zinc absorption in humans. *J. Trace. Elem. Health. Dis.* 6, 99-103.
- Sandstrom B, Davidsson L, Cederblad A, Lonnerdal B. 1985. Oral iron, dietary ligands and zinc absorption. *J Nutr.*, 115, 411-414.
- Sandström, B. 1997. Bioavailability of zinc. *Eur. J. Clin. Nutr.* 51, S17-S19.
- Sandström B, Bügel S, Brian A, Price J, Reid M. 2000. A high oat-bran intake does not impair zinc absorption in humans when added to a low-fiber animal protein-based diet. *Am. Soc. Nutr. Sci.*, 594-599.
- Saris NE, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JA, Lewenstam A. 2000. Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clin. Chim. Acta.*, 294, 1–26.
- Sarwar G, Peace RW. 1986. Comparisons between true digestibility of total nitrogen and limiting amino acids in vegetable proteins fed to rats. *J. Nutr.* 116, 1172-1184.
- Sathe SK, and Salunkhe DK. 1984. Technology of removal of unwanted components of dry beans. *CRC Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 21, 3-8.

- Satterga FR. 1968. Gastrointestinal gas following food consumption. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 150, 57-60.
- Sautarious KA, Milde H. 1977. Sugar compartmentation in frost hardy and partially dehardened cabbage leaf cells. *Planta.* 136, 163-167.
- Savage GP, Deo S. 1989. The nutritional value of peas (*Pisum sativum*): A literature review. *Nutr. Abstr. Rev. (Series A).* 59, 65-88.
- Savelkoul, FHMG.; Van der Poel, AFB.; Tamminga, S. The presence and inactivation of trypsin inhibitors, tannins, lectins and amylase inhibitors in legume seeds during germination. A review. *Plant. Foods. Hum. Nutr.*, 1992, 42, 71-85.
- Savitri A, Desikachar HSR. 1985. A comparative study of flatus production in relation to oligosaccharide content of some legumes. *Nutr. Rep. Int.* 31, 337-342.
- Schlemmer U, Müller H, Jany KI-D. 1995. The degradation of phytic acid in legumes prepared by different methods. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 49 (Suppl. 3), 207-210.
- Schölmerich J, Freudemann A, Köttgen E, Wietholtz H, Steiert B, Löhle E, Haussinger D, Gerok W. 1987. Bioavailability of zinc from zinc-histidine complexes. I. Comparison with zinc sulfate in healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* 45, 1480-1486.
- Schormuller J, Hohne R, Wurdig G. 1956. Determination of phytin. *Dtsch. Lebensm-Rundsch.* 52, 213-222.
- Schroeder HE. 1984. Major albumins of *Pisum cotyledons*. *J. Sci. Food Agric.* 35, 191-196.
- Schweigel M, Martens H. 2000. Magnesium transport in the gastrointestinal tract. *Front. Biosci.* 1, D666-D677.
- Sebastian S, Touchburn SP, Chavez ER, Lague PC. 1996. Efficacy of supplemental microbial phytase at different dietary calcium levels on growth performance and mineral utilisation of broiler chickens. *Poult. Sci.* 75, 1516-1523.
- Segueilha L, Lambrechts C, Boce H, Moulin G, Galzy P. 1992. Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castellii*. *J. Fermentation and Bioengineering.* 92(74), 7-11.
- Serraino MR, Thompson LU, Savole L, Parent G. 1985. Effect of phytic acid on the in vitro rate of digestibility of rapeseed protein and amino acids. *J. Food Sci.* 50, 1689-1774.
- Sgarbieri VC. 1989. Composition and nutritive value of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). In *Nutritional Value of Cereal Products, Beans and Starches*; Bourne, GH, Ed.; World Review Nutrition Diet: Basel, Switzerland, Vol. 60, pp 132-198.
- Shamsuddin AM, Vucenik I, Cole KE. 1997. IP-6: a novel anti-cancer agent. *Life Sci.* 61, 343-354.

- Shamsuddin AM. 1995. Inositol phosphates have novel anticancer function. *J. Nutr.*, 125, S725-732.
- Shankar AH, Prasad AS. 1998. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 447S-463S.
