

Universidad de Ciego de Ávila Máximo Gómez Báez  
Centro de Bioplantas

## **MAESTRÍA EN AGROBIOTECNOLOGÍA**

**Potencialidades de las semillas de *Canavalia ensiformis* (L) para  
su uso en la obtención de un extracto crudo rico en proteínas**

Autor: Pavel Rodríguez Quiñones, Ing.

Universidad de Ciego de Ávila Máximo Gómez Báez

Centro de Bioplantas

## **MAESTRÍA EN AGROBIOTECNOLOGÍA**

**Potencialidades de las semillas de *Canavalia ensiformis* (L) para su uso en la obtención de un extracto crudo rico en proteínas**

Autor: Pavel Rodríguez Quiñones, Ing.

Tutores: Lic. Aurora Terylene Pérez Martínez, Dr. C.

Ing. Dayamí Fontes Marrero, Dr. C.

2024

## AGRADECIMIENTO

*Agradezco a mis padres por el tiempo y la ayuda que me brindaron para lograr esta meta.*

*Agradezco a mis tutores que me ayudaron a reafirmar y profundizar mis conocimientos.*

*Agradezco a los profesores, técnicos y trabajadores de Bioplantas por su apoyo durante esta investigación.*

*A todas esas personas que de una forma u otra hicieron posible lograr esta meta llegue mi más sincero agradecimiento.*

## DEDICATORIA

*Quiero dedicar esta investigación a mis padres que siempre me han apoyado incondicionalmente en este largo camino y me han alentado a seguir adelante aún en momentos difíciles.*

## RESUMEN

La *Canavalia ensiformis* (L) es una de las leguminosas tropicales más atractivas dado sus altos rendimientos agrícolas y elevados contenidos de proteínas para ser utilizada en procesos biotecnológicos. El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar un procedimiento para la extracción de las proteínas presentes en la harina de semillas de *C. ensiformis*. Para lo cual se determinó *el efecto de los bioproductos comerciales ME-50 e IH-Plus sobre los parámetros productivos y morfológicos de las semillas de C. ensiformis con el fin de obtener una fuente estable de proteínas. Además, se definen las propiedades químicas, físicas y tecnofuncionales de la harina obtenidas a partir de la imbibición de las semillas en agua corriente durante 72 horas, la eliminación de la corteza seminal y posterior secado de los cotiledones en una estufa a 60 °C.* Los resultados fueron comparados con las semillas sin tratamiento previo. Durante el procedimiento para la extracción de proteínas se realizó una evaluación bifactorial la cual contó con 9 tratamientos utilizando agua destilada como solvente. La evaluación realizada arrojó que el proceso de imbibición mejora las propiedades tecnofuncionales, la cantidad de proteínas totales y disminuye el contenido de fenoles presentes en la harina. El tratamiento en el cual se obtuvo la mejor extracción de proteínas fue en la relación 1:15 por un tiempo de 90 min, lográndose extraer 72.7 % de las proteínas totales presentes en la harina. Por lo que el procedimiento evaluado es viable para utilizar esta harina en procesos biotecnológicos.

## SUMMARY

*Canavalia ensiformis* (L) is one of the most popular tropical legumes given its high agricultural yields and high protein content to be used in biotechnological processes. The objective of this work was to develop a procedure for the extraction of proteins present in *C. ensiformis* seed flour. For which the effect of the commercial bioproducts ME-50 and IH-Plus on the productive and morphological parameters of *C. ensiformis* seeds was determined in order to obtain a stable source of proteins. In addition, the chemical, physical and techno-functional properties of the flour obtained from the imbibition of the seeds in running water for 72 hours, the removal of the seminal cortex and subsequent drying of the cotyledons in an oven at 60 °C are defined. The results were compared with seeds without prior treatment. During the procedure for protein extraction, a two-factor evaluation was carried out which included 9 treatments using distilled water as a solvent. The evaluation carried out showed that the imbibition process improves the techno functional properties, the number of total proteins and reduces the content of phenols present in the flour. The treatment in which the best protein extraction was obtained was in the ratio 1:15 for a time of 90 min, achieving the extraction of 72.7% of the total proteins present in the flour. Therefore, the evaluated procedure is viable to use this flour in biotechnological processes.

## Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Características botánicas y fisiológicas principales de la <i>C. ensiformis</i> .....	5
2.1.1 Uso de los Microorganismos eficientes (ME) en cultivos de leguminosa.....	7
2.2 Composición fitoquímica de las semillas de <i>C. ensiformis</i> .....	9
2.2.1 Métodos para disminuir la fitotoxicidad de las leguminosas.....	11
2.3 Clasificación de las proteínas de las semillas de la <i>C. ensiformis</i> .....	14
2.3.1 Propiedades funcionales de las proteínas.....	16
2.4 Métodos de extracción y cuantificación de proteínas.....	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1 Determinación del potencial agroproductivo de semillas de <i>C. ensiformis</i> con el uso de bioproductos comerciales IH-Plus y ME-50.....	23
3.2 Definición del efecto de la imbibición de las semillas de <i>C. ensiformis</i> sobre sus propiedades químicas y tecnofuncionales.....	26
3.2.1 Caracterización química de las harinas de <i>C. ensiformis</i> .....	27
3.2.2. Determinación de las propiedades tecnofuncionales de las harinas de <i>C. ensiformis</i> .....	28
3.2.3 Caracterización física (granulometría) de la harina de semillas sin testa de <i>C. ensiformis</i> .....	29
3.3 Definición del procedimiento para obtener un extracto crudo rico en proteínas a partir de harina de semillas de <i>C. ensiformis</i> .....	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1 Determinación del potencial agroproductivos de semillas de <i>C. ensiformis</i> con el uso de bioproductos comerciales IH-Plus y ME-50.....	32
4.2 Definición del efecto de la imbibición de las semillas de <i>C. ensiformis</i> sobre sus propiedades químicas y tecnofuncionales.....	41
4.2.1 Caracterización química de las harinas de <i>C. ensiformis</i> .....	45

4.2.2. Determinación de las propiedades tecnofuncionales de las harinas de C. ensiformis. ....	49
4.2.3 Caracterización física (granulometría) de la harina de semillas sin testa de C. ensiformis. ....	52
4.3 Definición del procedimiento para obtener un extracto crudo rico en proteínas a partir de harina de semillas de C. ensiformis. ....	54
5. CONCLUSIONES .....	59
6. RECOMENDACIONES.....	60
7. BIBLIOGRAFÍA.....	61



## 1. INTRODUCCIÓN.

La agricultura se enfrenta al desafío de la producción sostenible de alimentos seguros para abastecer a la población. La Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura (FAO) estima un crecimiento de la población mundial del 13 % en el año 2030 y del 30 % en el 2050, por lo que será necesario un incremento del 70 % en la producción agrícola para satisfacer la demanda internacional de alimentos y garantizar la seguridad alimentaria (FAOSTAT, 2019)

El uso irracional de agroquímicos para aumentar los rendimientos de las plantas, constituye una práctica no amigable con el ambiente (Lambert *et al.*, 2109). Sin embargo, se conoce que mediante métodos biotecnológicos se desarrollan alternativas innovadoras para la nutrición de las plantas. En este sentido, se destacan los productos microbianos y orgánicos, que tienen como fin reducir riesgos de contaminación del agroecosistema e incrementar los rendimientos de las plantas (Kuotsu *et al.*, 2014). Entre las alternativas agroecológicas que hoy se proponen en Cuba y el mundo, se encuentra la aplicación de bioestimulantes (Sauvu-Jonasse *et al.*, 2020).

Los biofertilizantes a base de aminoácidos constituyen una fuente importante de elementos indispensables para el desarrollo de las plantas, y facilitan la asimilación de estos en los tejidos vegetales. La aplicación cada vez más frecuente de bioestimulantes en el sector agrícola acrecienta la inocuidad y la calidad nutricional de los alimentos (Ovalle-Torres *et al.*, 2019). El uso de materias primas derivadas principalmente de plantas es una alternativa para su utilización como materiales multifuncionales (Gasca-Tuz *et al.*, 2017).

La importancia de utilizar una fuente estable de proteínas de origen vegetal para los procesos biotecnológicos radica en que las proteínas vegetales son una materia prima

renovable, sostenible y versátil. Las leguminosas son una fuente importante de proteínas, a partir de las cuales se pueden obtener productos con valor agregado tales como hidrolizados proteicos o péptidos con diferentes actividades biológicas (Kina-Ysa & Flores-Fernández, 2020).

Dentro de las leguminosas tropicales la *Canavalia ensiformis* (L.) es uno de los cultivos promisorios dada su capacidad de adaptación a diversas condiciones edafoclimáticas, la alta germinación, la facilidad de manipulación de su semilla, la posibilidad de siembra y establecimiento con un mínimo de preparación de suelo. El poco ataque y los escasos daños por plagas y enfermedades, la poca exigencia en agua y su alto potencial de producción de granos (Caseres *et al.*, 1995). La utilización de la *C. ensiformis* como recurso alimenticio está limitada por su baja digestibilidad de sus proteínas, además de la presencia de factores antinutricionales (FAN) tales como la canavalina A, la canavanina y los taninos. (Bressani *et al.*, 1987). Las sustancias tóxicas presentes en *C. ensiformis* protegen a la planta contra el ataque bacterias, virus, insectos y herbívoros según Rosenthal (1991) Por lo cual esta leguminosa actualmente no cuenta con un uso extensivo lo que posibilita su uso en procesos biotecnológicos sin que ello implique una competencia con la alimentación humana y animal.

Sin embargo, existe evidencia del efecto positivo algunos tratamientos tecnológicos como lo es el remojo para eliminar o disminuir estas sustancias antinutricionales. Según Hernández Montiel, (2017) en términos generales, los efectos negativos de los FAN en las semillas de canavalia pueden ser eliminados, reducidos y/o inhibidos, si las semillas reciben algún tratamiento físico, químico o biológico antes de ser consumidas (Elías *et al.* 2009, Vadivel & Biesalski 2012, Owen *et al.* 2015). Con frecuencia, la aplicación de sólo un tratamiento a las semillas no logra eliminar los FAN de forma efectiva, por lo que se requiere

utilizar dos o más tratamientos antes de su incorporación como parte de los alimentos (Akande & Fabiyi 2010, Doss *et al.* 2011, Alagbaoso *et al.* 2016).

La biotecnología ofrece un potencial para aumentar la producción de bienes para la satisfacción de variadas necesidades humanas. En el área de producción y extracción de proteínas existen novedosos y variados procesos que se desarrollaron para la fabricación a granel de aislados proteicos y su sucesiva aplicación para el desarrollo de nuevos productos y/o dar un valor agregado a los productos ya existentes (Flores *et al.*, 2016). Las proteínas son biomoléculas estructurales y esenciales para las células en todos los seres vivos (Olson *et al.*, 2016). Van het Hof, (2000) explicó que los métodos de homogenización mecánica, si bien son los más sencillos, son también los más eficientes en extracción de proteína pues las paredes celulares requieren este tipo de métodos violentos para romperse y liberar su contenido.

Para la elección de una fuente de proteína adecuada se debe considerar el uso posterior del hidrolizado, así como el valor agregado del producto final con respecto al inicial (Benítez *et al.*, 2008). Por lo que a la hora de trazar las tareas investigativas para la obtención de un nuevo bioproducto que se formule sobre la base de extractos acuosos de proteína se debe tener en cuenta la disponibilidad del material proteico a procesar, así como la factibilidad de la fuente de dicho material. Debido al gran avance que se produjo en los últimos años en el ámbito de la investigación científica, se dispone de más información y cada vez más compleja sobre métodos de análisis y extracción de las proteínas (Taimal, 2021). No obstante, en la literatura consultada no se encontró un método de extracción de proteínas presentes en las semillas de *C. ensiformis*. Por lo que se define como:

**Problema científico:** ¿Como establecer un procedimiento para la obtención de un extracto crudo rico en proteínas a partir de semillas de *C. ensiformis*?

Para solucionar el problema existente, se traza la siguiente hipótesis científica:

**Hipótesis:** Si se establece un procedimiento para extraer las proteínas presentes en las semillas de *C. ensiformis*, entonces se podrá obtener un extracto crudo para su uso en procesos biotecnológicos.

Sobre la base de la hipótesis anterior, se estableció una secuencia experimental, que tuvo como **objetivo general**:

Establecer un procedimiento para la obtención de un extracto crudo rico proteínas a partir de semillas de *C. ensiformis* para su uso en procesos biotecnológicos.

Objetivos Específicos:

- Determinar el potencial agroproductivo de semillas de *C. ensiformis* con el uso de bioproductos comerciales IH-Plus y ME-50.
- Evaluar el efecto de la imbibición de las semillas de *C. ensiformis* sobre sus propiedades químicas y tecnofuncionales.
- Definir un procedimiento para obtener un extracto crudo rico en proteínas a partir de harina de semillas de *C. ensiformis*.

**Valor práctico:** Se caracterizan los indicadores tecnofuncionales para la obtención de la harina de semillas de *C. ensiformis* para su uso en procesos biotecnológicos. Se definen parámetros operacionales para la extracción de proteínas de la harina de semillas de *C. ensiformis*.

**Novedad Científica:** Se informa por primera vez el uso de microorganismos eficientes en la agrotecnia de *C. ensiformis*. Se define un procedimiento para la obtención de un extracto acuso de proteínas a partir de harina de semillas de *C. ensiformis*.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.**

Dentro de la familia de las leguminosas tropicales, el género *Canavalia* posee 12 especies con potencial agropecuario, entre las que se encuentra la *Canavalia ensiformis* (L), esta leguminosa posee una alta capacidad de adaptación a un amplio rango de condiciones edáficas (Cáseres *et al.*,1995). Se conoce por los nombres vulgares de frijol machete, haba de burro, nescafé, poroto gigante, Jack bean, Pois sabre y otros. En Cuba, el nombre común de nescafé está dado por su utilización casera como infusión en sustitución y/o mezclado con café (Roig, 1965). La *Canavalia ensiformis* (L.) es una leguminosa cuyo origen se encuentra en discusión, según (Machicado Paco, 2018) hay dos posturas en autores que indican que es originaria de india occidental y por otro dice que es originaria de América Central y del Sur de México. Esta planta es usada principalmente como abono verde en alimentación animal, insecticida y como parte fundamental en sistemas agroforestales entre otros. El desarrollo de productos elaborados a partir de *C. ensiformis* se espera que sustituya, reduzca o incluso pueda reemplazar la proteína de soya, por lo que la necesidad y la dependencia en la soya se puede controlar (García *et al.*, 2019).

### **2.1 Características botánicas y fisiológicas principales de la *C. ensiformis*.**

Pertenece a la subfamilia de las Papilionoideae y originaria del nuevo mundo, antiguamente se cultivaba en América Tropical y formaba parte de la dieta de las personas, pero posteriormente se redujo su cultivo, a pesar de las potencialidades que ofrece su utilización en los países tropicales (Cáseres *et al.*,1995). Es una planta anual que se desarrolla en la regiones tropicales y subtropicales, debido a que puede crecer en temperaturas de 14 a 27 °C, con precipitación de 711 a 4 191 mm. Se adapta a un amplio rango de condiciones edáficas, prosperando en suelos ácidos con pH de 4,0 a 6,5; aunque su desarrollo es mayor en pH de 6,5 (Sheahan, 2012)

Es una planta anual, pero se vuelve perenne en zonas húmedas y puede sobrevivir de 2 a 4 años. Posee la capacidad de rebrote después del corte, lo que permite producir más de una cosecha. El desarrollo inicial es rápido, el crecimiento productivo es alto y su sistema radicular presenta alta capacidad de reciclaje de nutrientes. Es una planta erecta, con una altura de 0.6 a 2 m. Sus hojas constan de 3 folíolos membranáceos en forma de huevo, son ovadas de 6 a 12 cm de longitud y de color verde oscuro. Presenta inflorescencia de hasta 30 cm de largo con 10-20 flores de color rosa en pedúnculos. El fruto es lineal, ligeramente curvo de hasta 30 cm e indehisciente (Acosta & Hernández, 2012)

Es considerada la mejor leguminosa para enfrentar frecuentes sequías por ser sumamente resistente y se adapta a condiciones de suelos deteriorados. Los cultivos de *Canavalia ensiformis* (L.) no reportan problemas de plagas y pocas veces es atacado por insectos que no llegan a afectar su normal desarrollo, por el contrario, atrae abejas polinizadoras especialmente *Apis mellífera* en su periodo de floración (Ojeda Quintana *et al.*, 2019). Según Machicado (2018), no es muy exigente en suelo, manejando un amplio rango de textura desde suelos arcillosos y húmedos, pasando por suelos francos y presenta algunas limitaciones en suelos arenosos, crece en suelos superficiales y profundos, aunque la raíz pivotante se desarrolla mejor en suelos profundos, tolera pH entre 4.0 a 6.5, aunque su desarrollo es mayor en pH de 6.5.

Las semillas maduras se cosechan en el período de 180 a 300 días después de la siembra, con producción máxima de 4,6 kg·ha<sup>-1</sup> de semilla, aunque es más frecuente cosechar 1 kg·ha<sup>-1</sup> (Sheahan, 2012). El gran tamaño de la semilla y su alta germinación (>90%) generan plantas vigorosas, por lo que presenta un rápido y fácil establecimiento (Escobar *et al.*, 1984). La *C. ensiformis* sembrada en condiciones favorables, rinde en Venezuela entre 2,5 y más de 6 kg·ha<sup>-1</sup>, mientras que en Cuba en un suelo ferralítico rojo produjo menos de 1 kg·ha<sup>-1</sup> cuando se sembró en julio y más de 2 kg·ha<sup>-1</sup> cuando se sembró en el

mes de diciembre (Valdivié & Elías, 2006). En el estado de Yucatán, México, se reportan rendimientos de entre 1 y 3,8 kg·ha<sup>-1</sup> de semilla (Hernández *et al.*, 2016, Chel *et al.*, 2016).

Las semillas son elipsoidales, de 12-20 y de unos 2 cm cada una, de color blanco y suave con una cicatriz de semillas de color marrón que es alrededor de un tercio de la longitud de la semilla. Sus raíces tienen nódulos que fijan nitrógeno. Las semillas poseen una alta proporción de aminoácidos esenciales a excepción de triptófano. (Ramírez, 2015) Por otra parte, se usa como fuente industrial de lectinas y ureasa. La semilla se utiliza como repelente para el control de babosas y las hojas controlan los zompopos matando al hongo alimenticio que ellos cultivan. También se utiliza en la alimentación animal por ser importante fuente de gran valor energético y proteico (Acosta & Hernández, 2012). El gran tamaño de la semilla (1 a 1,5 g) y su alta germinación (>90%) generan plantas vigorosas. por lo que presenta un rápido y fácil establecimiento (Escobar *et al.*, 1984).

### **2.1.1 Uso de los Microorganismos eficientes (ME) en cultivos de leguminosa.**

Varios autores han propuesto la implementación de tecnologías limpias a través del uso de microorganismos con efectos benéficos según lo planteado por Tanya Morocho & Leiva-Mora, (2019) La aplicación de los microorganismos eficientes (ME) en las plantas inducen mecanismos de eliminación de insectos y enfermedades en las plantas, puesto que pueden inducir la resistencia sistémica de los cultivos a enfermedades, consume los exudados de raíces, hojas, flores y frutos, evitando la propagación de organismos patógenos y desarrollo de enfermedades, incrementa el crecimiento, calidad y productividad de los cultivos, y promueven la oración, fructificación y maduración por sus efectos hormonales en zonas meristemáticas. Incrementa la capacidad de fotosíntesis a través de un mayor desarrollo foliar (Haney *et al.*, 2015).

