

870177
25
24

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUADALAJARA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS



EFFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO SOBRE LA ACTIVIDAD
HEMAGLUTINANTE DEL FRIJOL COMUN (*Phaseolus vulgaris* L.)

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA
MA. LUISA SCHEVENIN PINEDO

ASESOR: Q.F.B. BEATRIZ GARCÍA VAZQUEZ
GUADALAJARA, JALISCO 1987

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

| | Pág. |
|---|------|
| I.-Introducción | 6 |
| II.-Objetivos | 10 |
| III.-Revisión de literatura | 12 |
| A.-Definición y primeros reportes | 12 |
| B.-Presencia en la naturaleza | 15 |
| C.-Métodos de extracción y análisis | 18 |
| D.-Funciones, propiedades y características bioquímicas | 22 |
| E.-Factores que disminuyen la actividad hemaglutinante | 32 |
| F.-Importancia nutricional | 38 |
| IV.-Materiales y Métodos | 44 |
| A.-Materiales | 44 |
| B.-Métodos | 44 |
| 1.-Tratamiento de las semillas | 44 |
| 2.-Prueba de peso de 100 semillas | 45 |
| 3.-Peso hectolitrico | 45 |
| 4.-Dimensiones de las semillas | 45 |
| 5.-Análisis proximal | 45 |
| 6.-Determinación de color | 47 |

| | Pág. |
|---|------|
| 7.-Absorción de agua | 48 |
| 8.-Tiempo de cocción | 49 |
| 9.-Determinación del nivel de lectinas <u>in situ</u> | 49 |
| 10.-Extracción de lectinas | 50 |
| 11.-Preparación de eritrocitos de conejo tripsinizados y tratados con glutaraldehído | 51 |
| 12.-Cuantificación de actividad hemaglutinante | 51 |
| 13.-Tratamiento térmico de lectinas extraídas del frijol | 55 |
| | |
| V.-Resultados y Discusión | 56 |
| | |
| A.-Propiedades físicas | 56 |
| 1.-Prueba de peso | 56 |
| 2.-Dimensiones de las semillas | 58 |
| 3.-Medición del color en semillas de frijol | 58 |
| B.-Análisi proximal | 62 |
| C.-Comportamiento funcuinal | 64 |
| 1.-Absorción de agua | 64 |
| 2.-Tiempo de cocción | 64 |
| D.-Disminución de la actividad hemaglutinante <u>in situ</u> | 67 |
| E.-Efecto de los tratamientos térmicos sobre las lectinas | 69 |
| F.-Modelos matemáticos sobre la actividad hemaglutinante | 78 |

| | Pág. |
|---------------------------|------|
| VI.-Conclusiones | 91 |
| VII.-Resumen | 95 |
| VIII.-Bibliografía | 97 |

I-Introduccion

Las leguminosas contribuyen en forma importante al contenido de proteina y de otros nutrientes de la dieta de gran parte de la población mundial, especialmente de aquellas localizadas en la mayoría de los países latinoamericanos. El frijol común (Phaseolus vulgaris) es una de las leguminosas que junto con el maíz se han convertido en parte estratégica de la alimentación diaria de los mexicanos. Adicionalmente a las proteínas, el frijol es fuente importante de carbohidratos, vitaminas del complejo B, fibra y minerales.

Desde el punto de vista nutricional, el frijol ayuda a reducir las limitaciones proteicas de los cereales; contribuye parcialmente a complementar los niveles de lisina disponible, mientras que los cereales aportan parte de los aminoácidos azufrados (metionina y cisteina) deficientes en las leguminosas. (Paredes-López y col., 1986).

Entre los factores indeseables y limitantes de la calidad nutricional del frijol están los inhibidores de tripsina, taninos, ácido fítico, alcaloides, y lectinas. Estas últimas también llamadas hemaglutininas o fitohemaglutininas son glucoproteínas de origen no inmune capaces de unirse específicamente a carbohidratos (Goldstein,

1980). Debido a esta unión las lectinas del frijol tienen la capacidad de aglutinar tanto eritrocitos como leucocitos, y pueden inducir la mitosis y la diferenciación en linfocitos (Sharon y Lis, 1972).