- Sharma CB, Goel M, Irshad M. 1978. Myoinositol hexaphosphate as a potential inhibitor of  $\alpha$ -amylases. *Phytochem.* 17, 201-203.
- Shieh TR, Ware JH. 1968. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Appl. Microbiol.* 16, 1348-1351.
- Shimizu M. 1992. Purification and characterization of a phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 1266-1269.
- Shimizu M. 1994. Purification and Characterization of phytase and acid phosphatase produced by *Aspergillus oryzae* K1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57, 1364-1365.
- Shurpalekar KS, Sundarvalli OE, Rao MN. 1979. Effect of legume carbohydrates on protein utilization and lipid levels in rats. *Nutr. Rep. Int.* 19, 119-122.
- Siddhuraju P, Becker K. 2001. Effect of various domestic processing methods on antinutrients and in vitro protein and starch digestibility of two indigenous varieties of indian tribal pulse, *Mucuna pruriens* Var. *utilis*. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3058-3067.
- Siegenberg D, Baynes RD, Bothwell TH, y col. 1991. Ascorbic acid prevents the dose-dependent inhibitory effects of polyphenols and phytates on nonheme-iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 537-541.
- Silva HC, Luth BS. 1979. Changes in oligosaccharides and starch granules in germinating beans. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 12, 103-106.
- Simons PCM, Versteegh HAJ, Jongbloed AW, Kemme PA, Slump P, Bos KD, Wolters MGE, Beudeker RF, Verschoor GJ. 1990. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *Br. J. Nutr.* 64, 525-540.
- Simpson KM, Morris ER, Cook JD. 1981. The inhibitory effect of bran on iron absorption in man. *Am. J. Clin. Nutr.*, 34 (8), 1469-1478.
- Simpson CJ, Wise A. 1990. Binding of zinc and calcium to inositol phosphates (phytate) in vitro. *Br. J. Nutr.* 64, 225-232.
- Singh HD, Banerjee S. 1955. Studies on the effect of germination on the availability of iron in some common Indian pulses. *Indian J. Med. Res.* 43, 497-500.
- Singh M, Krikorian AD. 1982. Inhibition of trypsin activity in vitro by phytate. *J. Agric. Food Chem.* 30, 799-805.
- Singh R, George M, Soni GL. 1983. Role of dietary fiber from pulses as

- hypocholesterolemic agent. *J. Food Sci. Technol.* 20, 228-234.
- Singh S, Singh HD, Sikka KC. 1968. *Cereal Chem.* 45, 13-16.
- Singh U, Singh B. 1992. Tropical grain legumes as important human foods. *Economic Botany.* 46, 310-321.
- Singh U. 1985. Nutritional quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.): Current status and future research needs. *Qualitas Plant Foods Hum. Nutr.* 35, 339-351.
- Singsen EP, Matterson LD, Tlustohowicz JJ, Pudelkiewicz WJ. 1969. Phosphorus in the nutrition of adult hen. II. The relative availability of phosphorus from several sources for caged layers. *Poult. Sci.* 48, 387-396.
- Siren M, Linne L, Persson L. 1991. Pharmacological effects of d-myo-inositol-1,2,6-trisphosphate. In: *Inositol Phosphates and Derivatives. Synthesis, Biochemistry and Therapeutic Potential* (edited by A.B. Reitz). Washington DC: American Chemical Society. pp. 103–110.
- Smith AA, Rackis JJ. 1957. Phytin elimination in soybean protein isolation. *J. Am. Chem. Soc.* 70, 663-665.
- Somiari RI y Balogh E. 1993. Effect of soaking, cooking and crude  $\alpha$ -galactosidase treatment on the oligosaccharide content of cowpea flours. *J. Sci. Food Agric.*, 61, 339-343.
- Soni GL, Molly G, Singh R. 1982. Role of common Indian pulses as hypocholesterolemic agents. *Indian J. Nutr. Diet.* 19, 184-189.
- Soni GL, Sohal BS, Singh R. 1979. Comparative effect of pulses on tissue and plasma cholesterol levels of albino rats. *Indian J. Biochem. Biophys.* 16, 44-47.