Con la aplicación de microorganismos benéficos el suelo retiene más agua, lo que implica una mejora de los cultivos que incrementan su resistencia al estrés hídrico en épocas de sequía. (Tanya Morocho & Leiva-Mora, 2019). El uso de cepas nativas de *Rhizobium* como biofertilizantes contribuye al mantenimiento de la biodiversidad del suelo, mediante la reducción de los impactos negativos de los fertilizantes minerales (Nkot *et al.*, 2015; Ouma *et al.*, 2016). Dicha mejora según (Toalombo, 2012) referenciado por Tanya Morocho y Leiva-Mora (2019) viene dada tanto por el incremento de materia orgánica en el suelo, reduciendo la porosidad, como consecuencia de la actividad microbiana, como por el equilibrio iónico, favoreciendo así la interacción de las cargas superficiales de la estructura física del suelo con las cargas iónicas del agua. Lo cual tienen un efecto más rápido comparado con el fertilizante orgánico (Abdel-Fattah *et al.*, 2016)

Estudios realizados por han Panke-Buisse *et al.*, (2017) han demostrado que los microorganismos pueden modificar múltiples rasgos de las plantas incluyendo el desarrollo del follaje y la floración. Por otro lado, Bisen *et al.*, (2015). Manifestó que a partir de la aplicación de los Microorganismos Eficientes se logra reducir las demandas de productos químicos, y se incrementó el número de flores, el número de frutos y la calidad de los mismos. Como alternativa para mejorar la producción del grano, según Calero Hurtado, (2019) se recomienda el empleo de los Microorganismos Eficientes, los cuales producen sustancias benéficas para la vida animal y vegetal. Pedraza *et al.* (2010) describieron que el principio fundamental de estos productos consiste en el incremento de un grupo de microorganismos benéficos en el suelo, con el objetivo de mejorar las condiciones de este, eliminar la putrefacción (incluyendo enfermedades) y optimizar el uso de la materia orgánica por los cultivos.

En la actualidad existe un enfoque popular para el tratamiento de semillas que incluye la inoculación de estas con microorganismos benéficos (aspecto biológico) y la hidratación de



semillas (aspecto fisiológico) para protegerlas de varias enfermedades transmitidas por semillas y por el suelo. (Tanya Morocho & Leiva-Mora, 2019). La aplicación de microorganismos benéficos a las semillas es un mecanismo eficiente para la colocación de inóculos microbianos en el suelo, donde estarán bien posicionados para germinar y colonizar las raíces de las plántulas, protegiéndolas contra plagas y enfermedades (O'Callaghan, 2016). Este tratamiento es capaz de activar cambios en las características de las plantas y facilitar la germinación y el crecimiento uniformes de las semillas asociados con la inoculación de microorganismos.

## 2.2 Composición fitoquímica de las semillas de *C. esiformis*

Los contenidos de proteína bruta en las hojas (17 a 24%), las legumbres (17,8 a 21,9%) y los granos (32,5 a 36,3%), indican que la *Canavalia ensiformes* (L.) posee un alto valor nutritivo (Mora & Parra 1982). Aunque Escobar *et al.*, (1984) señala que el grano posee un bajo contenido de lípidos (4%) y que al igual que muchas otras leguminosas presenta deficiencia en aminoácidos azufrados, mientras que las variedades pueden presentar variaciones considerables en el valor nutritivo (León *et al.*, 1989).

Tabla 1. Composición química de las semillas de *C. ensiformis*.

Componente	U/M	Valor
Materia seca	%	69.4-91.6
Proteína cruda	%	18.8-33.4
Almidón	%	27.7-56.7
Energía metabolizable	Mcal kg MS <sup>-1</sup>	2.1-3.35
Digestibilidad de la materia orgánica	%	60.9

Fuente: (Hernández-Montiel *et al.*, 2017)

Las leguminosas contienen altas concentraciones de aminoácidos no proteicos, los cuales son tóxicos para los animales debido a que se incorporan en las cadenas de péptidos en lugar de los aminoácidos homólogos. (Ruiz Bedolla et al., 2019). Hernández-Montiel *et al.*, (2017) expresó que el contenido de proteína cruda y energía metabolizable de las semillas de *C. ensiformis* (L.) las hace atractiva como ingrediente proteínico; pero este tipo de semillas poseen diversos factores antinutricionales que limitan su incorporación de forma extensiva en los programas de alimentación de ovinos. Los factores antinutricionales (FAN) y sustancias tóxicas presentes en *C. ensiformis* (L.) protegen a la planta contra el ataque de bacterias, virus, insectos y herbívoros (Rosenthal, 1991); pero, este tipo de sustancias son tóxicas para los animales (Ologhobo, *et al.*, 2003).

Tabla 2 Principales componentes antinutricionales en la semilla de *C. ensiformis*.

<b>Componente antinutricionales</b>	<b>U/M</b>	<b>Cantidad</b>
Fenoles libres totales	(mg 100 g <sup>-1</sup> )	3 830 - 4 600
Taninos	(mg 100 g <sup>-1</sup> )	82.5 - 1 600
Saponinas	(mg 100 g <sup>-1</sup> )	571
Concanavalina A	(mg 100 g <sup>-1</sup> )	2400 - 3500
Canavanina (mg 100 g <sup>-1</sup> )	(mg 100 g <sup>-1</sup> )	4290 - 4420
L-DOPA (mg 100 g <sup>-1</sup> )	(mg 100 g <sup>-1</sup> )	1700 - 2400
Cianuro de hidrógeno (mg 100 g <sup>-1</sup> )	(mg 100 g <sup>-1</sup> )	2200 - 2780
Fitina (mg 100 g <sup>-1</sup> )	(mg 100 g <sup>-1</sup> )	18.5
Fitina-Fósforo (mg 100 g <sup>-1</sup> )	(mg 100 g <sup>-1</sup> )	5.22
Actividad inhibidora de tripsina (U mg <sup>-1</sup> )	(U mg <sup>-1</sup> )	0.38 - 27.4
Actividad inhibidora de quimiotripsina (U mg <sup>-1</sup> )	(U mg <sup>-1</sup> )	21.1
Actividad inhibidora de alfa-amilasa (U mg <sup>-1</sup> )	(U mg <sup>-1</sup> )	7.1
Título hemaglutinante (U mg <sup>-1</sup> )	(U mg <sup>-1</sup> )	16

Fuente: (Hernández-Montiel, et al., 2017)

En términos generales, los efectos negativos de los FAN en las semillas de canavalia pueden ser eliminados, reducidos y/o inhibidos, si las semillas reciben algún tratamiento físico, químico o biológico antes de ser consumidas (Owen *et al.*, 2015). En una descripción detallada de los cuatro tóxicos identificados en esta planta. (Escobar *et al.*, 1984) señalan que la concanavalina A posee alta solubilidad en soluciones salinas débiles y que es una proteína termolábil (calor húmedo); la canavanina y la canalina son altamente solubles en medio acuoso y estables a la acción del calor; mientras que la ureasa no afecta a los animales. (Cáseres *et al.*, 1995)

Entre los aminoácidos vegetales está la L-canavanina, que es un aminoácido no proteico y se encuentra en forma libre en las semillas de *C. ensiformis* (Nort *et al.*, 2015) La L-canavanina es un aminoácido no proteínico que se encuentra en las semillas, hojas, tallos y raíces de la *C. ensiformis* y puede representar entre el 4 y 5 % del peso seco de las semillas. (Zamora, 2003). La L-canavanina es un análogo de la arginina; su función natural en las leguminosas es la defensa química contra insectos y otros herbívoros. (Yang *et al.*, 2015).

Existen varios procesos tecnológicos que se pueden aplicar a las semillas de *C.ensiformis* L. para eliminar, reducir o inactivar los FAN y para alterar la estructura del almidón con la finalidad de mejorar el acceso de los gránulos al ataque enzimático y la utilización de los nutrientes. (Emenike *et al.*, 2016)

### **2.2.1 Métodos para disminuir la fitotoxicidad de las leguminosas**

A pesar de que las leguminosas presenten un doble interés, nutricional y agrícola, debido a su elevado contenido de nutrientes y compuestos beneficiosos, tales como: carbohidratos, minerales, fibra alimentaria, proteína, vitaminas, ácidos grasos poliinsaturados y

compuestos antioxidante, también hay que mencionar la presencia ciertos compuestos antinutritivos. Entre ellos destacan compuestos tales como, inhibidores de enzimas (tripsina, quimotripsina, -amilasa), fitatos, taninos, lectinas, -galactósidos, etc. que disminuyen su valor nutritivo. (Aguilera, 2009).

Existen diversos procesos para reducir, eliminar y/o inhibir a los FAN de la canavalia (Valiño *et al.*, 2015). Existen varios procesos tecnológicos que se pueden aplicar a las semillas de *Canavalia ensiformis* L. para eliminar, reducir o inactivar los FAN y para alterar la estructura del almidón con la finalidad de mejorar el acceso de los gránulos al ataque enzimático y la utilización de los nutrientes. (Emenike *et al.*, 2016). En términos generales, los principios utilizados para el procesamiento de las semillas de canavalia son el fraccionamiento de la semilla, temperaturas elevadas con o sin humedad, alta presión, remojo en agua, tratamientos químicos, fermentación y germinación (Akande & Fabiyi, 2010).

La absorción de agua por la semilla desencadena una secuencia de cambios metabólicos que incluye la respiración, síntesis proteica y movilización de reservas. A su vez, la división y el alargamiento celular en el embrión provocan la rotura de las cubiertas seminales, que generalmente se produce por la emergencia de la radícula. (Chong *et al.*, 2002). La imbibición es el proceso de absorción de agua por la semilla. Se da por las diferencias de potencial hídrico entre la semilla y la solución de imbibición. Este proceso consta de tres fases (Suárez & Melgarejo, 2014). Ver (Figura 1).

- i) incremento rápido en la absorción de agua.
- ii) fase de estabilización y movilización de nutrientes.
- iii) absorción de agua que generalmente coincide con el proceso de germinación.

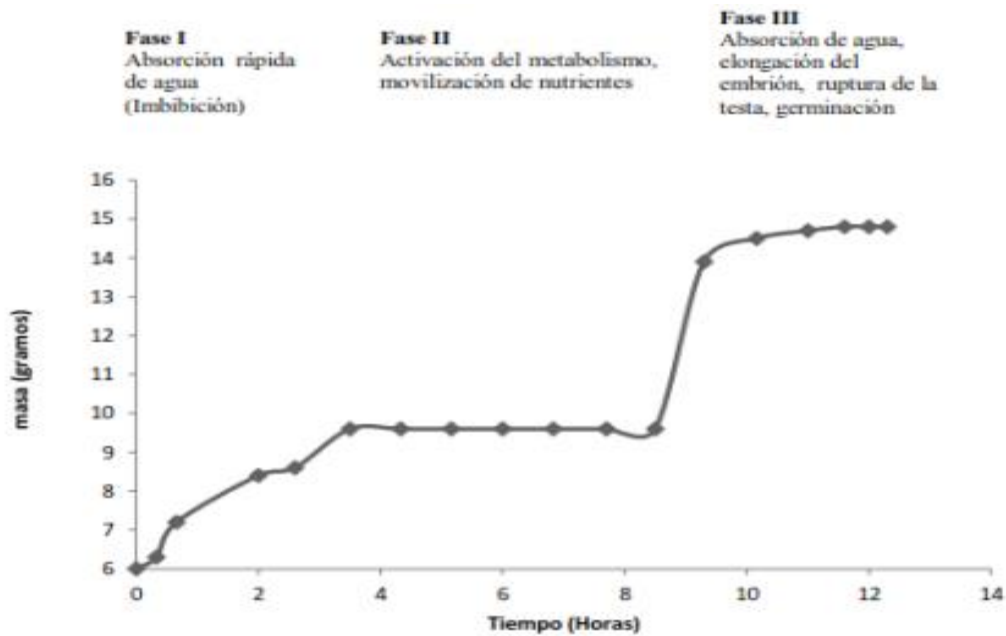


Figura 1. Fases del proceso de germinación. Fuente: (Suárez & Melgarejo, 2014)

La absorción de agua es el primer paso para la germinación, sin el cual el proceso no puede darse. Durante esta fase se produce una intensa absorción de agua por parte de los distintos tejidos que forman la semilla. Dicho incremento va acompañado de un aumento proporcional en la actividad respiratoria. (Doria, 2010)

La hidratación de la semilla, con el consiguiente aumento en humedad y disminución porcentual del contenido en nutrientes debido a la difusión de los componentes solubles hacia la solución (principalmente carbohidratos y vitaminas solubles). Los componentes de la semilla que ejercen mayor influencia en la absorción de agua son las proteínas y algunos polisacáridos como almidón, hemicelulosas y pectinas. Normalmente se utiliza el remojo como un paso previo a otro tratamiento (Aguilera, 2009). A pesar de que científicamente se reconoce las bondades del remojo de los granos, esta práctica no es utilizada en forma masiva, (Serna-Cock *et al.*, 2019)

(Aguilar & Vélez, 2013) reportaron una disminución de lectinas cuando germinaron frijol durante 5 días hasta alcanzar una concentración de 2.5 mg / 100 g, mejorando el valor biológico y nutricional del frijol debido a que las lectinas son glucoproteínas que interactúan con carbohidratos formando aglutinaciones y por lo tanto impiden su absorción al cruzar el tracto gastrointestinal. La germinación es la reanudación del ciclo de vida, donde la semilla bajo condiciones óptimas de humedad, tiempo y temperatura se convierte en plántula. (Muñoz-Llandes *et al.*, 2021). La germinación resulta ser un método de bioproceso capaz de mejorar la calidad nutricional y funcional de las harinas obtenidas a partir de leguminosas en comparación a las resultantes de leguminosas sin germinar, convirtiendo dicho proceso en una alternativa económica y eficaz para generar ingredientes modificados con potencial uso en el desarrollo e innovación de alimentos funcionales con múltiples beneficios a la salud humana. Además, el incremento en las propiedades tecno funcionales podría permitir la optimización de tiempos y costos de producción a gran escala. (Muñoz-Llandes *et al.*, 2021)

### **2.3 Clasificación de las proteínas de las semillas de la *C. ensiformis*.**

Las proteínas son moléculas muy complejas; presentan una estructura lógica y funcional específica para cada una de ellas; tienen como características comunes que sus unidades estructurales son aminoácidos, se encuentran unidos entre sí mediante uniones covalentes conocidos como enlaces peptídicos y, según el tamaño de las cadenas, pueden ser desde una simple unión de dos aminoácidos llamados dipéptido, hasta grandes macromoléculas de proteína, pasando por las de tamaño mediano o polipéptidos. (Alvares *et al.*, 2013). La complejidad y la diversidad son características predominantes de las proteínas, por lo tanto, resulta difícil establecer una clasificación rigurosa; sin embargo, los diversos métodos para clasificarlas se basan en cuatro criterios fundamentales: composición, forma, solubilidad y función biológica (Chel Guerrero *et al.*, 2003).

La complejidad y la diversidad son características predominantes de las proteínas, por lo tanto, resulta difícil establecer una clasificación rigurosa; sin embargo, los diversos métodos para clasificarlas se basan en cuatro criterios fundamentales: composición, forma, solubilidad y función biológica (Chel *et al.*, 2003). La clasificación más utilizada para fines prácticos es de acuerdo a su solubilidad, siendo el método de Osborne (1961), el más conocido el cual reporta cuatro tipos de proteína (Ibañes, 1991)

**Albúminas;** solubles en agua y en soluciones salinas diluidas; precipitan en soluciones de sulfato de amonio a una concentración cercana a la saturación (Chel *et al.*, 2003).

**Globulinas;** generalmente insolubles en agua, pero solubles en soluciones salinas diluidas, ejemplo de éstas es la miosina (Guéguen & Cerletti, 1994)

Los cultivos de plantas a menudo se procesan en extractos de proteínas de alta pureza, que consisten principalmente en globulinas. Las globulinas no pueden formar capas interfaciales rígidas debido a su estado compacto y altamente agregado (Yang & Sagis, 2021).

**Prolaminas;** estas proteínas son solubles en etanol 50-80%. Constituyen un grupo cuyo nombre se originó por el alto contenido de prolina y nitrógeno amídico proveniente de la glutamina, que es el aminoácido presente en altas cantidades y que juntos en algunos casos llegan a ser hasta el 50% del nitrógeno del grano (Segura-Nieto & Jiménez-Flores, 1999).

**Glutelinas;** que se caracterizan por ser solubles en medio ácido o alcalino, como es la oricenina del arroz. Las glutelinas cuyo representante más conocido son las gluteninas aisladas del trigo (Huang & Khan, 1997).

Las fracciones más importantes de las leguminosas son las albúminas y las globulinas. Las albúminas incluyen algunas moléculas que poseen propiedades funcionales y muchas son enzimas que metabolizan las sustancias almacenadas en la semilla, como por ejemplo las glicosidasas y las proteasas, que tienen un papel importante en la degradación proteica durante la germinación (Chel *et al.*, 2003). Otras participan en la defensa de la planta, como son los inhibidores de tripsina y las lectinas (Guéguen & Cerletti, 1994). La distribución de las proteínas de almacenamiento en las leguminosas, de acuerdo con su solubilidad, revela que las globulinas son el grupo principal ya que se les encuentra en la mayoría con un intervalo de 35 a 72% (Chel *et al.*, 2003).

Tabla 3: Composición de proteínas de leguminosas según la clasificación de Osborne (1961) (g de fracción de proteína/100 g de proteína).

Granos de leguminosas	Fracciones de proteínas			
	Albúminas	Globulinas	Prolaminas	Glutelinas
<i>Phaseolus vulgaris</i>	27,6 - 36,6	35 – 39,3	0,1 – 0,2	0,4 – 0, 2
<i>Canavalia ensiformis</i>	14	66	14	0,8
<i>Canavalia gladiata</i>	12	79	6	0,3
<i>Lupinus mutabilis Sweet</i>	11,2	71,8	1	5,5
<i>Pisum. Sativum</i>	21	66	—	12
<i>Glicine max</i>	10	90	0	0

Fuente (Chel *et al.*, 2003).

### **2.3.1 Propiedades funcionales de las proteínas.**

Las propiedades funcionales de las proteínas han sido definidas como cualquier propiedad fisicoquímica de las proteínas, que afecta el comportamiento y características de los alimentos en los cuales se encuentran o son agregadas y que contribuye a la calidad final del producto. Estas características pueden ser sensoriales, nutricias y bioquímicas. La



aplicación práctica que una proteína puede tener depende en gran medida de esa funcionalidad (Chel *et al.*, 2003).

Estas propiedades pueden agruparse en:

- A) Propiedades de hidratación, que dependen principalmente de la interacción proteína- agua y son aquellas como la absorción y retención de agua, solubilidad, dispersabilidad y viscosidad.