Las lectinas o hemaglutininas han sido encontradas en un gran número de especies vegetales, donde se localizan principalmente en las semillas, siendo esta presencia de marcada importancia por las propiedades tóxicas de las mismas como se verá después. Se han propuesto diversas funciones fisiológicas de las lectinas en las plantas (Liener, 1976); dentro de estas destacan las siguientes:

- A.- Median en la determinación de especificidad entre las bacterias fijadoras de nitrógeno y la planta huésped.
- B.- Actúan como anticuerpos contra bacterias.
- C.- Sirven como transporte o almacén de azúcares.

Generalmente la extracción de lectinas de las semillas es con soluciones reguladoras salinas fisiológicas, y su cuantificación se lleva a cabo con técnicas de microtitulación en diluciones seriadas con eritrocitos y por estimación visual del nivel de aglutinación en la máxima dilución. Para la purificación de fitohemaglutininas se utiliza la cromatografía de afinidad (Guevara Lara, 1987). Las lectinas de *P.vulgaris* tienen actividad hemaglutinante y mitogénica debido a la presencia de diferentes subunidades en

su molécula, formando tetrámeros de peso molecular de 120000 (Leavitt y col.,1977).

Algunas hemaglutininas son específicas para los grupos sanguíneos humanos y también tiene especificidad para determinados azúcares.

Por otra parte, las lectinas del frijol se consideran proteínas de reserva y pueden alcanzar más del 10% de la proteína total del grano (Pusztai y col.,1979; Valdebouze y col.,1980) Además las lectinas son nutricionalmente importantes, ya que tienen la capacidad de unirse a la pared intestinal causando interferencias en la absorción de los nutrientes. Por lo anterior, las lectinas presentan diversos niveles de toxicidad hacia el hombre y los animales. Pueden causar disminución del crecimiento, provocar pérdidas de nitrógeno exógeno y endógeno, afectar la actividad enzimática, inducir desórdenes nutricionales y hasta llegar a la muerte en animales de laboratorio alimentados con frijoles crudos. Se han observado también algunos casos de intoxicación de humanos por ingestión de frijoles crudos o parcialmente cocidos.

Entre los tratamientos que disminuyen la actividad hemaglutinante esta la cocción, el remojo, la germinación y la irradiación (Kadam y col.,1987) Las fitohemaglutininas bajo

condiciones de cocimiento casero no pueden ser destruidas totalmente, pero un tratamiento por 5 min en una autoclave a 120C, 1.05 Kg/cm, reduce completamente la actividad hemaglutinante (Tan y col., 1983). De igual forma, se ha encontrado que el calor seco no afecta la actividad hemaglutinante de las lectinas (Kadam y col., 1987).

En general se acepta que los tratamientos térmicos húmedos disminuyen la actividad de las lectinas en los frijoles, aunque no se eliminan en su totalidad (Jaffé, 1980).

Sin embargo, existe muy poca información sobre la sensibilidad térmica de las lectinas a diferentes condiciones de temperatura y tiempo. Tampoco se sabe si el mejoramiento genético de frijol produce cambios en la estabilidad térmica de las lectinas en relación a los materiales progenitores.

II.-Objetivos

Objetivo General.

Conocer el efecto de tratamientos térmicos sobre la actividad hemaglutinante de variedades de frijol común (Phaseolus vulgaris L.); variedades en este caso muy importantes en la agricultura de El Bajío. Para el cumplimiento de los objetivos específicos que se describen enseguida, se empleó una variedad criolla de frijol, progenitor, que no presenta resistencia al virus del mosaico común. Y con fines comparativos se empleó otra variedad descendiente de la variedad criolla, genéticamente mejorada, que sí presenta resistencia al virus del mosaico común.

Objetivos Especificos

- A.- Extraer y cuantificar la actividad hemaglutinante de dos variedades de frijol común (P. vulgaris L.) muy importantes en la agricultura regional.
- B.- Someter la fracción hemaglutinante obtenida a tratamientos térmicos de 65, 70, 75, 80 y 85^o C durante 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 min. para todas las temperaturas.
- C.- Determinar la estabilidad térmica de las fitohemaglutininas de las variedades bajo estudio.
- D.- Determinar si las lectinas de la variedad genéticamente

mejorada sufrieron algún cambio en su estabilidad
térmica en comparación a las lectinas del material
progenitor.