- Sosulski FW, Elkowicz L, Reichert RD. 1982. Oligosaccharides in eleven legumes and their airclassified protein and starch fractions. *J. Food Sci.* 47, 498-503.
- Soughate DAT. 1989. Conceptual issues concerning the assessment of nutrient bioavailability. *Nutrient availability: Chemical and biological aspects.* D.A.T. Southgate, I.T. Johnson, G.R. Fenwick, eds. Royal Society of Chemistry, Cambridge. 10-12.
- Sovolev AM. 1966. On the state of phytin in the aleurone grains of mature and germinating seeds. *Sov. Plant Physiol.* 13, 177-179.
- Starkenstein, E. 1914. Pharmacological action of acids wich precipitate calcium and of magnesium salts. *Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* 77, 45-48.
- Steggerda FR. 1968. Gastrointestinal gas following food consumption, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 150, 57-60.
- Strother S. 1980. Homeostasis in germinating seeds. *Ann. Bot.* 45, 217-218.

- Sturmiolo GC, Montino MC, Rosetto L, Martin A, D'Inca R, D'Odorico A, Naccarato R. 1991. Inhibition of gastric acid secretion reduces zinc absorption in man. *J. Am. Coll. Nutr.* 10, 372-375.
- Suarez FL, Springfield J, Furne JK, Lohrmann TT, Kerr PS, Levitt MD. 1999. Gas production in humans ingesting a soybean flour derived from beans naturally low in oligosaccharides. *Am. J. Cl. Nutr.* 69: 135-139.
- Suzuki U, Yoshimura K, Takaishi M. 1907. Ueber ein enzym Phytase das anhydro-oxy-methylen disphosphorsaure spaltet. *Coll. Agric. Bull., Tokyo Imp. Univ.* 7, 503-505.
- Svanberg U, Lorri W, Sandberg AS. 1993. Lactic fermentation of non-tannin and high-tannin cereals: effect on in vitro estimation of iron availability and phytate hydrolysis. *J. Food Sci.* 58, 408-412.
- Tambe SM, Kaklij GS, Keklar SM, Parekh LJ. 1994. Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes*: evidence for unusually small active enzyme peptide. *J. Fermentation and Bioengineering.* 77, 23-27.
- Tangendjaja B, Buckle KA, Wootton M. 1980. Analysis of phytic acid by high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.* 197, 274-277.
- Taylor GR, Williams CM. 1998. Effects of probiotics and prebiotics on blood lipids. *Br. J. Nutr.*, 80, 225-230.
- Taylor TG, Coleman JW. 1979. A comparative study of the absorption of calcium and the availability of phytate-phosphorus in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) and the laboratory rat. *Br. J. Nutr.* 42, 113-119.
- Taylor TG. 1965. The availability of the calcium and phosphorus of plant materials for animals. *Proc. Nutr. Soc.* 24, 105-108.
- Theil EC. 2001. Ferritin. In: Messerschmidt A, Huber R, Poulos T, Wieghardt K, eds. *Handbook of metalloproteins*. Chichester, United Kingdom: Wiley & Sons, 771-781.
- Theil EC. 2004. Iron, ferritin and nutrition. *Annu. Rev. Nutr.*, 24, 327-343.
- Thomas K. 1909. Über die biologische Wertigkeit der Stickstoffsubstanzen in verschiedenen Nahrungsmitteln. *Arch. Anat. Physiol. Physiologischer Abteilung.* 219-302.
- Thompson LU, Serraino MR. 1986. Effect of amino acid reduction on rapeseed digestibility and amino acid absorption. *J. Agric. Food Chem.* 34, 468-469.
- Thompson LU, Yoon JH. 1984. Starch digestibility as affected by polyphenols and phytic acid. *J. Food Sci.* 49, 1228-1229.
- Thorne MJ, Thompson LU, Jenkins DJA. 1983. Factors affecting starch digestibility and the glycemic response with special reference to legumes. *Am. J. Clin. Nutr.* 38,

481-488.

- Tijsskens LMM, Greiner R, Biekman ESA, Konietzny U. 2001. Modeling the Effect of Temperature and pH on Activity of Enzymes: The Case of Phytases. *Biotechnology Bioengineering*. 72, 323-330.