Propiedades que dependen de la interacción proteína-proteína y son aquellas como la gelificación, coagulación, elasticidad, cohesividad, dureza y adhesividad (Chel *et al.*, 2003).

- B) Propiedades de superficie que dependen de la interacción de la proteína con dos fases inmiscible: agua/ aceite, agua/ aire que son emulsificación, espumado y capaz de enlazar lípidos.

- C) La composición de proteínas y carbohidratos de los granos influencia las propiedades tecnofuncionales de las respectivas harinas y de los productos elaborados de ellas (Santiago *et al.*, 2018). La capacidad de absorción y retención de agua son propiedades tecnofuncionales propias de las legumbres secas, que permiten determinar los tiempos adecuados de remojo de los granos, y están relacionadas directamente por el contenido proteico y la interacción proteína – agua. (Sánchez *et al.*, 2017).

A pesar de que científicamente se reconoce las bondades de la imbibición en agua de los granos, esta práctica no es utilizada en forma masiva (Serna-Cock *et al.*, 2019). La capacidad de absorción de agua indica la aptitud a embeber agua en su estructura en forma espontánea, cuando se le pone en contacto con agua a través de una superficie que se mantiene húmeda o por inmersión. Mientras que la capacidad de retención de agua es la

aptitud de un material hidratado a retener agua frente a la acción de una fuerza externa de gravedad centrífuga o de compresión y comprende la suma del agua enlazada, agua hidrodinámica y agua físicamente atrapada, siendo ésta la que contribuye en mayor proporción que las otras dos (Chel *et al.*, 2003).

#### **2.4 Métodos de extracción y cuantificación de proteínas.**

Durante el siglo XIX se presenta la primera extracción de proteínas en la cual se realizaron tratamientos para la obtención de albúmina de huevo, con reportes que permitían aislar sustancias similares en plantas. Conforme se realizaban distintas investigaciones se obtuvo como primer producto proteína de origen animal, la misma que es consumida por sus altos índices proteicos Gallegos *et al.* (2018). La industria debe asumir ese reto y buscar el mejor método/proceso optimizado para extraer una proteína de alto valor nutricional (Gamboa & Llanos, 2022)

Las proteínas son uno de los macronutrientes que encontramos en los alimentos junto a los hidratos de carbono y lípidos. Son los elementos básicos del cuerpo, esenciales en todo el metabolismo. Su principal función no es energética sino estructural, es decir, contribuyen a la formación, desarrollo y renovación de todos los órganos y sistemas del organismo y desempeñan también un gran número de funciones en las células de los seres vivos. Las proteínas son macromoléculas que están formadas por carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno fundamentalmente, aunque también pueden contener minerales como azufre, hierro y fósforo (Taimal, 2021).

Las proteínas, a diferencia de otras moléculas biológicas como carbohidratos y lípidos son los únicos macronutrientes que no tienen un compuesto inactivo que sirva como reservorio. Siendo así, las proteínas contráctiles del músculo esquelético, son el método de reserva

más grande y responden de forma anabólica a la alimentación. Las proteínas vegetales son nutrientes que el organismo utiliza para el crecimiento y la reparación de los tejidos, para la síntesis de enzimas y hormonas (Taimal, 2021).

La extracción de proteínas de los tejidos vegetales es generalmente difícil debido a la presencia de varias moléculas (pared celular, polisacáridos y lípidos) y compuestos que interfieren. Por esta razón, la etapa de separación de proteínas es un gran desafío para obtener buenos resultados en los estudios proteómicos de plantas, (da Silva Viana *et al.*, 2020). Las proteínas presentes en los vegetales son de tipo intracelular, por lo que es necesario la aplicación de métodos para la ruptura de las paredes celulares y así recuperar la mayor cantidad de compuestos de interés. Estos métodos pueden ser mecánicos y no mecánicos (Taimal, 2021).

Existen diferentes formas de extraer la proteína en muestras vegetales, se mencionan algunas de ellas:

- Métodos mecánicos: Son métodos basados en el uso de la fricción y de fuerzas de corte cuyo objetivo es deformar la célula hasta su ruptura. Dentro de los principales métodos se encuentran el uso de molinos y equipos de ultrasonido.
- Métodos no mecánicos: Se basan en tratamientos de separación de componentes e hidrolisis de las paredes celulares mediante el uso de métodos químicos o enzimáticos, por lo que facilita la extracción de las proteínas.

Según Yaned *et al.* (2017) en su investigación realizada sobre la Optimización del protocolo para la extracción y la cuantificación de proteínas totales en semillas de maíz, utiliza el método de agitación orbital el cual ocupa tres solventes diferentes como: el TCA, Tris-HCl

y Tris-Base con la ayuda de los movimientos de las bandejas y el calor se pueden remover los líquidos para separar la parte líquida de la sólida de la proteína.

Mientras que resultados de las investigaciones desarrolladas por Lamsal *et al.* (2020) en su investigación sobre sonicación de alta potencia en proteínas de soja, utiliza tratamientos de ultrasonidos donde las ondas sonoras ayudan a disminuir la oxidación de la proteína debido a que pueden aumentar la cantidad de flavonoides con actividad de extinción de radicales y recuperar las isoflavonas durante la extracción. El efecto del pretratamiento de ultrasonido de alta potencia sobre la extracción de las proteínas de garbanzo, frijol y soja, establece que el método de ultrasonido es un proceso que ayuda a acelerar la solubilización de la proteína por lo cual se obtienen rendimientos altos de la misma. Este proceso es económicamente rentable en el ámbito alimentario (Lamsal *et al.*, 2019)

También Chen *et al.* (2019) en su estudio sobre la extracción de proteína de maní maneja el método enzimático, este método se basa en la capacidad inherente de las enzimas para catalizar reacciones mediante la degradación o alteración de las paredes celulares permitiendo así una mejor liberación y extracción de proteínas.

Actualmente para la extracción de proteína se utiliza mucho la solubilización/precipitación isoelectrica, debido a que es una de las más rápidas, efectivas y cumple con la mayoría de características que puedes necesitar de la proteína, pero la tecnología avanza mucho, ahora el ultrasonido también puede ayudar y formar parte de estas nuevas técnicas avanzadas con algunos solventes específicos. La electroforesis también es una buena técnica para obtener proteínas y separarlas por tamaños (Gamboa & Llanos, 2022).

Las proteínas de las legumbres, como las de los frijoles secos, se extraen mediante métodos que se pueden dividir en procesos de fraccionamiento acuoso o seco. El

fraccionamiento acuoso garantiza un mayor rendimiento proteico, es posible obtener rendimientos de hasta 93% en la extracción de proteína de frijol seco por el método de fraccionamiento acuoso, resultandos concentrados con un contenido de proteína superior al 70% (Ferreira *et al.*, 2022).

Los laboratorios analíticos han desarrollado diversas técnicas para la cuantificación de proteínas, por ejemplo, del método normalizado Kjeldahl que se aplica en diferentes matrices como cerveza, leche, pan, entre otras. (AOAC, 2016) y métodos espectrofotométricos como Lowry, (1951) Bradford (1976) y BCA (Smith, 1985). Por otro lado, el método de Hartree-Lowry (modificación subsecuente del método de Lowry) es un método espectrofotométrico utilizado para la cuantificación de proteínas debido que presenta ventajas tales como su sensibilidad, límite de detección del orden de 15  $\mu\text{g}$  de proteína, precisión y fácil implementación (Hartree, 1972).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación fue desarrollada en la Universidad de Ciego de Ávila de mayo del 2021 a junio del 2023. Como material vegetal se utilizaron semillas de *C. ensiformis*, las cuales se cultivaron en la Estación Experimental Juan Tomas Roig perteneciente al Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila Máximo Gómez Báez. Las mismas se colectaron en diciembre del 2021. La investigación se desarrolló en tres momentos, en un primer momento se determinó el efecto de los Bioproductos comerciales IH-plus y ME-50 sobre los caracteres morfológicos y agroproductivos de las semillas de *C. ensiformis* con el fin de obtener una fuente estable de proteínas para su posterior uso en procesos biotecnológicos. La evaluación de los parámetros antes descritos se realizó en enero del 2022 en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad de Ciego de Ávila Máximo Gómez Báez. Lo cual permitió a partir de los resultados obtenidos definir el manejo agrotécnico a seguir en el cultivo de la *C. ensiformis*.

La segunda etapa de la investigación se desarrolló a partir de las semillas obtenidas del mejor tratamiento devenido de la evaluación del efecto de los bioproductos utilizados en el estudio agrotécnico. Para lo cual se desarrolló un procedimiento tecnológico para obtener harina de semillas de *C. ensiformis* la cual fue validada a partir de estudios de sus propiedades químicas, tecnofuncionales y físicas. El procedimiento tecnológico de obtención de la harina se desarrolló en el laboratorio de microbiología de la Universidad de Ciego de Ávila mientras que los análisis químicos y la determinación de las propiedades tecnofuncionales se realizaron por triplicados en el Departamento de Productos Naturales del Centro de Bioplantas. Mientras que en la tercera etapa de la investigación se evaluó un procedimiento para la extracción de proteínas obteniéndose un extracto crudo acuoso. Para lo cual se partió de los resultados obtenidos con anterioridad utilizando la harina que

presento indicadores químicos y tecnofuncionales acorde a las necesidades del proceso evaluado.

Para el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el programa estadístico SPSS (Versión 11.5 para Windows, SPSS Inc.) A los datos procesados se le determinó la distribución normal por Kolmogorov Snirnov, homogeneidad de varianza por el método Levene, la significación de las medias se realizó por la Prueba T-Students, ANOVA simple y ANOVA bifactorial, con prueba de Tukey  $P \leq 0.05$ . Los datos referidos en porcentaje fueron transformados por la ecuación matemática  $y' = 2 \arccos \sqrt{y/100}$ , solo para análisis estadísticos. La recta que define la ecuación para la determinación de la concentración de fenoles totales y proteínas solubles se determinó utilizando el programa Microsoft Office Excel 2019. En cada tabla y figura de la sección Resultados y discusión se describe el tratamiento estadístico específico ejecutado.

### **3.1 Determinación del potencial agroproductivo de semillas de *C. ensiformis* con el uso de bioproductos comerciales IH-Plus y ME-50.**

El área experimental para el estudio agronómico está enclavada en la Estación Experimental Juan Tomas Roig, la cual se encuentra ubicada geográficamente en los 21,889637<sup>0</sup> N, -78,695897<sup>0</sup> W. El suelo empleado fue ferralítico Rojo Compactado Eútrico según la clasificación realizada por Hernández-Jiménez et al., (2019). Se partió de un diseño de bloques al azar, con tres tratamientos y tres réplicas por cada uno de ellos.



Figura 2. Foto satelital de la estación experimental Juan Tomas Roig.

Se establecieron nueve parcelas con una dimensión de 5,4 m de ancho por 5,8 m de largo y un área de 31,32 m<sup>2</sup>, con distancia de 0,90 m entre surcos y 0,70 m entre plantas. Cada parcela contó con cinco surcos y un total de 35 plantas, en total se plantaron 315 semillas. El área cultivada fue de 16,2 m ancho por 17,4 m de largo para un área total de 281,9 m<sup>2</sup>. En el estudio se aplicaron los bioproductos comerciales IH-plus y ME-50, los cuales pertenecen a la gama de Microorganismos Eficientes (ME). Se realizaron aplicaciones foliares cada siete días con dosis de 50 mL·L<sup>-1</sup>, según lo recomienda el fabricante de los referidos bioproductos. La aplicación de los productos se realizó con una mochila en el horario entre las seis y nueve ante meridiano para evitar la incidencia directa de los rayos del sol sobre los microorganismos.



Para evaluar el rendimiento de las semillas se trazó un área de un metro cuadrado por réplica y se cosecharon todas las legumbres presentes en las plantas. Posteriormente se separaron las semillas de las legumbres y se les determinó la masa. El resultado del rendimiento de semillas se cuantificó en  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ . Se caracterizó la morfología de las legumbres y las semillas. Para ello se cuantificaron los siguientes indicadores morfológicos:

Masa total de las legumbres: se tomaron 50 legumbres por tratamiento y se determinó la masa total utilizando una balanza técnica marca Sartorius modelo BSA 2201 con una precisión de 0,1g.

Largo de las legumbres: se utilizaron 50 legumbres por tratamiento, para lo cual se empleó una regla graduada con un margen de error de 0,1 mm.

Semillas por legumbre: se tomaron 50 legumbres por tratamiento y se cuantificaron la cantidad de semilla por cada legumbre.

Largo, ancho y grosor de la semilla: se midió con un pie de rey digital con un margen de error de 0,001 mm.

Masa de la semilla: se masaron todas las semillas cosechadas por cada tratamiento, para lo cual se empleó una balanza analítica Sartorius modelo BSA 2201.

Volumen de la semilla: se determinó por la ecuación  $\frac{4}{3} \pi (1/2 L \cdot G \cdot A)$ .

---

$$V (\text{semillas}) = \frac{4}{3} \pi (1/2 L \cdot G \cdot A) \quad (\text{Romero- Saritama } et al., 2016)$$

**Leyenda:**  $V_{(\text{semillas})}$  (volumen de las semillas,  $\text{mm}^3$ ), **L** (largo de las semillas, mm), **G** (grosor de las semillas, mm) y **A** (ancho de las semillas, mm).

---

### 3.2 Definición del efecto de la imbibición de las semillas de *C. ensiformis* sobre sus propiedades químicas y tecnofuncionales.

Para obtener harina de las semillas de *C. ensiformis* se utilizó el método de imbibición-secado. En el proceso de imbibición de las semillas se evaluó el tiempo a las 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72 y 84 h. La relación masa/volumen fue de 1 g de semillas/20 ml de agua. Se masó 20 g de semilla de *C. ensiformis* (aproximadamente 12 unidades) en una balanza técnica marca Sartorius modelo BSA 2201. Posteriormente, las semillas se lavaron con agua corriente y se colocaron en vasos precipitados de 500 ml con 400 ml de agua corriente. Mientras que las semillas del tratamiento control (0 horas de imbibición) se evaluaron en el momento inicial. Una vez que concluyó el proceso de imbibición las semillas se secaron con papel de filtro absorbente Macherey-Nogel (MN640w 100 ø mm). Finalmente se determinó la masa de las semillas embebidas y se calculó el índice de absorción a partir de la formula:

---

$$\text{Índice (abs)} = m (\text{húmeda}) / m (\text{fresca})$$

**Leyenda:** **Índice (abs)** (Índice de absorción), **m (húmeda)** (masa húmeda, g) y **m (fresca)** (masa fresca, g).

---

Posteriormente se eliminó de forma manual la testa y se determinó la masa del cotiledón sin la testa. Además, se evaluó el porcentaje de semillas que presentaron ruptura de la corteza seminal, factor que posibilita retirar la testa de una forma más sencilla. Seguidamente, se procedió a realizar el proceso de secado a los cotiledones sin testa, el cual se realizó en una estufa eléctrica con control digital de temperatura Marca Boxun a

60 °C por 24 h definiéndose la curva de secado de los cotiledones de la *C. ensiformis*. La pérdida de humedad de las semillas sin testa en el proceso de secado se evaluó cada 2 h, para lo cual se les determinó la masa a los cotiledones y se calculó mediante la ecuación:

---

$$\Delta \text{ Humedad} = \{1 - [m (\text{fresca}) - m (\text{seca}) / m (\text{seca})]\} * 100$$

**Leyenda:**  $\Delta$  **Humedad** (pérdida de humedad), **m (fresca)** (masa fresca, g) y **m (seca)** (masa seca, g).

---

Los valores tomados para realizar la curva de secado fueron referidos al índice de pérdida de humedad ( $\Delta$  Humedad.) Las semillas secas sin testa se trituraron en un molino manual de discos, mientras que las semillas con testa se trituraron en un molino de martillos con maya de 1180  $\mu\text{m}$ . Se evaluaron las propiedades químicas, tecnofuncionales y físicas. Además, se determinó el rendimiento industrial en referencia a masa fresca.

La harina de semillas proveniente del mejor tratamiento tecnológico del proceso de imbibición se comparó con la harina de semillas sin proceso previo de imbibición. Esta harina se envasó y selló en bolsa de polipropileno de 50  $\mu\text{m}$  para el posterior análisis de sus propiedades químicas, tecnofuncionales y físicas.

### **3.2.1 Caracterización química de las harinas de *C. ensiformis*.**

Para la caracterización química de las harinas de semillas con testa y sin testa se determinó el contenido de proteína bruta por el método Kendalj (AOAC International, 2016). El contenido de proteínas solubles totales se determinó por el método de Bradford (1976) y se expresó en  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , referidos a una curva de calibración de albúmina de suero bovino.

El contenido de compuestos fenólicos solubles se determinó por el método descrito por Gurr *et al.* (1992) con modificaciones. Se utilizaron 10  $\mu\text{L}$  del extracto crudo, se le adicionaron

990 µL de agua destilada y 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Se dejó reposar durante cinco minutos. Luego se agregaron 600 µL de una solución de NaOH (1 mol·L<sup>-1</sup>) saturada con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. La mezcla se incubó por una hora a 25°C para permitir el desarrollo del color. Se midió la absorbancia a 725 nm en espectrofotómetro Rayleigh Vis-7236. El contenido de compuestos fenólicos se expresó en mg·mL<sup>-1</sup> referido a una curva de calibración de ácido clorogénico.

### **3.2 2. Determinación de las propiedades tecnofuncionales de las harinas de *C. ensiformis*.**

Como propiedades tecnofuncionales se determinaron la capacidad de retención de agua (CRA) y la capacidad de formación de espumantes (CFE) según lo describe Bravo Delgado (2019). Para determinar la capacidad de retención de agua (CRA) se tomó 1 g de la muestra de harina de *C. ensiformis* (con testa y sin testa) y se le añadieron 10 ml de agua destilada en tubos de centrifugas de 16 ml de capacidad. Se agitaron durante 1 min a temperatura ambiente, para lo cual se utilizó un Vortex. Los tubos se centrifugaron a 15 000 x g por 30 min a 4 ± 2 °C. en una centrifuga marca (Heal Force®). Posteriormente se desechó el líquido sobrenadante y se masó nuevamente la muestra de harina. Los resultados se expresaron como gramo de agua absorbida por gramo de muestra.

---

$$CRA = m_2 - m_1 / m_1 \quad \text{Bravo Delgado (2019)}$$

**Leyenda:** CRA (coeficiente de retención de agua), m<sub>2</sub> (masa húmeda, g) y m<sub>1</sub> (masa seca, g).

---

Para determinar la capacidad de formación de espumante (CFE), se mezclaron 2 g de la harina de *C. ensiformis* (con testa y sin testa) con 100 ml de agua destilada por 5 min en una licuadora comercial. Transcurrido este tiempo, se transfirió a una probeta de 100 ml y se midió el volumen final a los 30 s. La capacidad espumante se expresó como el porcentaje de aumento en volumen.