III.-Revisión de la literatura

A.-Definición y Primeros Reportes

Las lectinas se han definido como glucoproteínas de origen no inmune que son capaces de aglutinar células y de unirse en forma específica a los carbohidratos sin modificar su estructura (Goldstein y Collier, 1980; Borrebaeck, 1984). Las lectinas se han encontrado en una gran diversidad de especies animales y vegetales (Kochibe, 1986).

Los primeros reportes de estas sustancias aglutinantes en semillas corresponden a Stillmark en 1888 (Pusztai y col., 1983), quien observó que extractos de semillas de Ricinus communis causaban hemaglutinación de eritrocitos de humanos y animales. Los trabajos de Stillmark ya indicaban que las lectinas poseían cierta selectividad en la aglutinación de células rojas de diferentes animales. Estas observaciones fueron corroboradas y ampliadas por Landsteiner y Raubitschek en 1908. Más tarde, algunas de estas hemaglutininas mostraron ser específicas a los grupos sanguíneos humanos A, B, O y MN (Renkonen, 1948; Boyd y Reguera, 1949).

Posteriormente, para hacer referencia a la especificidad

de estas aglutininas Boyd y Shapleigh (1954) acuñaron el termino de "lectinas" (del latín legere = seleccionar).

Sumner y Howell en 1936 (Pusztai y col.,1983) observaron que la aglutinación por concanavalina A de Canavalia ensiformis era inhibida por el azúcar de caña (sacarosa). Sin embargo, fueron Watkins y Morgan en 1952 (Pusztai y col.,1983) quienes primero reportaron que algunos azúcares simples eran capaces de neutralizar una aglutinación normal de modo específico. De acuerdo con Toms y Western (1971) cerca del 95% de las lectinas reportadas desde 1948 fueron de semillas de leguminosas.

Las proteínas del frijol han sido objeto de varias investigaciones; los estudios de Osborne en 1894 (Jaffé y Hannig,1965) fueron los primeros sobre el particular.El bajo valor nutricional de las proteínas de semillas , ha sido atribuido a dos factores principales la deficiencia de aminoácidos azufrados (Jaffé,1970; Bressani y Elias,1974) y la presencia de factores antifisiológicos o tóxicos (Liener,1962)

Las leguminosas son fuentes ricas de lectinas, las cuales poseen muchas propiedades biológicas y bioquímicas interesantes, por lo que en años anteriores han sido sujetas a revisión (Jaffé,1969; Lis y Sharon,1972; Toms y Western,1971).Aunque solo han sido purificadas las lectinas

de algunas leguminosas, se han estudiado las lectinas de varios tipos de Phaseolus vulgaris, como el 'red kidney' (Rigas y Johnson,1964) , el 'wax' (Takahashi y col.,1967) y el frijol negro (Jaffé y Hannig,1965).

Una propiedad de gran importancia de las lectinas es que son tóxicas para muchos animales. Esta toxicidad se manifiesta cuando dichos animales son alimentados con dietas que contienen leguminosas crudas .

A este respecto, se han observado que la inclusión de leguminosas crudas en la dieta de animales puede causar una severa depresión del crecimiento y a veces la muerte (Liener,1969). Se ha reportado que las ratas (Kakade y Evans,1965) , la gallina doméstica (Hewitt y Coates,1969) y la codorniz (Jayne-Williams y Hewitt,1972) no puede sobrevivir a dietas que contienen frijol crudo (Phaseolus vulgaris) ,pero si crecen bien cuando los frijoles son cocidos a presión.

B.-Presencia en la Naturaleza.

Se ha reportado que las semillas de un pequeño número de variedades de Phaseolus vulgaris (menos del 10% de los examinados) no poseen actividad eritroaglutinante (Brucher,1968). Se sabe que el frijol P. vulgaris posee dos familias de lectinas glucoproteicas tetraméricas de un peso molecular aproximado de 119,000 (Pusztai y Stewart,1978).