- Torre M, Rodriguez AR, Saura-Calixto F. 1991. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1, 1-22.
- Trinidad TP, Wolever TMS, Thompson LU. 1993. Interactive effects of calcium and short chain fatty acids on absorption in the distal colon of man. *Nutr. Res.* 13, 417-425.
- Troost FJ, Brummer RJM, Dainty JR, Hoogewerff JA, Bull VJ, Saris WHM. 2003. Iron supplements inhibit zinc but not copper absorption in vivo in ileostomy subjects. *Am J Clin Nutr.*, 78, 1018-1023.
- Trowell H. 1972. Ischemic heart disease and dietary fiber. *Am. J. Clin. Nutr.* 25, 926-928.
- Trugo LC, Farah A, Trugo NMF. 1993. Germination and debittering luppin seeds reduce  $\alpha$ -galactoside and intestinal carbohydrate fermentation in humans. *J. Food Sci.* 58, 637-630.
- Trugo LC, Ramos LA, Trugo NMF, Souza MCP. 1990. Oligosaccharide composition and trypsin inhibitor activity of *Phaseolus vulgaris* and the effect of germination on the alpha-galactoside composition and fermentation in the human colon. *Food Chem.* 36, 53-61.
- Trugo, LC.; von Baer, D. 1998. Analytical methods for the analysis of antinutrients in legume seeds. In *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Rapeseed*; Jansman, A. J. M., Hill, G. D., Huisman, J., van der Poel, A. F. B., Eds.; Wageningen Pers: Wageningen, The Netherlands, pp 11-28.
- Truter MR, Tate ME. 1970. Crystallographic studies of hydrates of dodecasodium myo-inositol hexaphosphate (phytic acid). *J. Chem. Soc. B.* 1, 70-71.
- Türk M, Carlsson NG, Sandberg AS. 1996. Reduction in the levels of phytate during wholemeal bread making: effect of yeast and wheat phytases. *J. Cereal Sci.* 23, 257-264.
- Turnlund JR, King JC, Keyes WR, Gong B, Michel MC. 1982. A stable isotope study of zinc absorption in young men: effects of phytate and  $\beta$ -cellulose. *Am. J. Clin. Nutr.* 40, 1071-1077.
- Turnlund JR. 1987. Carbohydrate, fiber and mineral interactions. In *O. A. Levander, Nutrition 87*, Bethesda MD: American Institute of Nutrition. pp 37-40.
- Ullah A, Shamsuddin AM. 1990. Dose-dependent inhibition of large intestinal cancer by inositol hexaphosphate in F344 rats. *Carcinogenesis*. 11, 2219-2222.

- Ullah AHJ, Gibson DM. 1987. Extracellular phytase (E.C. 3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. *Preparative Biochemistry*. 17, 63–91.
- Urbano G, Lopez-Jurado M, Hernández J, Fernández M, Moreu M, Frías J, Díaz Pollán C, Prodanov M, Vidal-Valverde C. 1995. Nutritional assesment of raw, Heated and germinated lentils. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1871-1877.
- Urbano G, Aranda P, Gómez-Villalva E, Frejnagel S, Porres J, Frías J, Vidal-Valverde C, López-Jurado M. 2003. Nutritional evaluation of pea (*Pisum sativum* L.) protein diets after mild hydrothermal treatment and with and without added phytase. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2415-2420.
- Urbano G, López-Jurado M, Frejnagel S, Gómez-Villalva E, Porres J, Frías J, Vidal-Valverde C, Aranda P. 2005a. Nutritional assessment of raw and germinated pea (*Pisum sativum*, L.) protein and carbohydrate by in vitro and in vivo techniques. *Nutrition* 21, 230–239.
- Urbano G, Aranda P, Vílchez A, Aranda C, Cabrera L, Porres J, López-Jurado M. 2005b. Effects of germination on the composition and nutritive value of proteins in *Pisum sativum*, L. *Food Chem.*, 93, 671-679.
- Urbano G, López-Jurado M, Aranda C, Vílchez A, Cabrera L, Porres J, Aranda P. 2005c. Evaluation of zinc and magnesium bioavailability from pea (*Pisum sativum*, L) sprouts. Effect of illumination and different germination periods. *Int. J. Food Sci.*, 40.