---

$$\text{CFE} = (V_2 - V_1) / V_1 * 100$$

Bravo Delgado (2019)

**Leyenda:** CFE (porcentaje de formación de espuma),  $V_2$  (Volumen final, mL) y  $V_1$  (volumen inicial, mL).

---

### **3.2.3 Caracterización física (granulometría) de la harina de semillas sin testa de *C. ensiformis*.**

Para determinar las características granulométricas de la harina de *C. ensiformis* (con testa y sin testa) se utilizaron 100 g, los cuales fueron en el tamizador (Ro-tap-SDILTEST-modelo CL-313-8, Italy) con un juego de tamices (tamiz standard) con aperturas de 2360, 1180, 500, 600, 250 y 180  $\mu\text{m}$  y colector, mantenidas bajo agitación durante 15 min, finalmente se masaron las fracciones de harina retenidas en cada tamiz y calculado el porcentaje de retención. El valor del tamaño medio final fue obtenido de cinco repeticiones. Como se describió anteriormente las semillas no embebidas fueron trituradas en un molino de martillo con tamiz de 1180  $\mu\text{m}$ . A la harina restante no se le realizó el tamizaje dado que se deduce que el método utilizado da una mayor uniformidad granulométrica con tamaños de partículas menores a la apertura del tamiz utilizado.

### 3.3 Definición del procedimiento para obtener un extracto crudo rico en proteínas a partir de harina de semillas de *C. ensiformis*.

Para la extracción de proteínas se realizó una evaluación bifactorial en la cual se analizó la capacidad de dilución de proteínas presentes en la harina de la *C. ensiformis* en agua destilada. Los factores que se tomaron en cuenta fueron la relación masa volumen y el tiempo de extracción según lo define la tabla 4. Para lo cual se masaron 2, 3 y 6 gramos de harina y se disolvieron en 30 mililitros de agua destilada. La disolución se envasó en frascos de cristal que se colocaron en una zaranda eléctrica por un periodo de tiempo de 60, 90 y 120 minutos.

Tabla 4. Diseño experimental para la extracción de proteínas de la harina de *C. ensiformis*.

Tratamiento	Relación masa/volumen (g/mL)	Tiempo (min)	
1	01:05	6g/30ml	60
2	01:05	6g/30ml	90
3	01:05	6g/30ml	120
4	01:10	3g/30ml	60
5	01:10	3g/30ml	90
6	01:10	3g/30ml	120
7	01:15	2g/30ml	60
8	01:15	2g/30ml	90
9	01:15	2g/30ml	120

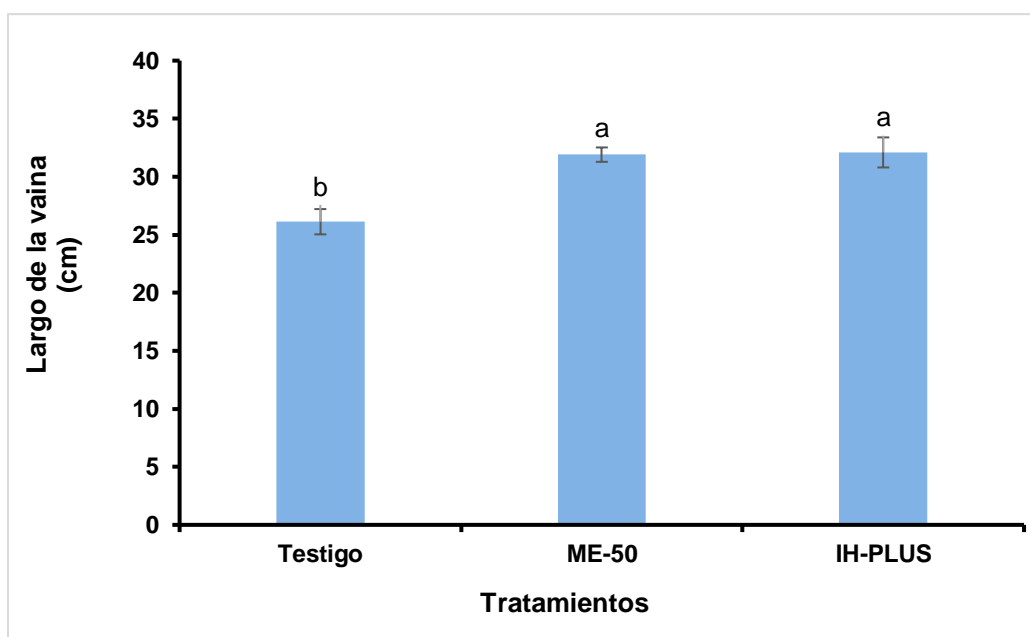
En total se realizaron 9 tratamientos y tres réplicas de cada uno de ellos. Las disoluciones una vez transcurrido el tiempo de agitación fueron transferidas a un tubo de centrifuga de 33 ml y centrifugados a 3000 rpm durante 15 min. Para lo cual se utilizó una centrífuga refrigerada a 4 °C. Una vez centrifugadas las muestras se tomó el sobrenadante y se le

determinó las proteínas solubles por el método Bradford (1976). Los sólidos restantes durante el proceso de centrifugación fueron almacenados en refrigeración a una temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$  para futuras investigaciones.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1 Determinación del potencial agroproductivos de semillas de *C. ensiformis* con el uso de bioproductos comerciales IH-Plus y ME-50.

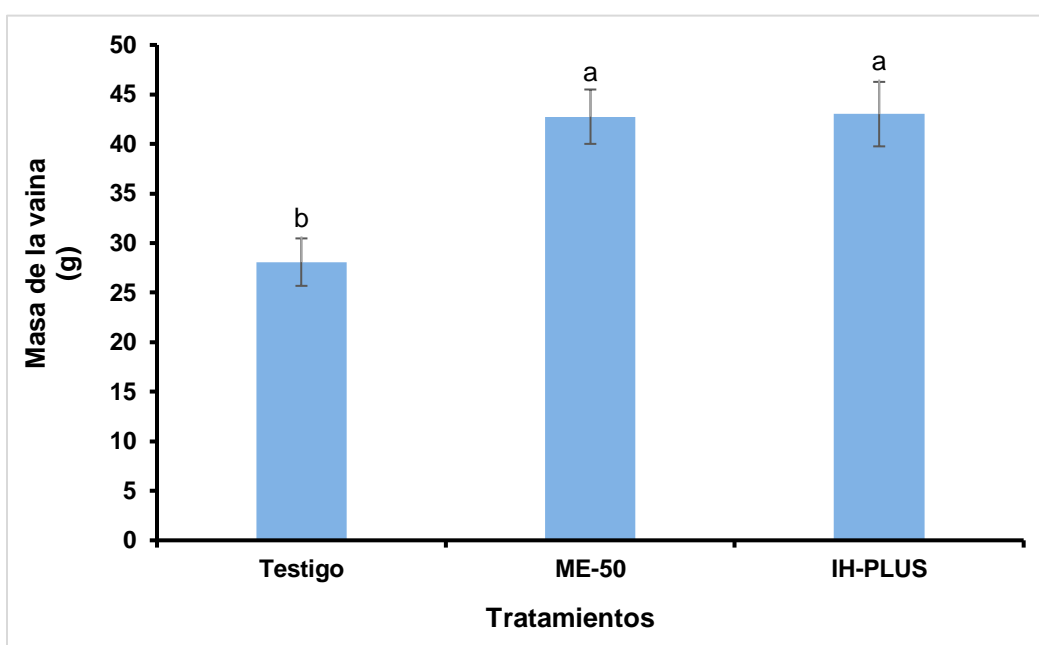
Como se observa en la figura 3, los resultados obtenidos cuando se utilizaron los bioproductos comerciales ME-50 e IH-Plus mostraron un efecto positivo de éstos sobre el largo de la vaina. Se observaron diferencias estadísticas significativas para la variable (Largo de la vaina) entre los tratamientos de ME-50 e IH-Plus con respecto al testigo. No existieron diferencias significativas entre los tratamientos de ME-50 e IH-Plus. Según Cidicco (2004) las vainas de la *C. ensiformis* (L.) pueden llegar a medir hasta 30 cm, por lo que los resultados obtenidos a partir de la aplicación de los bioproductos comerciales supera lo descrito por este autor.



**Figura 3:** Largo de la vaina (cm) de *C. ensiformis* tratadas con los bioproductos comerciales (ME-50 e IH-Plus). Medias con letras desiguales difieren estadísticamente. ANOVA de un factor, Tukey,  $p \leq 0,05$ ,  $n = 50$ .



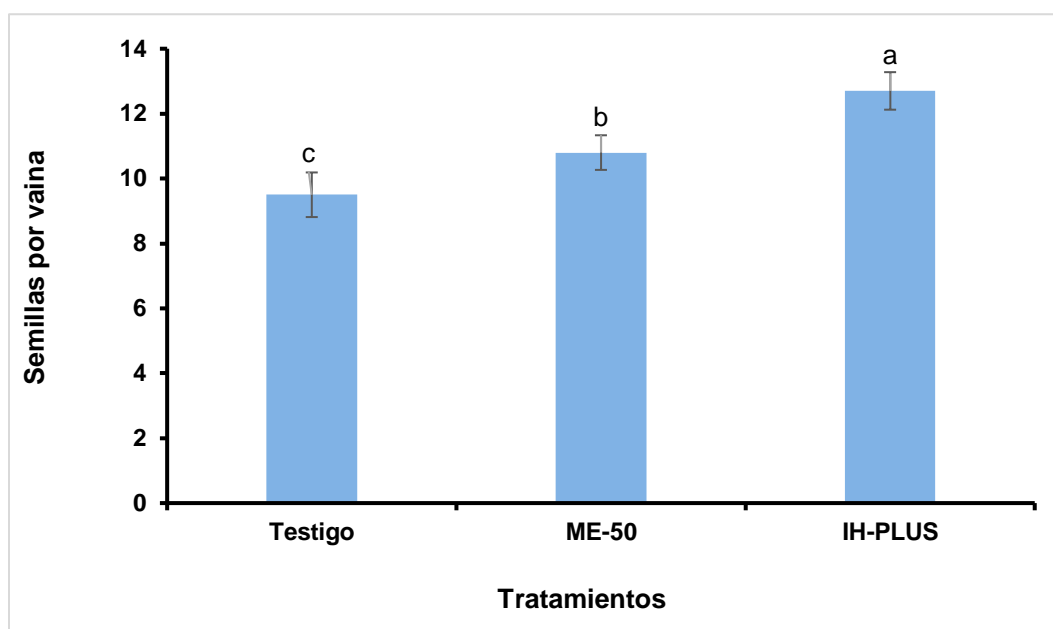
La masa promedio de una vaina de *C. ensiformis* (L.) fue de 28,08 g en el tratamiento testigo, mientras que en los tratamientos a los cuales se les aplicó los bioproductos comerciales ME-50 e IH-Plus, su masa fue de 42,76 y 43,02 g, respectivamente. En la figura 4 se observaron diferencias significativas para la variable de masa de la vaina entre los tratamientos a los cuales se les aplicó los bioproductos comerciales ME-50 e IH-Plus con respecto al tratamiento testigo. No existieron diferencias significativas entre los tratamientos a los que se le aplicaron los bioproductos.



**Figura 4:** Masa de la vaina (g) de *C. ensiformis* (L.) tratadas con los bioproductos comerciales (ME-50 e IH-Plus). Medias con letras desiguales difieren estadísticamente. ANOVA de un factor, Tukey,  $p \leq 0,05$ ,  $n=50$ .

El hecho de que en los tratamientos que se aplicaron los bioproductos tuvieron un mayor largo y masa de la vaina conllevó a que estos tratamientos posean una mayor cantidad de semillas por vaina con respecto al testigo (figura 5). Si bien no existieron diferencias significativas entre los dos bioproductos utilizados en cuanto a largo y masa de la vaina, si se apreciaron diferencias significativas en cuanto al número de semillas por vaina. El

tratamiento al cual se le aplicó el bioproducto comercial IH-Plus resultó el de mayor cantidad, con una media de 12,7 semillas/ vaina superior al tratamiento con ME-50 que mostró una media de 10,8 semillas/vaina y del tratamiento testigo con una media de 9,5 semillas/vaina.

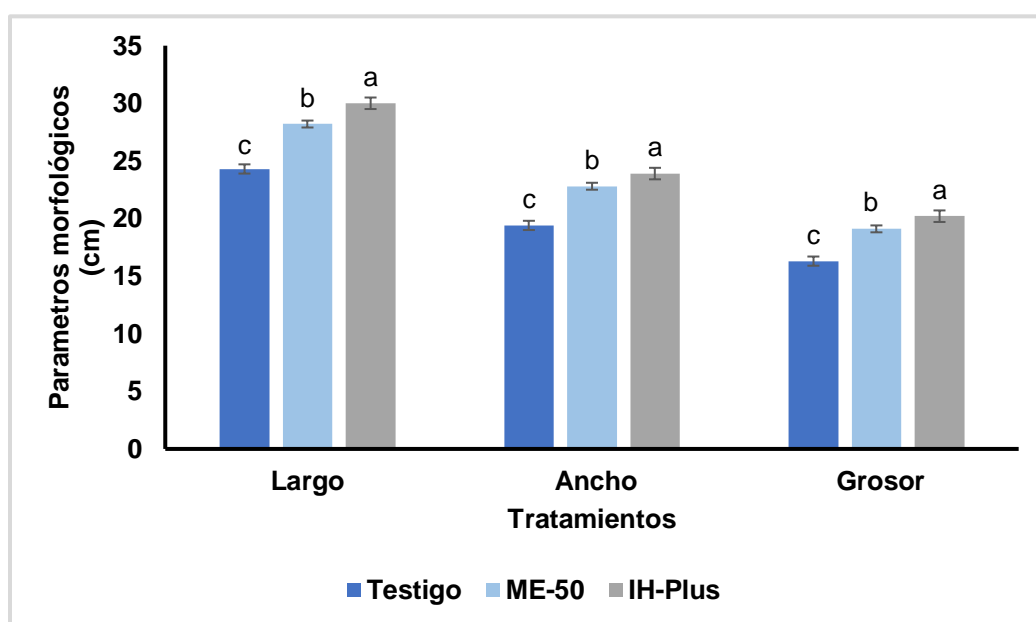


**Figura 5:** Semilla por vaina (u) de *C. ensiformis* (L.) tratadas con los bioproductos comerciales (ME-50 e IH-Plus). Medias con letras desiguales difieren estadísticamente. ANOVA de un factor, Tukey,  $p \leq 0,05$ ,  $n=50$ .

Cidicco (2004) señaló que *C. ensiformis* produce 10 semillas por vaina mientras que Chávez, *et al* (2009) que plantearon que contiene entre 8-10 semillas/vaina. En la presente investigación el tratamiento con el bioproducto IH-Plus mostró mayor cantidad de semillas por vaina que lo planteado en la bibliografía consultada. El incremento del número de semillas por vaina pudiera estar dado en que estos bioproductos comerciales los cuales contienen microorganismos autóctonos benéficos actúan como fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fósforo y productores de hormonas vegetales. Lo cual podría mejorar la disponibilidad y la absorción de nutrientes esenciales, estimular la síntesis de compuestos

orgánicos, regular el balance hormonal, proteger contra el estrés biótico y abiótico y favorecer la actividad de los polinizadores.

En las figuras 6, se muestran los indicadores morfológicos de las semillas de *C. ensiformis* (largo, ancho y grosor). Los mejores resultados se observaron para el tratamiento con IH-Plus con diferencias significativas con el resto de los tratamientos. En las parcelas que se empleó el bioproducto comercial IH-Plus se cosecharon semillas con un largo promedio de 30,01 mm, mientras que en las parcelas que se aplicó ME-50 la media del largo de sus semillas es de 28,2 mm y en la muestra testigo está por debajo de los valores antes relacionados con solo 24,30 mm. Según Cidicco (2004) las semillas de *C. ensiformis* tienen solo 21 mm de largo. Lo que difiere de los resultados obtenidos en la presente investigación.



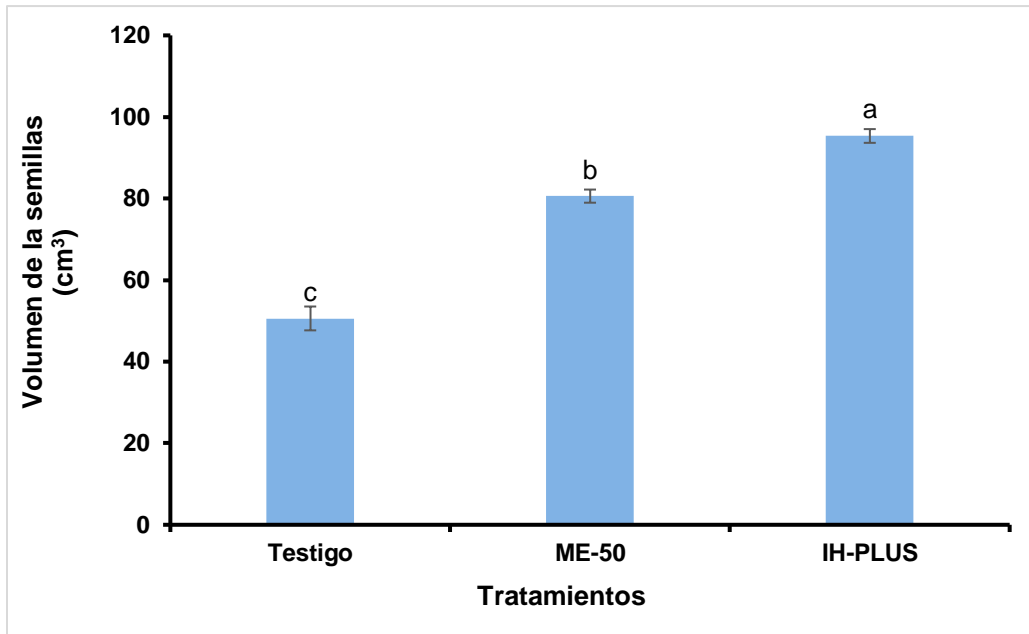
**Figura 6:** Parámetros morfológicos de las semillas (largo, ancho y grosor) de *C. ensiformis* tratadas con bioproductos comerciales (ME-50 e IH-Plus). Medias con letras desiguales difieren estadísticamente. ANOVA de un factor, Tukey,  $p \leq 0,05$ ,  $n=50$ .

En cuanto al ancho de las semillas, se apreció que el bioproducto comercial IH-Plus (23,90 mm) mostró una diferencia significativa con respecto al ME-50 y al testigo (22,81 y 19,42

mm respectivamente). Estos resultados difieren de lo descrito por Cidicco (2004) el cual describe que el ancho de las semillas de *C. ensiformis* es solo de 15 mm.