Las lectinas o fitohemaglutininas son proteínas que se han encontrado en plantas y animales. En los vegetales se localizan especialmente en semillas de leguminosas, donde tienen marcada importancia por sus propiedades tóxicas. Allen y Brilliantine(1969) reportaron que de entre 2,663 especies de plantas, se detectó actividad hemaglutinante en 800 de ellas. En la familia de las leguminosas más de 600 especies y variedades contienen lectinas (Liener,1976). Las lectinas se han detectado en animales tales como esponja, crustáceos, (Pauly,1974); moluscos, como caracoles (Uhlenbruck y Steinhausen,1972); suero de sangre de peces, los huevos de anfibios, y hasta tejidos de mamíferos (Stockert y col.,1974).

Landsteiner y Raubitschek (1908) descubrieron sustancias aglutinantes en semillas de frijol, chícharo, lentejas. En

plantas jóvenes de cacahuete (Arachis hypogaea), cerca del 90% de la lectina fué encontrada en los cotiledones. El resto se halla en los hipocotilos, tallos y hojas, mientras que las raíces jóvenes no contienen prácticamente nada (Puepke, 1979). En la familia de las solanaceas la mayor parte de la actividad de la lectina esta asociada con el tubérculo (Marinkovich, 1964) y no con la semilla. En la planta de papa se localiza en el tubérculo (Allen y col., 1978). Las lectinas de esta familia (papa, tomate y pimientos verdes) tienen especificidad para la D-glucosamina y la N-acetil-glucosamina (Goldstein, 1980).

Se ha reportado el aislamiento de una lectina de cebada (Hordeum vulgare) (Partridge y col., 1976). Los primeros en reportar que el germen de trigo (Triticum vulgare) aglutinaba células malignas a concentraciones mucho mas bajas que las requeridas para aglutinar células normales fueron Aub y col., (1963). Asimismo, se ha detectado la presencia de lectinas en amaranto (Calderon de la Barca y col., 1985). Por otra parte, Goldsten y Hayes (1978), revisaron con detalle las propiedades de cerca de 30 lectinas purificadas, únicamente dos de las cuales no eran de origen vegetal. Entre las lectinas mejor caracterizadas se hallan la concanavalina A, la aglutinina de soya, la aglutinina de germen de trigo y la aglutinina de cacahuete.

En plantas, las lectinas se localizan principalmente en las semillas, donde representan del 3-4% del material seco (Summer y Howell, 1936). Sin embargo, se pueden detectar bajos niveles de lectinas en todos los órganos (hojas, tallos, raíces) de Phaseolus vulgaris, teniendo una distribución del 37% en raíces, 20% en hojas y 43% en tallos (Borrebaeck, 1984). Se han encontrado altos niveles de lectinas en cotiledones y eje embrionario de lenteja (Howard y col., 1972); en chícharo (Rouge, 1975); en frijol común (Mialonier y col., 1973) y en menor actividad en la testa de las semillas. Varios tejidos de la planta de soya mostraron que las lectinas están en mayor proporción en los cotiledones de la semilla, pero también fueron detectadas en el eje embrionario y en la testa (Pueppke y col., 1978).

En las semillas de leguminosas las lectinas constituyen entre el 2 y el 10% del total de la proteína (Liner, 1976). Por ejemplo, en P. vulgaris la lectina representa hasta un 10% (Pusztai y Watt, 1974); en Canavalia ensiformis, la concanavalina A representa del 2-3% de la proteína de la semilla; mientras que en soya es del 1 al 1.5% (Lis y Sharon, 1973). En base a datos de inmunodifusión, Mialonier y col., (1973) reportaron la presencia de una sustancia en hojas de P. vulgaris que contiene determinantes antigénicos comunes a las lectinas de semillas de la planta.

C.-Métodos de Extracción y Análisis

Las lectinas o hemaglutininas pueden ser de varios tipos:

- 1.- Lectinas que aglutinan células sin considerar su origen (especie o tipo de sangre).
- 2.- Lectinas que aglutinan células de una o varias clases de animales.
- 3.- Lectinas específicas a tipos de sangre.

Por criterios fisicoquímicos e inmunológicos han sido purificadas las lectinas a homogeneidad demostrable. El aislamiento de la lectinas generalmente comienza, con una extracción con solución salina fisiológica o un buffer (solución salina fosfatos) de harinas de semillas finamente molidas, de esta forma no se puede asociar con una fracción proteica distinta (Pusztai y Watt, 1974; Jaffé y col., 1974).