- Urbano MG, Goñi I. 2002. Bioavailability of nutrients in rats fed on edible seaweeds, Nori (*Porphyra tenera*) and Wakame (*Undaria pinnatifida*), as a source of dietary fibre. *Food Chem.*, 76, 281-286.
- Uwaegbute AC, Iroegbu CU, Eke O. 2000. Chemical and sensory evaluation of germinated cowpeas (*Vigna unguiculayta*) and their products. *Food Chem.* 68, 141-146.
- Vaishale A, Sadhana J, Seema K, Kishore P, Shasni Ch, Agte V, Joshi S, Khot S, Paknikar K and ChiplonkarS. 1998. Effect of processing on phytate degradation and mineral solubility in pulses. *J. Food. Sci Technol.*, 35 (4) 330-332.
- Valdebouze P, Bergeron E, Gaborit T, Delort-Laval J. 1980. Content and distribution of trypsin inhibitors and haemagglutinins in some legume seeds. *Can. J. Plant Sci.* 60, 695-701.
- Vallee B, Falchuk KH. 1993. The biochemical basis of zinc. *Physiol. Rev.* 73, 79-118.
- Van Campen D, House WA. 1974. Effect of a low protein diet on retention of an oral dose of <sup>65</sup>Zn and on tissue concentrations of zinc, iron, and copper in rats. *J. Nutr.* 104, 84-90.
- Van den Berg CJ, Hill CF, Stanburg SW. 1972. Inositol phosphates and phytic acid as inhibitors of biological calcification in the rat. *Clin. Sci.* 43, 377-383.

- Van der Poel AFB. 1990. Effect of procesing on antinutritional factors and protein nutritional value of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). A review. Anim. Feed Sci. Technol. 29, 179-208.
- Van Dokkum W, Wesstra A, Schippers FA. 1982. Physiological effect of fibre-rich types of bread I. The effect of dietary fibre from bread on the mineral balance of young men. Br. J. Nutr., 47, 451-460.
- Van Hartingsveldt W, Hessing M, van der Lugt JP, Somers WAC. 1995. 2nd European Symposium on Feed Enzymes. Proceedings of ESFE2, Noordwijkerhout, Netherlands. pp. 49-58.
- Van Hoorna JW, Katerjib N, Hamdyc A, Mastrorilli M. 2001. Effect of salinity on yield and nitrogen uptake of four grain legumes and on biological nitrogen contribution from the soil. Agric. Water Management., 51, 87-98.
- Van Loo F, Cummings J, Delzenne N, Englyst H, Frank A, Hopkins M, Kok N, Macfarlane G, Newton D, QuigleyM, Roberfroid M, Van Vliet, Van den Heuvel E. 1999. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). Br. J. Nutr., 81, 121-132.
- Van Loo F. 1998. Non-digestible oligosaccharides are prebiotic functional food ingredients with promising health benefits. Proceedings of Profibre. Lisbon. pp. 21-29.
- Van Soest PJ, Wine RH. 1968. Determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permangante. J. Assos. Off. Anal. Chem. 51, 780-783.
- Vanhoof K, De Schrijver R. 1996. Availability of minerals in rats and pigs fed non-purified diets containing inulin. Nutr. Res., 16, 1017-1022.
- Varela G, Moreiras O, Carbajal A y Campo M. 1995. Estudio Nacional de Nutrición y Alimentación 1990/1991. Publicaciones del Instituto Nacional de Estadística, Madrid. pp. 13-24
- Varner JE and Schidlovsky G. 1963, Intracellular distribution of proteins in pea cotyledons. Plant Physiol. 38, 139-141.
- Vidal-Valverde C, Frías J. 1992. Changes in carbohydrates during germination of lentils. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 194, 461-464.
- Vidal-Valverde C, Frías J. 1993a. Changes in the carbohydrate composition of legumes after soaking and cooking. J. Am. Dietetic Assoc. 93, 547-550.