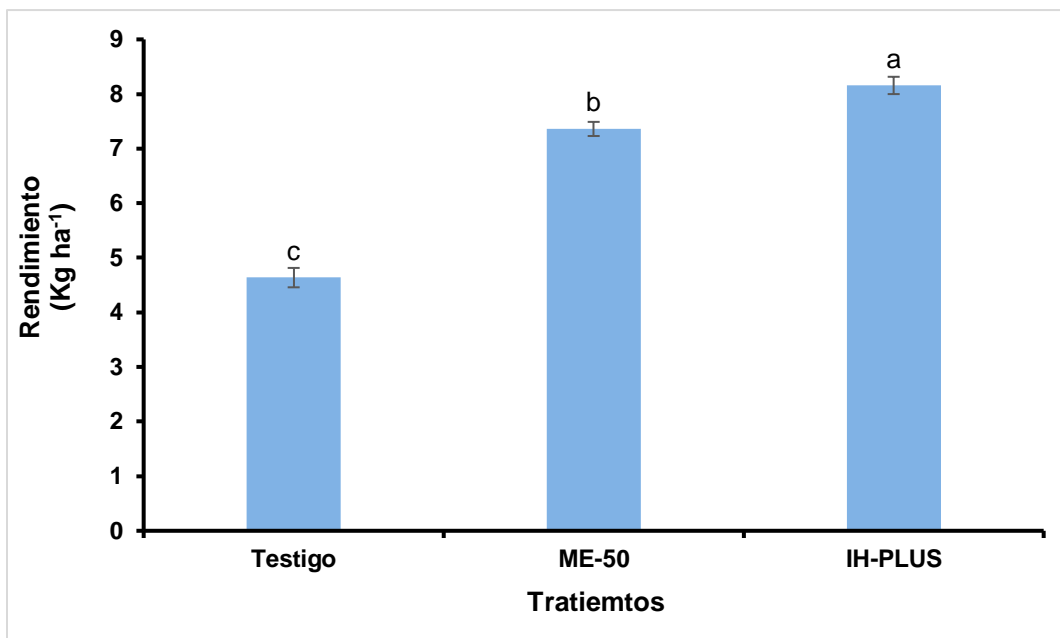
Se puede observar diferencia significativa para la variable de grosor de las semillas entre los tratamientos de ME-50 e IH-Plus y estos con respecto al testigo. El estudio realizado demuestra que las semillas recolectadas de las plantas a las cuales se le aplicó el bioproducto comercial IH-Plus muestra valores de 20,23 mm de grosor, mientras que las semillas a las cuales se le aplicó a las plantas madres el producto ME-50 tiene un ancho de 19,1 mm y las semillas relacionadas al tratamiento testigo su grosor es de 16,31 mm. Según Cidicco (2004) las semillas de *C. ensiformis* tienen un grosor de 10 mm, lo que difiere de los resultados alcanzados en la investigación. Los cuales duplican el valor citado por el autor en el tratamiento que aplicó el bioproducto comercial IH-Plus.

En la figura 7 se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos, siendo los mejores resultados para el tratamiento con IH-Plus (95,3 cm<sup>3</sup>), mientras que a las plantas a las que se le aplicó el ME-50 el volumen de las semillas fue de 80,6 cm<sup>3</sup>.



**Figura 7:** Volumen de Semillas de *C. ensiformis* con aplicación de los bioproductos comerciales (ME-50 e IH-Plus). Medias con letras desiguales difieren estadísticamente. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente. ANOVA de un factor, Tukey,  $p \leq 0,05$ ,  $n=50$ .

En la figura 8 se observaron diferencias significativas en cuanto al rendimiento agrícola ( $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) entre los tratamientos de ME-50 e IH-Plus y de estos con respecto al testigo. En el estudio realizado se concluyó que el bioproducto comercial IH-Plus mostró mayor acción sobre los parámetros agro-productivos en el cultivo de *C. ensiformis*, a partir del rendimiento agrícola que muestra valores de  $8,16 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ , mientras que el rendimiento agro-productivo en el tratamiento que se aplicó el bioproducto ME-50 el valor fue de  $7,36 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  y el rendimiento del tratamiento testigo, es de  $4,64 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ .



**Figura 8:** Rendimiento de semillas de *C. ensiformis* con la aplicación de los bioproductos comerciales (ME-50 e IH-Plus). Medias con letras desiguales difieren estadísticamente. ANOVA y prueba de Tukey,  $p \leq 0,05$ .  $n=50$ .

En cuanto al rendimiento agro-productivo de cultivo de *C. ensiformis*, según diferentes autores consultados, los cuales evaluaron este indicador entre los años 1982 a 1984 mostraron valores de  $10,98 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  según Oviedo y Guzmán (1983) con un marco de plantación de 80 000 plantas/ha. Mientras que Escobar *et al.* (1984), plantearon que el rendimiento agrícola en el cultivo está entre  $6,846$  y  $8,496 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  con un marco de plantación de 40 000 plantas/ha.

Otro de los estudios en el cultivo muestra rendimientos agrícolas de  $6,91 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  según lo planteado por Mora *et al.* (1982) con un marco de plantación de 33 000 plantas $\cdot\text{ha}^{-1}$  y de  $3,857$  a  $4,606 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  cuando se utilizó un marco de plantación de 50 000 plantas/ha. Posteriormente a estos resultados otros autores mostraron rendimientos agrícolas por debajo de lo planteado por los autores antes mencionados. Según León (1991) los

rendimientos agrícolas de la *C. ensiformis* en Venezuela están en el orden de los 2.5 a 6 kg·ha<sup>-1</sup>, mientras que en Cuba según Díaz (2000) solo alcanzan 1 a 2 kg·ha<sup>-1</sup>.

Según Sheahan, (2012) en México el rendimiento agrícola es de 1 a 4,6 kg·ha<sup>-1</sup> y de 1 a 3,8 kg· ha<sup>-1</sup> en Yucatán, México; según Hernández- Montiel *et al.* (2016). Lo que muestra que el rendimiento agrícola del cultivo ha disminuido en la última década. Los rendimientos obtenidos bajo las condiciones edafoclimáticas de la estación experimental Juan Tomas Roig entre los meses de julio a diciembre del 2021, muestran valores superiores a los descritos por Díaz, (2000) para el cultivo en Cuba. En cuanto a los tratamientos en los cuales se aplicaron los bioproductos comerciales ME-50 e IH-Plus mostraron rendimientos similares a los expresados por Escobar *et al.*, (1984).

Estudios realizados por Calero (2019) el cual utilizó inóculo de microorganismos eficientes obtuvo los mayores resultados productivos con la aplicación al surco asociada a la foliar, en comparación con las formas de aplicación al surco y foliar individualizadas. Mientras que (Calero Hurtado *et al.* (2020) estudiaron el efecto de los microorganismos eficientes en el cultivo de habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones de organopónico. Los resultados obtenidos por los autores mostraron que la utilización del bioproducto a base de microorganismos eficientes incrementó los indicadores morfoproductivos y el rendimiento del cultivo. Por otro lado, Lambert *et al.* (2109) evaluó el efecto de microorganismos eficientes en el crecimiento y rendimiento de *Phaseolus vulgaris* L. y *Arachis hipogea* L. mostrando el efecto positivo de estos y la posibilidad de utilizarlos con otros bioproductos, como es el caso de la aplicación combinada de este con el Quitosano.

Los resultados mostrados por los autores citados coinciden con los obtenidos en la presente investigación los cuales estarían relacionados con los efectos fisiológicos que pudieran haber causados los bioproductos utilizados. Los microorganismos eficientes al ser

inoculados al suelo incrementan la actividad biológica del mismo, así como, en las plantas activan los mecanismos de defensa, potencian la nutrición, el crecimiento y el rendimiento (Núñez et al., 2017).

Es sabido que existen varios microorganismos que son responsable de la solubilización de nutrientes como P y K, otros son capaces de fijar el N<sub>2</sub> atmosférico convirtiéndoles en formas asimilables para las plantas. Asimismo, el incremento en profundidad y superficie del sistema radical permite una mejor adquisición del agua (Aung et al., 2018). Se considera que las bacterias endofíticas pueden al igual que las rizobacterias contribuir a una mejor adquisición de nutrientes y otros recursos que favorecen el crecimiento y desarrollo de las plantas (Santoyo et al., 2016).

Similarmente existen numerosos hongos y bacterias capaces de solubilizar minerales que contienen potasio mediante la producción de ácidos orgánicos e inorgánicos y la producción de polisacáridos. Según lo descrito por Su et al. (2017) las bacterias fotosintéticas específicamente las especies *Rhodopseudomonas palustris* (Molisch) y *Rhodobacter sphaeroides* (van Niel), son microorganismos autótrofos facultativos. Este grupo utiliza como fuente de carbono moléculas orgánicas producidas por los exudados de las raíces de las plantas y como fuente de energía utilizan la luz solar y la energía calórica del suelo. La especie *R. palustris* es capaz de producir aminoácidos, ácidos orgánicos, hormonas, vitaminas y azúcares, donde todos ellos pueden ser utilizados por microorganismos heterótrofos para su crecimiento (Feijoo, 2016). Mientras que la especie *R. sphaeroides* además de la actividad fotosintética, muestra gran diversidad metabólica que incluyen litotrofismo, respiración aeróbica y anaeróbica, la fijación de nitrógeno y la síntesis de tetrapirroles, clorofilas y vitamina B12. (Morocho & Leiva-Mora, 2019)



El manejo agronómico de la *C. ensiformis* en Cuba demanda establecer un procedimiento que permita incrementar sus rendimientos agro- productivos. Su potencial productivo en granos, los cuales poseen alto contenido de sustancias nitrogenadas, es ampliamente reconocido por diferentes autores. A pesar de lo anteriormente señalado, el perfeccionamiento del manejo agrícola del cultivo y la utilización de esta leguminosa tropical es insuficiente e incipiente. El uso de bioproductos de fabricación nacional y local es una vía para lograr los objetivos propuestos. Los Microorganismos eficientes brindan la posibilidad de establecer un procedimiento de forma sencilla, económica y sostenible para incrementar los rendimientos agrícolas. Por lo que generar conocimientos acerca de la acción de los bioproductos comerciales ME-50 e IH-Plus sobre los parámetros agro-productivos de la *C. ensiformis* reviste trascendental importancia quedando justificado en la presente investigación.

#### **4.2 Definición del efecto de la imbibición de las semillas de *C. ensiformis* sobre sus propiedades químicas y tecnofuncionales.**

En la tabla 5 se muestra la relación entre el tiempo de imbibición y el índice de absorción, de las semillas de *C. ensiformis*. Se puede observar que el tiempo de imbibición incidió directamente en el índice de absorción ya que existió un incremento de la masa fresca de las semillas en el tiempo. Las semillas del tratamiento control no mostraron incremento en su masa, al no existir absorción de agua resultando un índice de absorción de 1. A las 12 h se apreció un aumento significativo de la masa fresca de las semillas debido a la absorción de agua. Entre las 12 y 24 h hubo un aumento significativo en el índice de absorción, lo que mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Después de las 24 h no hubo variaciones significativas en el índice de absorción con respecto a las 36 y 48 h, así como entre las 48, 60, 72 y 84 h, excepto entre las 36 y 60 h en las cuales si hay diferencias significativas en el índice de absorción. Las semillas de leguminosas según lo describe la

bibliografía y corroborado en la presente investigación duplican su masa al ser sometidas a un proceso de imbibición.

La factibilidad de retirar la testa de las semillas que fueron sometidas a los diferentes tratamientos se pudo verificar a través de la tabla 5, la misma mostró el porcentaje de semillas con respecto al tiempo de imbibición que presentaron plasmólisis. Lo que posibilitó retirar la testa de forma más sencilla y rápida que las semillas que no presentan plasmólisis.

**Tabla 5. Efecto del tiempo de imbibición en el índice de absorción de las semillas de *C. ensiformis*.**

Tiempo de imbibición (h)	Masa fresca (g)	Índice de Absorción
0	20,07±0,34 d	1,00 ± 0,01 d*
12	39,67±0,34 c	1,98 ± 0,01 c
24	41,54±0,35 b	2,08 ± 0,02 b
36	42,13±0,34 b	2,11 ± 0,03 b
48	43,73±0,34 ab	2,19 ± 0,04 ab
60	44,13±0,34 a	2,21 ± 0,04 a
72	44,67±0,35 a	2,23 ± 0,03 a
84	44,07±0,34 a	2,21 ± 0,02 a

\* Medias con letras desiguales difieren estadísticamente. ANOVA y prueba de Tukey,  $\leq p 0.05$ . n=5.

Como se pudo apreciar en la tabla 6 durante el proceso de imbibición de las semillas las mismas entre las 0 a 36 h no presentaron plasmólisis, mientras que a las 48 h solamente ocurrió la misma en un 8.0 %. A las 60 h aumentó el porcentaje de semillas con plasmólisis en el orden del 21.3 % mostrando diferencias significativas con respecto a las 48 h. A las 72 h se evidenció un aumento de este fenómeno, sin diferencias estadísticas significativas con las 84 h, mostrando los mayores valores.

Un signo que se observó como muestra de la degradación de las semillas radicó en que las semillas bajo esta condición sobrenadan en el medio líquido y se apreció una degradación de la testa como muestra del inicio de un proceso de fermentación.

Tabla 6. Porcentaje de semillas de *C. ensiformis* que presentaron degradación durante el proceso de imbibición.

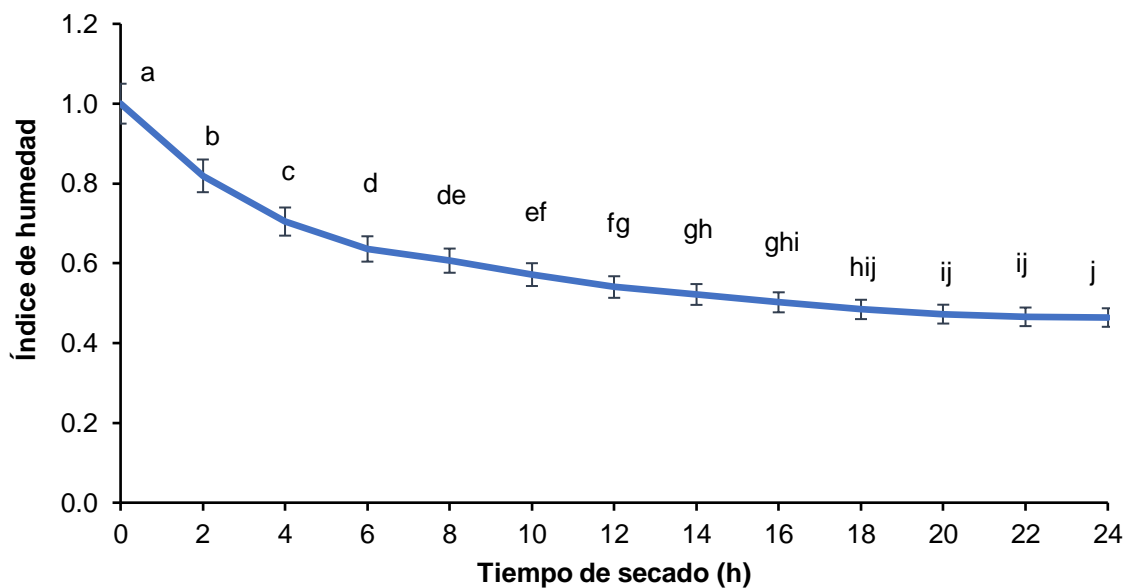
Tiempo de imbibición (h)	Semillas con degradación (%)
0	0 ± 0 d*
12	0 ± 0 d
24	0 ± 0 d
36	0 ± 0 d
48	8,0 ± 2.3 c
60	21,3 ± 2.3 b
72	78,6 ± 3.1 a
84	81,3 ± 2.7 a

\*Medias con letras desiguales difieren estadísticamente. ANOVA y prueba de Tukey,  $p \leq 0.05$ . n=5.

En los análisis bioquímicos realizados por diferentes investigadores en el proceso de remojo, se encontraron especies microbianas de las familias, Lactobacillaceae y Enterobacteriaceae, las cuales prosperaron en este ambiente. Entre las especies identificadas por Vira Putri *et al.* (2023) se encontraron *Staphylococcus aureus* (Rosenbach), *Enterococcus faecium* (Orla-Jensen), *Enterococcus durans* (ex Sherman and Wing), *Pediococcus pentosaceus* (Claussen), *Stenorophomonas maltophilia* (Palleroni & Bradbury), *Cronobacter sakazakii* (Farmer) y *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter).

En la figura 7 se muestra la relación entre la masa inicial de los cotiledones húmedos y el valor de su masa seca, cada 2 h. La curva de secado mostró una mayor pendiente en las

primeras 6 h donde existieron diferencia significativa entre los valores comprendidos entre 0 a 6 h, entre las 6 y 8 h no existieron diferencias significativas ni entre las 8 y las 10 h, si existe diferencia entre las 6 y 10 h. De igual forma entre las 10 y 12 no existen diferencias significativas ni entre las 12, 14 y 16 h, mientras que si hay diferencias significativas entre las 10 y 14 h. Lo que indica que el proceso de secado es más lento entre las 8 a las 16 h. A partir de las 16 h y hasta las 22 h no existe diferencia significativa entre los valores medios, mientras que entre las 16 y 24 h si existe diferencia significativa entre sus medias. Entre las 18 y las 24 h no existe diferencia entre los valores de la media por lo que se puede definir que a partir de las 18 h se logra la estabilidad de la masa de las semillas.



**Figura 9.** Dinámica de pérdida de humedad de los cotiledones sin testa de las semillas de *C. ensiformis* en la interacción tiempo. Medias con letras desiguales difieren estadísticamente. ANOVA de un factor, Tukey,  $p \leq 0,05$ ,  $n=5$ .

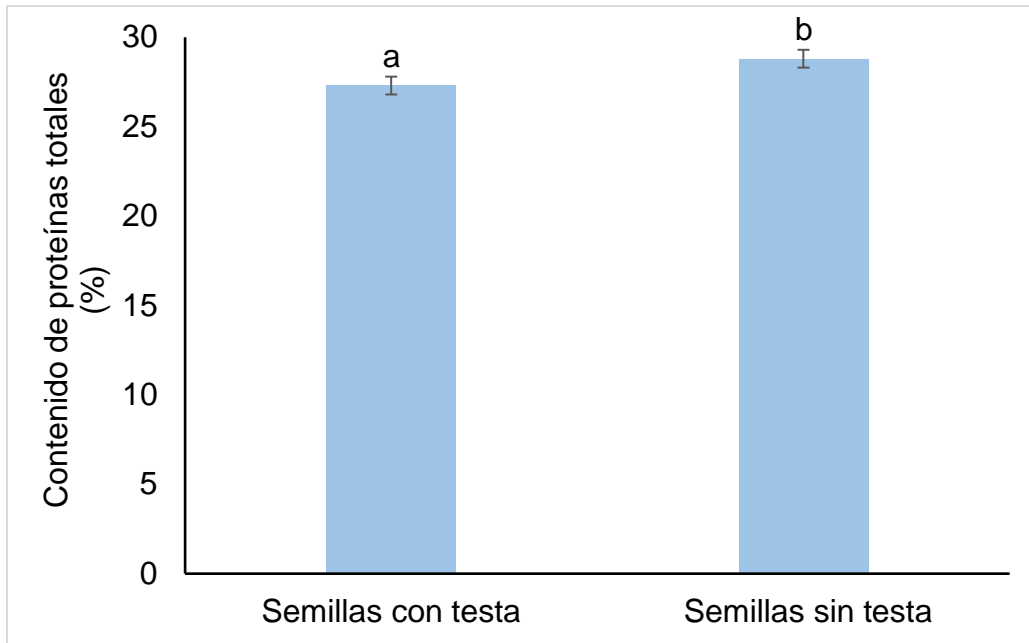
Las semillas de la *C. ensiformis* al ser sometidas a diferentes tiempos de imbibición en agua corriente, la eliminación manual de la testa y posterior proceso de secado conlleva a un procedimiento el cual tiene como finalidad obtener una harina para su uso posterior como

fuerza proteica en procesos biotecnológicos con la finalidad de obtener un extracto acuoso de proteínas. Uno de los procesos descritos en la bibliografía consultada es el planteado por Aguilera, (2009) el cual plantea que la imbibición de las semillas se utiliza generalmente como un paso previo a otro tratamiento. Al activarse enzimas hidrolíticas por efecto de la germinación donde la imbibición de la semilla forma parte de la primera etapa de la misma, comienza la desintegración de macromoléculas, principalmente proteínas y carbohidratos, modificando las propiedades tecnofuncionales de las harinas de manera directa según lo describieron Megat Rusydi *et al.* (2011).

El rendimiento productivo posterior al proceso de secado y molinado fue de  $73,72 \pm 0,12$  % con respecto a la masa inicial de las semillas (masa fresca), incurriendo en pérdidas del 26,28 %. Estas pérdidas se pueden deducir que están asociadas a la eliminación de la testa y a la alta incidencia de semillas con plasmólisis lo que posibilita que microelementos solubles paseen al medio líquido. También es probable el inicio de una fermentación espontánea debido a la presencia en el medio acuoso de microorganismos. A partir de la experimentación realizada y posterior al análisis y evaluación de los datos arrojados se puede definir que el proceso es viable para obtener harina de semillas de *C. ensiformis*, el cual presenta una textura fina, de color blanco hueso y olor característico.

#### **4.2.1 Caracterización química de las harinas de *C. ensiformis*.**

La figura 10 muestra el contenido de proteínas totales, determinado por el método Kjeldahl. Existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Las semillas de *C. ensiformis* no embebidas presentaron un contenido de proteínas del  $27,3 \pm 0,1$  % mientras que las semillas embebidas en agua por 72 h mostraron un contenido de  $28,8 \pm 0,1$



**Figura 10.** Contenido de proteínas totales de las semillas con testa y semillas sin testa de *C. ensiformis* (%). Medias con letras diferentes difieren estadísticamente según (t Student,  $p \leq 0,05$ ,  $n = 5$ ).

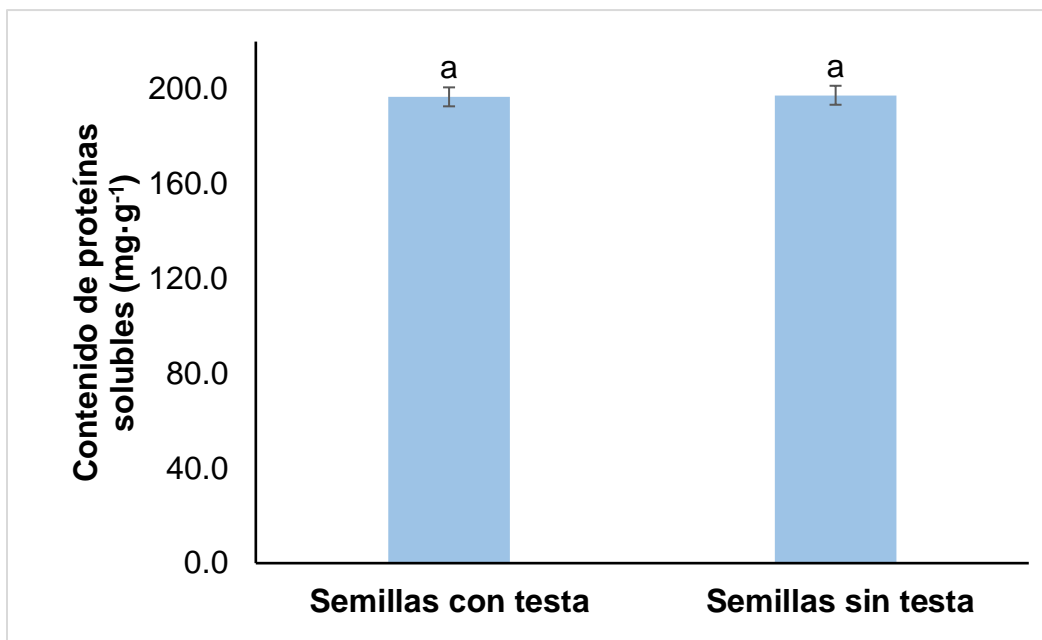
Según Walker, (2009) las plantas presentan poco contenido de proteínas comparado con los tejidos animales, puesto que solo 1-2% de la célula es citoplasma donde están las proteínas y el resto del volumen celular lo componen las vacuolas y la pared celular. No obstante, existen algunas plantas cuyo contenido de proteínas son considerables entre las que se encuentran las semillas de leguminosas. Las harinas obtenidas de leguminosas son fuente importante de proteínas, carbohidratos, minerales, vitaminas y fibra en la dieta, y sirven para mejorar las propiedades funcionales de otros productos (Aguilar & Vélez, 2013)

Los datos obtenidos en las semillas de *C. ensiformis* no embebidas muestran valores acordes a los descritos por Días (2000). Este autor informó que la masa seca contiene entre 26 y 32 % de proteína bruta. Según un estudio realizado por Kanetro *et al.* (2021), quien señaló que, tras 36 y 48 h de remojo, el contenido de proteínas de los frijoles Jack aumentó. De igual manera Vira Putri *et al.* (2023) planteó que el remojo de los frijoles Jack en agua

destilada durante diferentes períodos de tiempo da como resultado un mayor contenido de proteínas y aminoácidos.

En el proceso descrito anteriormente para obtener la harina, las semillas después de absorber agua en el proceso de imbibición no pueden iniciar la actividad respiratoria al encontrarse en un medio acuoso. Esto trae consigo que se interrumpa el proceso de germinación iniciado en las primeras horas de la imbibición y provoque la ruptura de la corteza de las semillas, la cual facilita retirar su envoltura seminal. Según lo planteado por Vira Putri (2023) la multiplicación de microorganismos está representada por espuma en la superficie del agua durante la fase de remojo de semillas de *C. ensiformis*, efecto observado en la presente investigación. Esto se debe a que se ha descubierto que las legumbres remojadas contienen bacterias ácido láctica, y levadura (Yan *et al.*, 2013).

Por otra parte, Ramli *et al.* (2021) evaluaron el proceso de remojo de las semillas de *C. ensiformis* en una solución de bicarbonato ( $\text{NaHCO}_3$ ) 1 %. Los estudios realizados por el autor muestran una disminución significativa del contenido de proteína, concluyendo que la prolongación del proceso de remojo trae consigo una disminución significativa del contenido de proteína. En cuanto a las proteínas solubles presentes en las harinas no existieron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Por lo que el proceso de remojo en agua corriente realizado a las semillas no afectó la solubilidad de las proteínas, por lo que no interfirió en la extracción de estas en procesos tecnológicos posteriores.



**Figura 11.** Contenido de proteínas solubles de semillas con testa y semillas sin testa de *C. ensiformis*. Medias con letras iguales no difieren estadísticamente según (t Student,  $p \leq 0,05$ ,  $n = 9$ ).

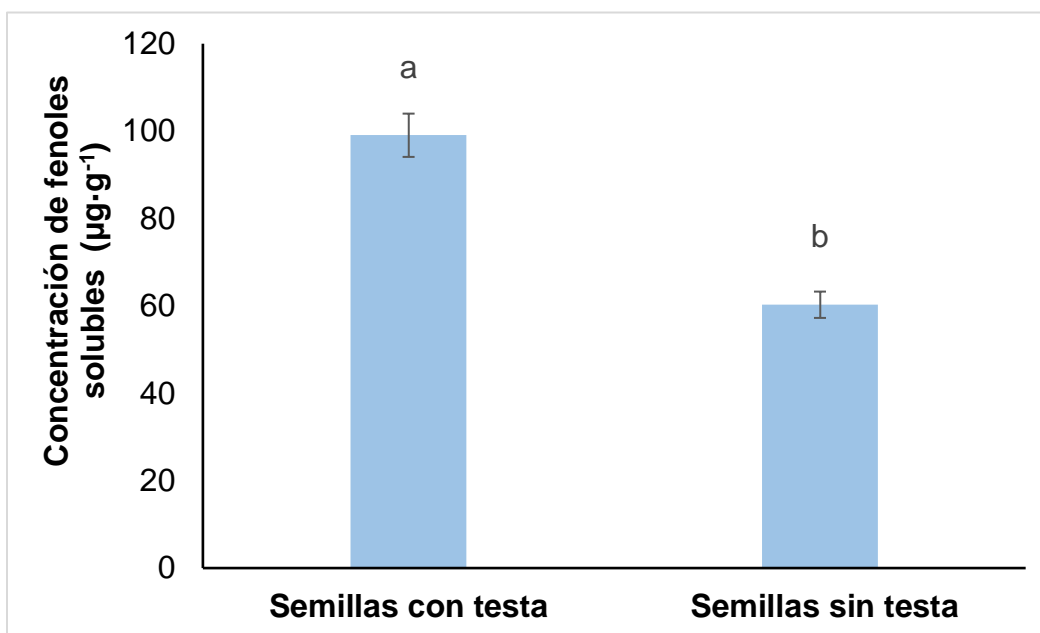
Según Dale (1988) las proteínas cuando son sometidas a procesos tecnológicos donde está presente la transferencia de calor a medida que aumenta el tiempo del proceso disminuye la solubilidad de éstas. Estudios realizados por este autor demostraron que la solubilidad de la proteína en la harina cruda sin procesar se aproximó al 100 %, mientras que disminuyó a medida que aumentó el tiempo en la autoclave y finalmente alcanzó una solubilidad del 38 %. Por lo que se puede concluir que el proceso de remojo de los granos de leguminosas es más factible a la hora de preservar las propiedades tecnofuncionales como la solubilidad de las proteínas

Mientras que Chel Guerrero *et al.* (2003) durante su investigación determinaron que la solubilidad de la harina de *C. ensiformis* es del 60,8 % con respecto al total de la masa. Si se tiene en cuenta que las proteínas totales de las semillas de *C. ensiformis* es de 273 mg·g<sup>-1</sup>



<sup>1</sup> y las proteínas solubles de 196,69 mg·g<sup>-1</sup>, se puede afirmar que las mismas representan el 71,9 %

En cuanto a la concentración de fenoles según se muestra la figura 12 existieron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Según Hernández-Montiel *et al.* (2017) el contenido de fenoles totales en semillas de *C. ensiformis* es de 38,3 – 46,0 µg g<sup>-1</sup>: Estos valores referenciados son inferiores a los obtenidos en la presente investigación.

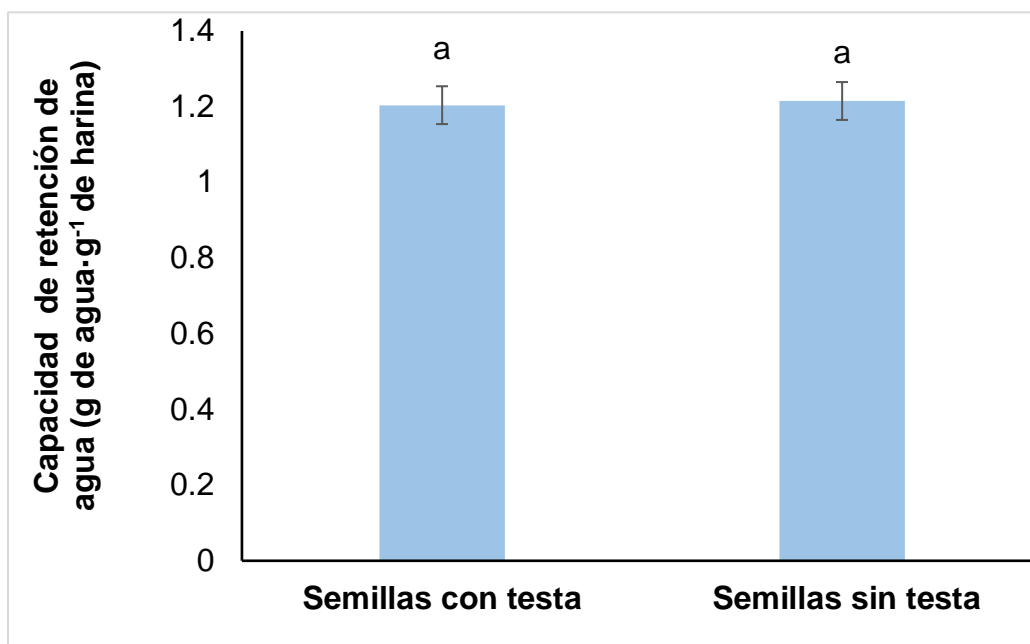


**Figura 12.** Contenido fenoles solubles de las semillas con testa y semillas sin testa a de *C. ensiformis*. Medias con letras diferentes difieren estadísticamente según (t Student,  $p \leq 0,05$ ,  $n = 5$ ).

#### **4.2.2. Determinación de las propiedades tecnofuncionales de las harinas de *C. ensiformis*.**

La capacidad de absorción de agua (CRA) en las semillas y la harina se muestra en la figura 13. En relación a estas propiedades tecnofuncionales no existieron diferencias

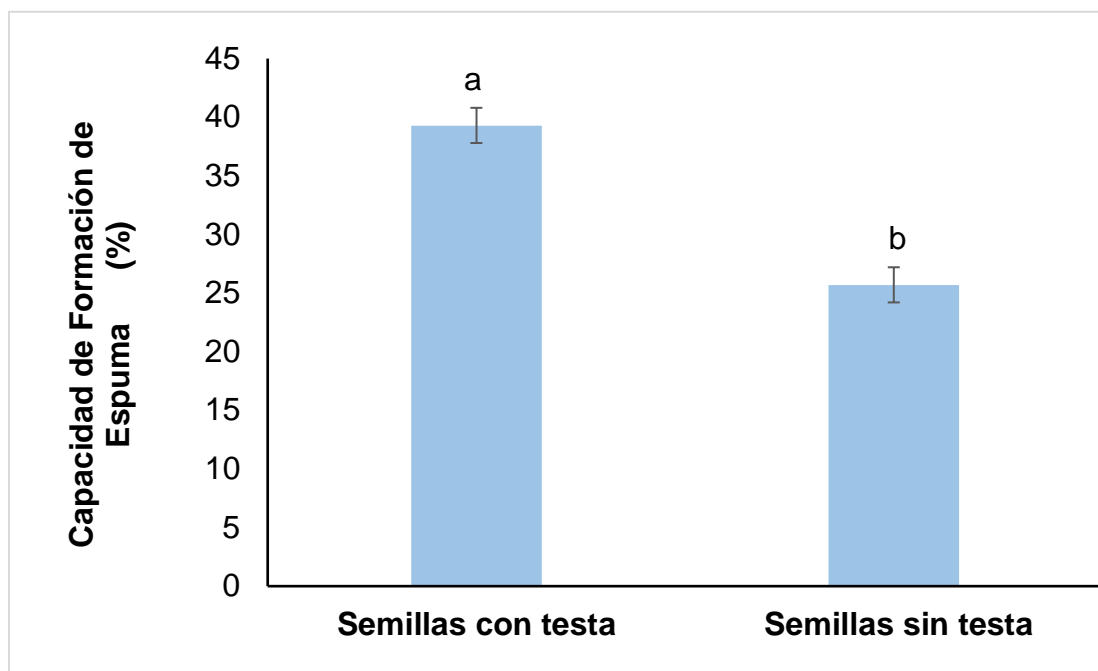
estadísticamente significativas entre los tratamientos por lo que no se vio afectada con el tiempo de imbibición y posterior retiro de la corteza seminal de las semillas.



**Figura 13.** Capacidad de retención de agua de las semillas con testa y semillas sin testa de *C. ensiformis*. Medias con letras iguales no difieren estadísticamente (t Student ,  $p \leq 0,05$ ,  $n = 5$ ).

Según lo planteado por Lam *et al.* (2018) las variaciones en la capacidad de retención de agua están relacionadas con la naturaleza y el tipo de proteínas, su conformación y la relación entre la polaridad de la superficie, la hidrofobicidad y el número y tipo de grupos polares, así como su composición de aminoácidos. Estas características de las proteínas también pueden incidir de igual manera en la capacidad de retención de agua. Lo que podría estar dado a que las propiedades hidrófilas de las proteínas están asociadas con la presencia de grupos polares, como carbonilo, hidroxilo, amino, carboxilo y sulfhidrilo. según lo planteado por Tenorio *et al.* (2016)

Mientras que el índice de Capacidad de Formación de Espuma (CFE) fue superior para la semilla, con diferencias estadísticas significativas (figura 12). Esto muestra que este indicador disminuye con el proceso de remojo.



**Figura 14.** Capacidad de formación de espuma para las semillas con testa y semillas sin testa de *C. ensiformis*. Medias con letras diferentes difieren estadísticamente (t Student,  $p \leq 0,05$ ,  $n = 5$ ).

Estos valores determinados, expresados como el porcentaje de aumento en volumen se tiene que para las semillas es de 39,3 % y para la harina es de 25,7 %. Los datos obtenidos para la harina obtenida de las semillas de *C. ensiformis* sin tratamiento de imbibición mostró valores acordes a lo planteado por Chel *et al.* (2003) quienes plantean que el porcentaje de la capacidad de formación de espuma es entre 30 y el 41 %.

Según describe Megat-Rusydi *et al.* (2011) al activarse enzimas hidrolíticas por efecto de la germinación donde la imbibición de la semilla forma parte de la primera etapa de la misma, comienza la desintegración de macromoléculas, principalmente proteínas y

carbohidratos, modificando las propiedades tecnofuncionales de las harinas de manera directa. Esto se evidencia en las modificaciones en cuanto a la capacidad de formación de espuma en la presente investigación. Según Vega (2017) la formación de espuma depende de la solubilidad de las proteínas y de la naturaleza anfipolar de estas biomoléculas que le permiten actuar como agentes tensoactivos (disminución de la tensión superficial).

Bocarando-Guzmán *et al.* (2022) obtuvieron un aislado de proteínas de *Moringa oleifera* Lam a pH 5,5; la cual mostró capacidad de formación de espuma de 38,88 %, siendo similar a los obtenidos en la presente investigación en las semillas de *C. ensiformis*. Por otro lado, este autor refirió que la capacidad de formación de espuma en los extractos crudos de *M. oleifera* aumentó a medida que el valor del pH se alejó del punto isoeléctrico de las proteínas y la solubilidad aumentó.

Por lo que se puede definir que la disminución de la capacidad de formación de espuma, permite que la harina obtenida pueda ser utilizada en posteriores procesos de extracción de proteínas e hidrólisis enzimática de las mismas dado su menor tendencia a la formación de espumas y por ende menos pérdidas de proteínas durante el proceso por esta causa.

#### **4.2.3 Caracterización física (granulometría) de la harina de semillas sin testa de *C. ensiformis*.**

En la tabla 7 se observan los resultados del análisis del tamizado de las harinas. En el primer tamiz #4, no hubo retención de harinas ya que la abertura del tamiz era mayor al diámetro de las partículas. En cuanto a los tamices #8 y #16 el porcentaje de retención fue de 3,72 y 9,85 por ciento respectivamente. En el tamiz #30, #60 y #80 el porcentaje de retención fueron de 20,52, 13,73 y 28,58 respectivamente; mientras que en el colector final quedó el 23.60 por ciento de la muestra.

Tabla 7: Granulometría de la harina de semillas sin testa de *C. ensiformis*.