- Vidal-Valverde C, Frías J, Prodanov J, Tabera M, Ruiz R, Bacon J. 1993b. Effect of natural fermentation on carbohydrates, riboflavin, and trypsin inhibitor anctivity of lentils. Z Lebensm. Unters. Forsch. 197, 449-452.
- Vidal-Valverde C, Frías J, Estrella I, Gorospe MJ, Ruiz R, Bacon J. 1994. Effect of processing on some antinutritional factors of lentils. J. Agric. Food Chem., 42,

2291-2295.

- Vidal-Valverde C, Frías J, Díaz- Pollan C, Fernández M, López-Jurado M, Urbano G. 1997. Influence of processing on trypsin inhibitor activity of faba beans and its physiological effect. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3559- 3564.
- Vidal-Valverde C, Pascual-Montaner M, Díaz- Pollan C, Vicente G, Frías J. 1998a. Changes of antinutritional factors during germination of peas. 3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes. Valladolid. Part II, 388-389.
- Vidal-Valverde C, Frías J, Sotomayor C, Diaz-Pollan C, Fernandez M, Urbano G. 1998b. Nutrients and antinutritional factors in faba beans as affected by processing. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.*, 207, 140-145.
- Vidal-Valverde C, Sierra I, Frias J, Prodanov M, Sotomayor C, Hedley CL, Urbano G. 2002a. Nutritional Evaluation of lentil Flours obtained after short time soaking processes. *Eur. Food Res. Technol.* 215, 138-144.
- Vidal-Valverde C, Frias J, Sierra I, Blazquez I, Lambein F, Kuo Y-H. 2002b. New functional legume foods by germination: Effect on the nutritive value of beans, lentils and peas. *Eur. Food Res. Technol.*, 215, 472-477.
- Vohra P, Gray GA, Kratzer FH. 1965. Phytic acid metal complexes, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 120, 147-151.
- Volfová O, Dvoráková J, Hanzlíková A, Jandera A. 1994. Phytase from *Aspergillus niger*. *Folia Microbiologica.*, 36, 481-484.
- Vorster HH., Venter CS. 1994. Health benefits of dry beans (*Phaseolus vulgaris*): a review, *S Afr J. Food Sci. Nutr.*, 6, 72-76.
- Vose JR, Basterrechla MJ, Gorin PA Jr., Finlayson AJ, Youngs CG. 1976. Air classification of field peas and horse bean flours: Chemical studies of starch and protein fractions. *Cereal Chem.* 53, 928-932.
- Vucenik I, Sakamoto K, Bansal M, Shamsuddin AM. 1993. Mammary carcinogenesis inhibition by inositol compounds. *Cancer Letters.* 75, 95–102.
- Wade HE, Morgan DM. 1955. Fractionation of phosphates by paper ionophoresis and chromatography. *Biochem. J.* 60, 264-270.
- Waldroup PW. 1999. Nutritional approaches to reducing phosphorus excretion by poultry. *Poult. Sci.* 78, 683-691.
- Walker ARP, Fox FW, Irving JT. 1984. Studies in human mineral metabolism. 1. The effect of bread rich in phytate phosphorus on the metabolism of certain mineral salts with special reference to calcium. *Biochem. J.* 42, 452-462.
- Walker ARP, Fox FW, Irving KT. 1948. Studies in human mineral metabolism. 1. The effect of bread rich in phytate-phosphorus on the metabolism of certain mineral

- salts with special reference to calcium. *Biochem. J.* 42, 452-462.
- Walker ARP. 1951. Cereals, phytic acid and calcification. *Lancet.* 2, 244-247.
- Walsh CT, Sandstead HH, Prasad AS y col. 1994. Health effects and research priorities for the 1990s. *Environ. Health Perspect.*, 102, 5-46.
- Walter López H, Leenhardt F, Coudray C, Remesy C. 2002. Minerals and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition?. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 37, 727-739.
- Wanasundara PKJPD, Shahidi F, Brosnan ME. 1999. Changes in flax (*Linum usitatissimum*) seed nitrogenous compounds during germination. *Food Chem.*, 65, 289-295.
- Wang N, Lewis MJ, Brennan JG, Westby A. 1997. Effect of processing methods on nutritional and anti-nutritional factors in cowpea. *Food Chem.* 58, 59-68.