# tamiz	Apertura ( $\mu\text{m}$ )	Porcentaje de retención
		(%)
4	4750	0,000 $\pm$ 0,000*
8	2360	3,720 $\pm$ 0,287
16	1180	9,850 $\pm$ 0,614
30	500	20,520 $\pm$ 0,397
60	250	13,730 $\pm$ 0,597
80	180	28,580 $\pm$ 0,617
colector	0	23,600 $\pm$ 0,497

\*error estándar (SE)., n = 5

Estos valores representan que el 86,43 por ciento de la muestra tiene un tamaño de partícula menor de 1180  $\mu\text{m}$ , lo que muestra uniformidad en cuanto al tamaño de partículas.

Según lo planteado por Bezerra *et al.* (2018) una harina con alta uniformidad de granulometría absorbe el agua de manera homogénea y promueve una cocción uniforme. Lo que resulta beneficioso para que estas puedan ser utilizadas en procesos biotecnológicos. Estas características facilitan una mayor homogeneidad en la extracción de proteínas lo que posibilita lograr optimizar procesos tales como la hidrólisis enzimática de proteínas.

La harina de *C. ensiformis* presenta una granulometría diferente a las harinas evaluadas por Dussán-Sarria *et al.*, (2019) los cuales estudiaron esta característica en harinas de chontaduro (*Bactris gasipaes* Kunth) y quinoa (*Chenopodium quinoa* Kuntze). La harina de chontaduro presentó un tamaño de partículas con diámetros menores, más homogénea y sin formación de grumos. En cuanto a la harina de quinoa, la misma presentó mayor tamaño de partícula y menor homogeneidad en su composición. No obstante, el porcentaje de

partículas menores de 250  $\mu\text{m}$  en ambas harinas fueron similares, con el 52,18 % en la harina de *C. ensiformis* y el 50 % en la harina de quinoa.

#### **4.3 Definición del procedimiento para obtener un extracto crudo rico en proteínas a partir de harina de semillas de *C. ensiformis*.**

Como se puede apreciar en la tabla 8 con respecto a los tratamientos con diferentes relaciones masa/volumen a medida que disminuye la cantidad de harina disuelta en el búfer de extracción aumenta la cantidad de proteínas extraídas. Existiendo diferencias significativas estadísticamente entre las medias de los tratamientos que presentan diferente relación masa/volumen

En cuanto a los tratamientos evaluados a diferentes tiempos con una misma relación masa/volumen se puede observar que en la relación de 1:5 la extracción de proteínas fue de 93,390; 96,065 y 95,846  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  a 60, 90 y 120 min respectivamente. Donde se evidencia una diferencia significativa entre 60 y 90 minutos, mientras que el valor obtenido a los 120 min no presenta diferencia significativa ni con el tratamiento a 60 ni con el de 90 min. En la relación 1:10 los valores de proteína extraída fueron de 162,237; 168,143 y 165,664  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  a 60, 90 y 120 min respectivamente, lo cual presenta diferencias estadísticas entre sus medias similares a las mostradas en la relación 1:5. Mientras que la relación 1:15 los valores alcanzados fueron de 199,830; 209,454 y 207,103  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  respectivamente con relación al tiempo de extracción evaluados con anterioridad.

Tabla 8: Contenido de proteínas extraída de la harina de semillas sin testa de *C. ensiformis*.

Tratamiento	Relación (m/v) g/mL.	Tiempo de extracción (min)	Proteínas solubles (mg proteína/g MS)
1	01:05	60	93,390 ± 0.900 f*
2	01:05	90	96,065 ± 0.926 e
3	01:05	120	95,846 ± 1.187 ef.
4	01:10	60	162,237 ± 2.111 d
5	01:10	90	168,143 ± 1.971 c
6	01:10	120	165,664 ± 1.994 cd
7	01:15	60	199,830 ± 2.066 b
8	01:15	90	209,454 ± 2.051 a
9	01:15	120	207,103 ± 1.965 a

\*Medias con letras diferentes difieren estadísticamente (ANOVA bifactorial y Tukey,  $p \leq 0,05$ ,  $n = 5$ ). \* error estándar (SE).

Estos resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de proteína extraída a 60 min con respecto a 90 y 120 min, mientras que entre 90 y 120 min no hubo diferencias estadísticamente significativas. Si bien en ninguno de los casos evaluados con diferente relación masa /volumen existieron diferencias estadísticamente significativas entre sus medias en cuanto a los tratamientos analizados a 90 y 120 min

El solvente de extracción utilizado fue agua destilada a pH 7, si bien de forma general se utiliza tampón a pH básico los resultados obtenidos muestran que bajo estas condiciones se logró de forma eficiente la extracción de proteínas. Según Ahmed (2005) el tampón de extracción para las proteínas es un factor importante debido a que son muy sensibles a los cambios de pH y permite que los resultados sean reproducibles; el tampón en que se haga la extracción debe evaluarse desde diferentes puntos de vista considerando las

interacciones posibles con otros componentes, la compatibilidad con técnicas de purificación, absorción UV y costo.

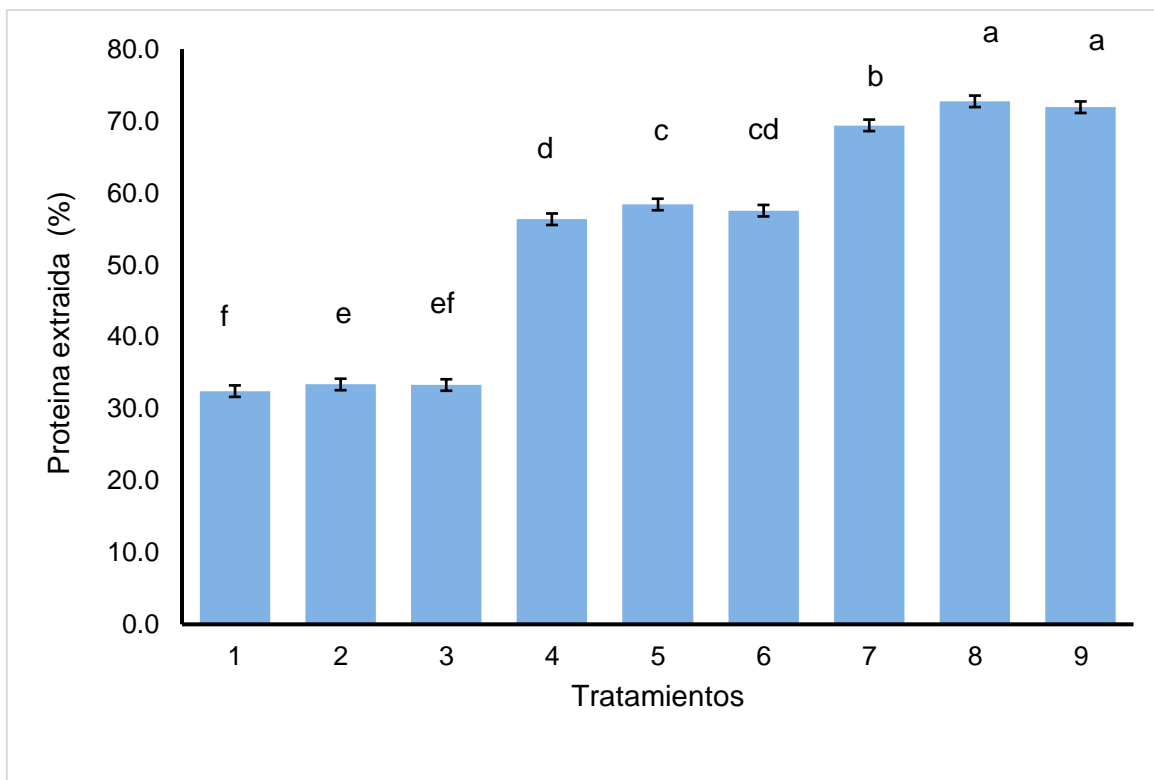
Según plantearon Bocarando-Guzmán *et al.* (2022), la solubilidad del aislado de proteína disminuyó drásticamente en comparación con la harina de moringa, dado que el proceso utilizado para obtener el aislado puede tener efecto en la conformación y funcionalidad de la proteína.

La solubilidad en agua de las proteínas afecta las propiedades tecnofuncionales como emulsificación, gelificación, formación de espuma (González-Garza *et al.*, 2017). Dado que la solubilidad de las proteínas depende de sus propiedades tensoactivas y puede verse afectada por enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas; la composición y distribución de los aminoácidos, la flexibilidad molecular, la forma y el tamaño (Sun *et al.*, 2017).

El extracto acuoso de proteína obtenido de la harina de *C. ensiformis* será utilizado en futuros procesos de hidrólisis enzimáticas de proteínas, por lo que realizar la extracción de las proteínas utilizando agua destilada disminuye tiempo del proceso, simplifica la tecnología utilizada y los recursos empleados en la etapa de aislamiento disminuyendo los costos de obtención del producto.

En la figura 15, se observa el porcentaje de proteínas extraída con respecto al total de proteínas presentes en la harina. Partiendo que la misma presenta un contenido de 28.8 %. El mayor porcentaje de proteínas extraídas es de 72,7 % correspondió con el tratamiento 8, el cual presenta una relación masa/volumen de 1:15 a 90 min.





**Figura 15.** Porcentaje de proteínas extraída de la harina de *C. ensiformis*. Medias con letras diferentes difieren estadísticamente (ANOVA bifactorial y Tukey,  $p \leq 0.05$ ,  $n = 5$ ). Las barras representan media  $\pm$  error estándar.

Los resultados obtenidos en este tratamiento no mostraron diferencia significativa estadísticamente con el tratamiento 9 el cual presenta la misma relación masa volumen a un tiempo de 120 min. Mientras que con respecto a los demás tratamientos si existieron diferencias significativas.

Martin *et al.* (2019) y Zheng *et al.* (2019) informaron valores de solubilidad del 80 % y 38 % para aislados de soja a pH 4,0 y 8,0, respectivamente. Por otro lado, Walker (2009) planteó que las vacuolas y la pared celular, presentan gran cantidad de fenoles, terpenos, pigmentos, ácidos orgánicos, carbohidratos y otros compuestos no proteicos que son interferentes al extraer las proteínas y al definir el perfil electroforético de las plantas

A partir de la experimentación realizada y posterior análisis y evaluación de los datos arrojados se pudo definir el efecto bioestimulador del bioproducto comercial IH-plus sobre los parámetros morfológicos y productivos en el cultivo de la *C. ensiformis*. De igual forma se pudo constatar procedimiento de imbibición - secado evaluado muestra la efectividad del mismo para obtener harina de semillas de *C. ensiformis* de una manera fácil y económica mostrando un rendimiento productivo del 73,72 %. El proceso de imbibición mejoró las propiedades tecnofuncionales de la harina, la cual mantiene la Capacidad de Retención de Agua (CRA) y disminuye el Coeficiente de Formación de Espuma (CFE). El proceso descrito mejora la cantidad de proteínas totales y mantiene la cantidad de proteínas solubles; en cuanto a la cantidad de fenoles presenta una disminución estadísticamente significativa en su concentración.

En los procesos biotecnológicos, las proteínas pueden utilizarse como materia prima para producir biofertilizantes agrícolas, entre otras aplicaciones. Sin embargo, la obtención de proteína de alta calidad y bajo costo es un desafío para la biotecnología ya que depende de factores como la disponibilidad, la estabilidad, la pureza, la funcionalidad y la seguridad de la fuente proteica, aspectos evaluados y corroborados en la presente investigación. En la cual se logró una extracción de proteínas del 72.7% de las proteínas totales. Por lo que el procedimiento evaluado es viable para utilizar el extracto acuso proteico en procesos biotecnológicos como es la producción de hidrolizados enzimáticos de proteína

## 5. CONCLUSIONES

- Se logran producciones de 8,16 kg·ha<sup>-1</sup> de semillas de *C. ensiformis* con el uso del bioproducto comercial IH-Plus.
- La imbibición de las semillas de *C. ensiformis* en agua incrementa las proteínas totales y disminuye el contenido de fenoles solubles y la capacidad de formación de espuma.
- Se estableció un procedimiento para la obtención de un extracto acuoso de proteínas de harina de semillas de *C. ensiformis* con un 72,7 % de las proteínas totales.

## 6. RECOMENDACIONES.

- Incluir en el procedimiento de agrotecnia de la *C. ensiformis* el uso del bioproducto IH-Plus.
- Completar el estudio fitoquímico del extracto crudo de semillas de *C. ensiformis*.
- Realizar estudios bio-guiados sobre el efecto estimulador del extracto crudo de semillas de *C. ensiformis* en cultivos de interés agrícola.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdel-Fattah, G. M., Shukry, W. M., Shokr, M. M., & Ahmed, M. A. (2016). Application of mycorrhizal technology for improving yield production of common bean plants. *Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 4(2), 191-197. doi:10.3126/ijasbt.v4i2.15103.
2. Acosta, M. M., & Hernández, G. R. (2012). Cuantificación de taninos por dos métodos espectrofotométricos en muestras forrajeras y raciones totales a base de leguminosas: *Canavalia ensiformis*, *Vigna sinensis*, y Gramineas: *Sorgum vulgare*. Universidad del Salvador Facultad de Química y Farmacia. San Salvador, el Salvador, Centro América.
3. Aguilar, R., & Vélez, J. (2013). Propiedades nutricionales y funcionales del garbanzo (*Cicer arietinum* L.). *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(2), 25-34.
4. Aguilera, E. A., & Herrera, F. (2009). Inclusión de niveles de harina de granos de *Canavalia ensiformis* en la fermentación de la caña de azúcar en estado sólido (*Sacchacana*). *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 43, 51-54.
5. Akande, K., & Fabiyi, E. (2010). Effect of processing methods on some antinutritional factors in legume seeds for poultry feeding. *International Journal of Poultry Science*, 9, 996-1001.
6. Ahmed, H. (2005). Principles and reactions of protein extraction, purification and characterization. CRC Press.
7. Akande KE., Fabiyi, EF. (2010) Effect of processing methods on some antinutritional factors in legume seeds for poultry feeding. *International Journal of Poultry Science* 9, 996-1001.
8. Alagbaoso, SO., Nwosu JN., Agunwa IM., Njoku NE., Akajaku LO., Eluchie, ChN. (2016) Effect of some thermal processing techniques on the anti-nutritional factors of

- Canavalia plagioperma piper seeds. American Journal of Food Science and Technology 4, 7-13.
9. AOAC International. (2016). Official methods of analysis of AOAC International (20a ed.). Techstreet.
  10. Aung, K., Jiang, Y., & He, S. Y. (2018). The role of water in plant-microbe interactions. The Plant Journal, 93(4), 771-780. <https://doi.org/10.1111/tpj.13815>
  11. Bezerra, M., et al. (2018). Chemical, granulometric and technological characteristics of whole flours from commercial cultivars of cowpea. Revista Caatinga, 31(1), 217-224. <https://doi.org/10.1590/1983-21252018v31n125rc>
  12. Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 42(2), 227-236.
  13. Bisen, K., Keswani, C., Mishra, S., et al. 2015. Unrealized Potential of Seed Biopriming for Versatile Agriculture. In: Rakshit, A., Singh, H.B., Sen, A. (eds) Nutrient Use Efficiency: from Basics to Advances. Springer, New Delhi. ISBN 978-81-322-2168-5.
  14. Bocarando-Guzmán, M. D., Luna-Suárez, S., Hernández-Cázares, A. S., Herrera-Corredor, J., Valente Hidalgo-Contreras, J., & Ríos-Corripio, M. A. (2022). Comparison of the physicochemical and functional properties of flour and protein isolate from moringa (Moringa oleifera Lam.) leaves. International Journal of Food Properties, 25(1), 733–747. <https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2058533>
  15. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
  16. Bravo-Delgado, H., Jiménez-Castillo, S., Meza-Álvarez, L., Arangute-Zárate, A., & Nieva-Vázquez, A. (2019). Propiedades funcionales, capacidad antioxidante de la

- harina de guaje (*Leucaena leucocephala*) y su uso en la industria alimentaria. *Revista Tecnológica Agrobiolimentaria*, 3(1), 1-10.
17. Bressani, R., Gómez, R., García, A., & Elias, L. (1987) Chemical composition aminoacid content and protein quality of *Canavalia* spp. Seeds. *J Sci Food Agric*, 40(1), 17-23.
18. Cáceres, O., González García, E., & Delgado, R. (1995). *Canavalia ensiformis*: leguminosa forrajera promisorio para la agricultura tropical. *Pastos y Forrajes*, 18(2), 149-160.
19. Calero Hurtado, A., Pérez Díaz, Y., & González-Pardo, Y. (2020). Respuesta agroproductiva de la habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.) a la aplicación de vermicompost lixiviado y microorganismos eficientes. *Revista de la Facultad de Ciencias*, 9(1), 112-124.
20. Calero Hurtado, A., Pérez Díaz, Y., Quintero Rodríguez, E., Olivera Viciado, D., & Peña Calzada, K. (2019). Efecto de la aplicación asociada entre *Rhizobium leguminosarum* y microorganismos eficientes sobre la producción del frijol común. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 20(2), 295-308. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol20\\_num2\\_art:1150](https://doi.org/10.21930/rcta.vol20_num2_art:1150)
21. Chel Guerrero, L. A., Corzo Ríos, L., & Betancur Ancona, D. A. (2003). Estructura y propiedades funcionales de proteínas de leguminosas. *Revista de la Universidad Autónoma de Yucatán*, 227, 5-17.
22. Chel Guerrero, L. A., Delgado Herrera, A., Betancur Ancona, D. A., Pérez Aviña, P., & Castellanos Ruelas, A. (2016). Propiedades funcionales de harinas y aislados proteicos de semillas de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*). *Nova Scientia*, 8(17), 219-232. <https://doi.org/10.21640/ns.v8i17.487>

23. Chong, C., Bible, B. B., & Hak-Yoon, J. (2002). Germination and emergence. Handbook of plant and crop physiology. Obtenido de <<http://www.google.com/books>>.
24. CIDICCO. (2004). Centro Internacional de Información Sobre Cultivos de Cobertura. <http://www.cidicco.hn>
25. Dale, N. (1988). Solubilidad de la proteína: indicador del procesado de la harina de soja. *Avicultura Profesional*, 5(122), 329-332.
26. da Silva Viana, L., da Silva, P. P., Nascimento, V. X., Riffel, A., & Sant'Ana, A. E. G. (2020). Comparison of methods for the extraction of proteins from root and leaf tissue of sugarcane (*Saccharum spp.*) for proteomic analysis. *Australian Journal of Crop Science*, 14(8), 1221–1229. <https://doi.org/10.21475/ajcs.20.14.08.p2184>
27. Díaz, M. (2000). Producción y caracterización de leguminosas temporales para la alimentación animal (Tesis doctoral). Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba.
28. Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31(1), 74-85.
29. Doss A., Pugalenth, M., Vadivel, VG., Subhashini, G., & Anitha, R, (2011). Effects of processing technique on the nutritional composition and antinutrients content of under-utilized food legume *Canavalia ensiformis* L. DC. *International Food Research Journal*, 18, 965-970.
30. Dussán-Sarria, S., Hurtado-Hurtado, D. L., & Camacho-Tamayo, J. H. (2019). Granulometría, propiedades funcionales y propiedades de color de las harinas de quinua y chontaduro. *Información Tecnológica*, 30(5), 1-9. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642019000500001>
31. Hernández-Jiménez, A., Pérez-Jiménez, J. M., Bosch-Infante, D., & Castro Speck, N. (2019). La clasificación de suelos de Cuba: énfasis en la versión de 2015. 40, 15–15. <https://doi.org/10.1234/CT.V40I1.1504>



32. ESCOBAR, A.; LOPEZ, R. & GUTIERREZ, H. 1984. Producción de grano de cuatro selecciones de *Canavalia* sp. IPA. Informe anual'83. p. 39
33. Escobar, A., Viera, J., Dixon, R., Mora, M., & Parra, R. (1987). *Canavalia ensiformis*: Una leguminosa para la producción animal en los trópicos. IPA. Informe anual'87, 131.
34. Elías A, Aguilera L, Rodríguez Y, Herrera FR (2009). Inclusión de niveles de harina de granos de *Canavalia ensiformis* en la fermentación de la caña de azúcar en estado sólido (*Sacchacavanaughia*). Revista Cubana de Ciencia Agrícola, 43, 51-54.
35. Emenike, H., Udedibie, A., & Emenalom, O. (2016). Effects of differently processed jackbean (*Canavalia ensiformis* L.) meals on the performance of grower pigs. British Journal of Applied Science and Technology, 13, 1-8.
36. FAOSTAT. (2019). Estadística sobre la producción y rendimientos de cultivos. Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> (23/11/2023).
37. Feijoo, M. A. L. (2016). Microorganismos eficientes y sus beneficios para los agricultores. Científica Agroecosistemas, 4 (2): 31-40. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol4\\_num2\\_art:75](https://doi.org/10.21930/rcta.vol4_num2_art:75)
38. Ferreira, K. C., Aparecida, J., Bento, C., Caliari, M., Priscila, J., Bassinello, Z., De, J., Berrios, J., & Bassinello, P. Z. (2022). "Proteínas de frijol seco: Métodos de extracción, funcionalidad y aplicación en productos para consumo humano". Cereal Chemistry, 32(1), 1-9. <https://doi.org/10.1002/cche.10514>
39. Flores Moreno, V. M., Chuck Hernández, C., De la Rosa Millán, J., Orona Padilla, J. L., Rodríguez González, W., & Salinas Valdés, A. (2016). Rendimiento de extracción de proteína y algunos análisis funcionales de concentrados y aislados de lenteja, haba y garbanzo producidos en una planta piloto. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos, 1(2), 68-72. <http://www.revistaidcta.org/index.php/idcta/article/view/12>

40. Gamboa Hipolito, C. A., & Llanos Caballero, B. (2022). Métodos de extracción de proteína y sus aplicaciones en el mejoramiento nutricional de productos Agroindustriales. *Journal of Agro-Industry Sciences*, 4(3), 133–140.
41. García Pacheco, Y., Cabrera Mercado, D., Ballestas Santos, J. A., & Campo Arrieta, M. J. (2019). Efecto de diferentes tratamientos térmicos sobre las propiedades tecnofuncionales de la harina de frijol blanco (*Phaseolus lunatus* L.) y la determinación de su potencial uso agroalimentario. *INGE CUC*, 2(15), 132-142. doi.org/10.17981/ingecuc.15.2.2019.13
42. Gasca-Tuz, C., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2017). Capacidad antibacteriana de fracciones peptídicas de frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) obtenidas por hidrólisis enzimática. *JONNPR*, 2(1), 8-16. doi:10.19230/jonnpr.1150
43. Gokhale, J. S., Garg, D., & Chakraborty, S. (2019). Optimizing the extraction of protein from *Prosopis cineraria* seeds using response surface methodology and characterization of seed protein concentrate. *LWT - Food Science and Technology*, 1-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108630>
44. González-Garza, N. G., Chuc-Koyoc, J. A., Torres-Castillo, J. A., García-Zambrano, E. A., Betancur-Ancona, D., Chel-Gerrero, L., & Sinagawa-García, S. R. (2017). Biofunctional Properties of Bioactive Peptide Fractions from Protein Isolates of Moringa Seed (*Moringa Oleifera*). *J. Food Sci. Technol*, 54(13), 4268–4276. doi: 10.1007/s13197- 017-2898-8.
45. Guéguen, J., & Cerletti, P. (1994). Proteins of some legume seeds: Soy bean, pea, faba bean and lupin. En F. Hudson (Ed.), *New and Developing Sources of Food Proteins* (pp. 113-143). Chapman and Hall USA.
46. Gurr, S. I., McPherson, M. I., & Bowles, D. J. (1992). Lignin and associated phenolic acids in cell walls. En R. J. Slusarenko, R. S. S. Fraser, & L. C. Van Loon (Eds.),

Molecular Plant Pathology and Practical Approach (Vol. 3, pp. 62-69). Oxford University Press.

47. Haney, C. H., Samuel, B. S., Bush, J., Ausubel, F. M. 2015. Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. *Nat. Plants*, 1:1-9.
48. Hernández-Montiel, W., Ramos-Juárez, J. A., Aranda-Ibáñez, E. M., Hernández-Mendo, O., Munguía-Flores, V. M., & Oliva-Hernández, J. (2017). Uso potencial y limitantes de la leguminosa *Canavalia ensiformis* en la salud y productividad de los ovinos. *Ecosistema y Recursos Agropecuarios*, 4(11), 187-200.
49. Huang, Y., & Khan, K. (1997). Characterization and quantification of native glutinane aggregates by multistacking sodium dodecyl sulfate polyacrylamide Gel electrophoresis (SDS-PAGE) Procedures. *Cereal Chem.*, 74(3), 229-234.
50. Kanetro, B.; Riyanto, M.; Pujimulyani, D.; Huda, N. (2021) Improvement of functional properties of Jack Bean (*Canavalia ensiformis*) flour by germination and its relation to amino acids profile. *Curr. Res. Nutr. Food Sci.*, 9(3), 812–822. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.9.3.12>
51. Kina-Ysa, M., Flores-Fernández, C. N., Flores-Santos, J., & Zavaleta, A. I. (2020). Obtención de hidrolizados proteicos de leguminosas usando una proteasa recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* M211. *Rev Chil Nutr*, 47(3), 381-389. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182020000300381>
52. Laing, W., & Christefeller, J. (2004). "Extraction of Proteins from Plant Tissues". En J. M. Walker (Ed.), *Current Protocols in Protein Science* (pp. 471.-477). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0611s37>
53. Lam, A. C., Can, K. A., Tyler, R. T., & Nickerson, M. T. (2018). "Pea Protein Isolates: Structure, Extraction, and Functionality". *Food Rev. Int.*, 34(2), 126–147. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1242135>

54. Lambert, T., Santiesteban, R., Ceiro, W. G., Fernández, M. E., López, G. d., & Corrales, W. C. (2019). "Efecto de bioproductos en la producción de *Phaseolus vulgaris* L. y *Arachis hipogaea* L". *Revista De Ciencias Agrícolas*, 36(1), 59-66.
55. Lamsal, B. P., Byanju, B., Rahman, M. M., & Hojilla-Evangelista, M. P. (2019). "Effect of high-power sonication pretreatment on extraction and some physicochemical properties of proteins from chickpea, kidney bean, and soybean". *International Journal of Biological Macromolecules*, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.057>
56. Lamsal, B. P., Rahman, M. M., Byanju, B., & Grewell, D. (2020). "High-power sonication of soy proteins: Hydroxyl radicals and their effects on protein structure". *Ultrasonics Sonochemistry*, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105019>
57. León, T., Reina, Y., Montilla, J., & Vierma. (1989). Evaluación nutricional de cuatro cultivares de *Canavalia ensiformis* cruda en raciones para pollos de engorde.
58. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., & Randall R.J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *The Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
59. Machicado Paco, C. (2018). Evaluación del cultivo de la canavalia (*Canavalia ensiformis* L.) para producción de abono verde. <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/20574>. municipio de Luribay comunidad de Achocara.
60. Martin, A. H., Castellani, O., De Jong, G. A., Bovetto, L., & Schmitt, C. (2019). "Comparison of the Functional Properties of RuBisCO Protein Isolate Extracted from Sugar Beet Leaves with Commercial Whey Protein and Soy Protein Isolates". *J. Sci. Food Agric.*, 99(4), 1568–1576. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9335>
61. MORA, M. & PARRA, R. 1982. Información preliminar sobre el crecimiento de la leguminosa *Canavalia ensiformis*. IPA. Informe anual'80. p. 31

62. Morocho, M. T., & Leiva-Mora, M. (2019). "Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas". *Centro Agrícola.*, 46(2), 93-103.
63. Muñoz, J. A. (2019). Rendimiento de maíz y canavalia en monocultivo y asociación en agricultura de conservación en el trópico húmedo. México: <http://ri.ujat.mx/handle/20.500.12107/3512>.
64. Muñoz-Llandes, C., Guzmán-Ortiz, F. A., González-Olivares, L. G., Palma-Rodríguez, H. M., Román-Gutiérrez, A. D., & Castro-Rosas, J. (2021). Germinación: un método de bioproceso que incrementa la calidad nutricional, biológica y funcional de harinas de leguminosas. *Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 9(2), 119-122.
65. Nkot, L. N., Fankem, H., Adamou, S., Ngakou, A., Nwaga, D., & Etoa, F. X. (2015). Abundance of legume nodulating bacteria in soils of diverse land use systems in Cameroon. *Universal Journal of Plant Science*, 3(5), 97-108. doi:10.13189/ujps.2015.030502.
66. Norst, E., Exner, M., & De Simone, A. (2015). Cell-free expression with the toxic amino acid canavanine. *Bioorg Med Chem Lett*, 6, 1-3.
67. Núñez, S., Liriano, D.B., Pérez, H., Placeres, E. & Sianeh, Z. (2017). "Respuesta de *Daucus carota*, L. a la aplicación de microorganismos nativos en condiciones de organopónico". *Centro Agrícola*. 44(2): 29-35.
68. O'CALLAGHAN, M. 2016. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (13): 5729-5746
69. Ojeda-Quintana, L. (2019). Efecto del abono verde de *Canavalia ensiformis* (L.) micorrizada en el cultivo sucesor *Cenchrus purpureus* (Schumach.). *Morrone Cuba CT-169. Pastos y Forrajes*, 42(4), 277-284.

70. Ologhobo, A., Mosenti, R., & Alaka, O. (2003). Histological alterations in the internal organs of growing chicks from feeding raw jackbean or limabean seeds. *Veterinary and Human Toxicology*, 45, 10-13.
71. Osborne, T.B. (1894). "The Proteids of the Pea". *J. Am Chem. Soc.*, 16 633-703, 757. Citado en: Evans, R. J & Ken, H. (1961). "Extraction and precipitation of nitrogenous constituents of dry navy beans". *J Agr. Food Chem.*, 11: 26-29.
72. Ouma, E. W., Asango, A. M., Maingi, J., & Njeru, E. M. (2016). Elucidating the potential of native rhizobial isolates to improve biological nitrogen fixation and growth of common bean and soybean in smallholder farming systems of Kenya. *International Journal of Agronomy*, 2016, Article ID 4569241. doi:10.1155/2016/4569241.
73. Ovalle-Torres, B. S., Barrallaza-Torres, O., & Peña-Peña, E. (2019). "Producción y caracterización de bioestimulantes para la producción agrícola a partir de residuos locales". *Revista Electrónica ANFEI Digital*, 6 (11).
74. Owen, JD., Astuti, M., & Kuswanto, KR. (2015) Tempe and related products. In: Owens JD (ed) *Indigenous fermented foods of southeast Asia*. CRC Press Taylor and Francis Group, FL, USA. pp: 1-108.
75. Panke-Buisse, K., Lee, S., Kao-Kniffin, J. 2017. Cultivated Sub-Populations of Soil Microbiomes Retain Early Flowering Plant Trait. *Microbial Ecology*, 73 (2): 394-403
76. Pedraza, R., Teixeira, K., Fernández, A., García de Salamone, I., Baca, B., Azcón, R., ... Bonilla, R. (2010). Micro organismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(2), 155-164. doi:10.21930/rcta.vol11 num2\_art:206.
77. Ramírez, M. L. (2015). Establecimiento de protocolos para la extracción y separación de proteínas por SDS-page de diferentes tipos de tejidos vegetales. Trabajo profesional como requisito para obtener el título de: Ingeniera bioquímica. Instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, México.

78. Ramli, N. A., Chen, Y. H., Mohd Zin, Z., Abdullah, M. A., Rusli, N. D., & Zainol, M. K. (2021). "Effect of soaking time and fermentation on the nutrient and antinutrients composition of *Canavalia ensiformis* (Kacang Koro)". Conf. Series: Earth and Environmental Science (756). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/756/1/012033>
79. Roig, J. (1965). Diccionario botánico de nombres. Tomo I. La Habana: Editora Consejo Nacional de Universidades.
80. Rosenthal, GA. (1991). The biochemical basis for the deleterious effects of L-canavanine. *Phytochemistry*, 30, 1055-1058.
81. Ruiz Bedolla, E., López Martínez, B., Hernández Alvarado, R. M., & Parra Ortega, I. (2019). Evaluación del aminoácido L-canavanina en semillas y vegetales de consumo humano. *Medicina e Investigación*, 7(2), 53-58.
82. Sánchez, M., Ruiz, J., Dávila, G., & y Jiménez, C. (2017). "Propiedades Tecnofuncionales y Biológicas de Harina, Aislado y Fracciones Proteicas Mayoritarias de Semillas de Inga Paterno". *Journal of food*, 15(3), 400-408.
83. Santiago, R., Figueroa, C., Véles, M., & Salazar, R. (2018). "Physicochemical Properties of Nixtamalized Black Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours". *Food Chemistry*, 240, 456–462. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.157>
84. Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, CM., Glick, B. R. 2016. "Plant growth-promoting bacterial endophytes". *Microbiological research*, 183: 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
85. Segura-Nieto, M., & Jiménez-Flores, R. (1999). "Genetic modifications of plant seed storage proteins for food production". En F. J. Francis (Ed.), *Molecular Biotechnology for Plant Food Production* (pp. 411-474). Technomic Publishing Co.
86. Serna-Cock, L., Pabón-Rodríguez, O. V., & Quintana-Moreno, J. D. (2019). Efectos de la Fuerza Iónica y el Tiempo de Remojo de Legumbres Secas sobre sus Propiedades Tecnofuncionales. *Información Tecnológica*, 30(2), 201-210.

87. Sheahan, C. M. (2012). "Plant guide for jack bean (*Canavalia ensiformis*)". United States Department of Agriculture-Natural Resources Conservation Service. New Jersey, USA.
88. Sauvu-Jonasse, C., Nápoles-García, M. C., Falcón-Rodríguez, A. B., Lamz-Piedra, A., & Ruiz-Sánchez, M. (2020). "Bioestimulantes en el crecimiento y rendimiento de soya (*Glycine max* (L.) Merrill)". *Cultivos Tropicales*, 41(3).
89. Smith P. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid". *Analytical Biochemistry* 150 (1): 76-85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
90. Su, P., Li, J., Zhang, Y., Wang, H., & Liu, X. (2017). Photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* GJ-22 induces nitrogen management on yield, quality and profitability of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(4), 532-534. Recuperado de <https://www.phytojournal.com/archives/2017/vol7issue4/PartH/7-4-1-858.pdf>
91. Suárez, D., & Melgarejo, L. M. (2014). *Biología y germinación de semillas Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal*. Departamento de biología. Universidad Nacional de Colombia.
92. Sun, C., Wu, W., Ma, Y., Min, T., Lai, F., & Wu, H. (2017). Physicochemical, functional properties, and antioxidant activities of protein fractions obtained from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) leaf. *International Journal of Food Properties*, 20(3), 3311–3325. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1238389>
93. Taimal Chano, M. G. (2021). *Revisión sistemática de métodos analíticos sobre extracción de proteína vegetal (Trabajo de titulación)*. Universidad Nacional de Chimborazo, Ecuador. Recuperado de <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/6710>
94. Tanya Morocho, M., Leiva-Mora, M. (2019) *Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas*. *Centro Agrícola* 46(2), 93-103.



95. Tenorio, A. T., Gieteling, J., De Jong, G. A., Boom, R. M., & Van Der Goot, A. J. (2016). Recovery of protein from green leaves: Overview of crucial steps for utilization. *Food Chemistry*, 203, 402–408. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.092>
96. Van het Hof, K. H., de Boer, B. C., Tijburg, L. B., Lucius, B. R., Zijp, I., West, C., & Weststrate, J. (2000). Carotenoid bioavailability in humans from tomatoes processed in different ways determined from the carotenoid response in the triglyceride-rich lipoprotein fraction of plasma after a single consumption and in plasma after four days of consumption. *The Journal of Nutrition*, 130(5), 1189-1196. <https://doi.org/10.1093/jn/130.5.1189>
97. Vadivel, V & Biesalski, HK (2012). Efect of certain indigenous processing methods on the bioactive compounds of ten different wild type legume grains. *Journal of Food Science and Technology*, 49, 673-684.
98. Valdivié, M., & Elías, A. (2006). Posibilidades del grano de *Canavalia ensiformis* fermentado con caña (*Sacchacana*) en pollos de ceba. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 40(4), 337-344. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/rca/v40n4/rca09406.pdf>
99. Valiño, E., Savón, L., Elías, A., Rodríguez, M., & Albelo, N. (2015). Nutritive value improvement of seasonal legumes *Vigna unguiculata*, *Canavalia ensiformis*, *Stizolobium niveum*, *Lablab purpureus*, through processing their grains with *Trichoderma viride* M5-2. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 49, 81-88.
100. Vegas Niño, R., Zavaleta, A. I., & Vegas Pérez, C. (2017). Efecto del pH y cloruro de sodio sobre las propiedades funcionales de harina de semillas de *lupinus mutabilis* “tarwi” variedad criolla. *Agroindustrial Science*, 7(1), 49-55. Recuperado de <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/agroindscience/article/view/1445>

101. Vira Putri, Y., Yarlina, Djali, M., Andoyo, R., Nizam Lani, M., & Rifqi, M. (2023). Extraction of protein from moringa leaves using alkaline and enzymatic methods. *Processes*, 11, 1161. <https://doi.org/10.3390/pr11041161>
102. Walker, J. (Ed.). (2009). *The protein protocols handbook* (3a ed.). Humana Press.
103. Yan, Y., Wolkers-Rooijackers, J., Nout, M. J. R., & Han, B. (2013). Microbial diversity and dynamics of microbial communities during back-slop soaking of soybeans as determined by PCR-DGGE and molecular cloning. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 1969–1974. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1368-0>
104. Yaned, C. N., Buriticá, L. M., Rivera, J. D., & Penados, J. P. (2017). Optimización del protocolo para la extracción y la cuantificación de proteínas totales en semillas germinadas de maíz. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 13(1), 1-4. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2630>
105. Yang, J., & Sagis, L. M. C. (2021). Interfacial behavior of plant proteins — novel sources and extraction methods. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 56, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2021.101499>
106. Zheng, T., Li, X., Taha, A., Wei, Y., Hu, T., Fatamorgana, P. B., . . . Pan, S. (2019). Effect of high intensity ultrasound on the structure and physicochemical properties of soy protein isolates produced by different denaturation methods. *Food Hydrocolloids*, 97, 105216. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105216>