- Wang N, Daun JK. 2004. Effect of variety and crude protein content on nutrients and certain antinutrients in field peas (*Pisum sativum*). *J. Sci. Food Agric.*, 84, 1021-1029.
- Wang XF, Warkentin TD, Briggs CJ, Oomah BD, Campbell CG, Woods S. 1998. Trypsin inhibitor activity in field pea (*Pisum sativum* L.) and grass pea (*Lathyrus sativus* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2620-2623.
- Wang N, James KD, Malcolmson LJ. 2003. Relationship between physicochemical and cooking properties, and effects of cooking on antinutrients, of yellow field peas (*Pisum sativum*). *J. Sci. Food Agric.*, 83, 1228–1237.
- Warnock DJ. 1976. Factors Affecting Field Pea and Faba Bean Production in the Black and Grey Black Soils of Saskatchewan, M. Sc. Thesis, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada.
- Weaver CM, Heaney RP, Martin BR, Fitzsimmons ML. 1991. Human calcium absorption from whole-wheat products. *J. Nutr.*, 121, 1769-1775.
- Weaver CM, Heaney RP, Teegarden D, Hinders SM. 1996. Wheat bran abolishes relationship between calcium load size and absorption fraction in women. *J. Nutr.*, 126, 303-307.
- Weaver CM, Kannan S. 2002. Phytate and mineral bioavailability. In N. R. Reddy & S. K. Sathe (Eds.), *Food phytates*. Boca Raton: CRC Press., pp. 211–224.
- Wheeler EL, Ferrel RE. 1971. A method for phytic acid determination in wheat and wheat fractions. *Cereal Chem.* 48, 312-320.
- Whittaker, P. 1998. Iron and zinc interactions in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 442S-446S.

- Widdowson EM, Thrusell LA. 1951. The absorption and excretion of nitrogen, calcium, magnesium and phosphorus. In: *Studies of Undernutrition, Wuppertal 1946–9*. Medical Research Council Special Report 275. London: His Majesty's Stationery Office. pp. 296–312.
- Williams GM, Williams CL, Weisburger JH. 1999. Diet and cancer prevention: the fiber first diet. *Toxicol. Sci.*, 52, 72-86.
- Williams SG. 1970. The role of phytic acid in the wheat grain. *Plant Physiol.* 45, 376-381.
- Wiryawon KG, Dingle JG. 1995. Screening tests of the protein quality of grain legumes for poultry production. *Br. J. Nutr.* 74, 671-679.
- Wise A, Gilbert DJ. 1981. Binding of cadmium and lead to the calcium-phytate complex in vitro. *Toxicol. Lett.* 9, 45-50.
- Wise A, Gilbert DJ. 1982a. In vitro competition between calcium phytate and the soluble fraction of rat small intestine for cadmium, copper and zinc. *Toxicol. Lett.* 11, 49-54.
- Wise A, Gilbert DJ. 1982b. Phytate hydrolysis by germfree and conventional rats. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 753-756.
- Wise A, Richards CP, Trimble ML. 1983. Phytate hydrolysis in the gastrointestinal tract of the rat followed by phosphorus-31 Fourier transform nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 313-314.
- Wiserman J, Cole DJA. 1988. European legumes in diets for non-ruminants. In: *Recent Advances in Animal Nutrition*, W. Haresing, W. Y D.J.A. Cole, editors. Butterworth, London., pp. 13-37
- Wogcik J, Delrome CB. 1982. The effect of dietary cellulose level on the utilization of amino acid supplemented bread protein in weanling rats. *Nutr. Rep. Int.* 25, 709-714.
- Wolever TMS. 1990. The glycemic index. *World Rev. Nutr. Diet.* 62, 120-125.
- Wolf W, Briggs DR. 1959. Purification and characterization of 11S component of soybean proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 85, 186-190.
- Wolters MGE, Diepenmat HB, Hermas RJJ, Voragen AGJ. 1993. Relation between in vitro availability of minerals and food composition: a mathematical model. *J. Food Sci.* 58, 1349-1355.
- Wong S, Traianedes K, O'Dea K. 1985. Factors affecting the rate of hydrolysis of starch in legumes. *Am. J. Clin. Nutr.*, 42, 38-43.

- Wyss M, Brugger R, Kronenberger A, y col. 1999a. Biochemical characterization of fungal phytases (myoinositol hexakisphosphate phosphohydrolase): catalytic properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 367–373.
- Wyss M, Pasamontes L, Friedlein A, y col. 1999b. Biophysical characterization of fungal phytases (myoinositol hexakisphosphate phosphohydrolase): molecular size, Glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 359–366.
- Yamamoto S, Minoda Y, Yamada K. 1972. Chemical and physicochemical properties of phytase from *Aspergillus terreus*. *Agric. Biol. Chem.* 36, 2097-2103.
- Yang G, Shamsuddin AM. 1995. IP-6-induced growth inhibition and differentiation of HT-29 human colon cancer cells: involvement of intracellular inositol phosphates. *Anticancer Research.* 15, 2479–2488.
- Yang W, Matsuda Y, Sano S, Masutani H, Nakagawa H. 1991. Purification and characterization of phytase from rat intestinal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta.* 1075, 75-82.
- Yi Z, Kornegay ET. 1996. Sites of phytase activity in the gastrointestinal tract of young pigs. *Ani. Feed Sci. Technol.* 61, 261–368.
- Yip R, Dallman G, 1998. Iron deficiency. *Bulletin of the World Health Organization.*, 76 (2) 121-123.
- Yonekura L, Suzuki H. 2003. Some polysaccharides improve zinc bioavailability in rats fed a phytic acid-containing diet. *Nutr. Res.*, 23, 343-355.
- Yonekura L, Tamura H, Suzuki H. 2004. Chitosan and resistant starch restore zinc bioavailability, suppressed by dietary phytate, through different mechanisms in marginally zinc-deficient rats. *Nutr. Res.*, 24, 121-132.
- Yoon JH, Thompson LU, Jenkins DJA. 1983. The effect of phytic acid on in vitro rate of starch digestibility and blood glucose response. *Am. J. Clin. Nutr.* 38, 835-842.
- Yoon SJ, Choi YJ, Min HK, y col. 1996. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp.4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enz. Microbiol. Technol.* 18, 449–454.
- Yoshida T, Ohkubo M. 1984. Role of gastrointestinal microflora on digestibility in young rats fed diets containing sodium phytate. *Agric. Biol. Chem.* 48, 2571-2576.
- Yoshida T, Shinoda S, Kawaai Y, Iwabushi A, Mutai M. 1985. The effects of gut flora on the utilization of Ca, P and Zn in rats fed a diet containing phytate. *Agric. Biol. Chem.* 49, 2199-2202.
- Younes H, Demigné C, Rémesy C. 1996. Acidic fermentation in the caecum increases absorption of calcium and magnesium in the large intestine of the rat. *Br. J. Nutr.*, 75, 301-314.

- Zadorin A, Isaev A. 1999. Pea cultivation in Russia. *Grain Legumes*. 25, 26-27.
- Zdunczyk Z, Godycka I, Amarowicz R. 1997. Chemical composition and content of antinutritional factors in Polish cultivars of peas. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 50, 37-45.
- Zhang D, Carpenter CE, Mahoney A. 1990. A mechanistic hypothesis for meat enhancement of nonheme iron absorption: Stimulation of gastric secretions and iron chelation. *Nutr. Res.*, 10 (8), 929-935.
- Zhou JR, Fordyce EJ, Raboy V y col. 1992. Reduction of phytic acid in soybean products improves zinc bioavailability in rats. *J. Nutr.*, 122, 2466-2473.
- Zhou JR, Erdman JW. 1995. Phytic acid in health and disease. *Critical Review in Food Sci. Nutr.* 35, 459-508.
- Zoharay D, Hopf M. 1988. *Domestication of the plants in the old world*. Clarendon Press, Oxford., pp. 56-69.
- Zyla K, Ledoux DR, Kujawski M, Veum TL. 1996. The efficacy of an enzymic cocktail and a fungal mycelium in dephosphorylating corn-soybean meal-based feeds fed to growing turkeys. *Poult. Sci.* 75, 381-387.