Se emplea a menudo una preextracción con solventes orgánicos para eliminar lípidos u otras sustancias de interferencia (Hayes y Goldstein, 1974). La detección de hemaglutininas en extractos de plantas es por una técnica de dilución seriada con estimación visual del punto final. Esta actividad hemaglutinante puede ser probada con eritrocitos nativos o modificados de humanos o animales. Las lectinas específicas a grupos sanguíneos son identificadas con ayuda

de un conjunto de eritrocitos humanos tipificados (Lis y Sharon,1981). Los glóbulos rojos se activan con un tratamiento conveniente con pronase, tripsina o papaína; para aumentar su sensibilidad a la reacción de hemaglutinación. Para la aglutinación es necesario la presencia de cloruro de sodio o alguna otra sal.

Generalmente la prueba de hemaglutinación se hace a temperatura ambiente, en tubos con diluciones seriadas de lectina y se adiciona una gota de una suspensión de eritrocitos del 2-3%. Después se incuba de 1.5-2 horas, y la aglutinación se observa visualmente o al microscopio. En el experimento debe ser incluido un control de un extracto de planta con especificidad conocida.

La actividad es expresada como título, el cual se toma como el recíproco de la dilución máxima que presenta aglutinación visible.

Un error de \pm un tubo es aceptado comunmente, esto es, un título de 64 puede tener un rango de 32 a 128. Esta prueba por dilución es solamente semicuantitativa y es aceptada por las pequeñas cantidades de muestra necesarias. Algunas veces, las lectinas no aglutinan los glóbulos rojos, a menos de que estén suspendidos en un medio mas viscoso que la solución salina fisiológica, por ejemplo vinilpirrolidina, albúmina de

suero Makela,(1957).Las lectinas pueden ser también detectadas por su habilidad de formar precipitados con polisacáridos o glucoproteínas, ya sea en líquidos o en medio semisólido Goldstein,(1972). Un método cuantitativo ideado por Liener,(1955) basado en la medición fotométrica de sedimentación de los eritrocitos a velocidad proporcional a la concentración de lectina. La actividad hemaglutinante es calculada a partir de las medidas de absorvancia a 620 nm de la suspensión de glóbulos rojos no sedimentados después de un tiempo determinado (Lis y Sharon,1972).

La actividad mitogénica de las lectinas es medida por su habilidad a la estimulación de la síntesis de DNA in vitro de linfocitos humanos periféricos o linfocitos del bazo de ratón, como se ha determinado por timina marcada (Rigas y Tisdale,1969). Los ensayos toxicológicos son útiles para delucidar las propiedades nutritivas de las lectinas (Jaffré,1980).

Las lectinas son purificadas por cromatografía de afinidad que se basa en al habilidad de las lectinas de unirse específicamente a azúcares reversiblemente (Lis y Sharon,1973) ; Lis y col.,1974).Conociendo la especificidad del azúcar de la lectina, por medio de un experimento de inhibición con un extracto de lectina y un azúcar simple, se puede designar un proceso de purificación adecuado.Felsted y

col.,(1975) utilizaron un método de purificación de lectinas de P.vulgaris de cromatografía de afinidad usando como matriz sepharose a la cual le fué acoplada tiroglobulina que sirve como ligando a la lectina. Bajo condiciones convenientes, las lectinas purificadas a concentraciones tan bajas como 0.1-1 $\mu\text{g/mol}$ y hasta mas bajas aglutinan eritrocitos.

D.-Funciones, Propiedades y Características Bioquímicas de las Lectinas.

Aun no se ha esclarecido completamente el papel fisiológico de las lectinas, aunque se han propuesto varias posibilidades. Se ha sugerido que las lectinas pueden ser el principal mediador - como determinante importante de la especificidad simbiótica entre bacterias fijadoras de nitrógeno y la planta huésped (Planque y Kijive, 1977). No es conocida la manera exacta de como las lectinas actúan como mediadores en la relación simbiótica, aunque se ha sugerido que las lectinas sirven para unir a sitios (lipopolisacáridos) de la superficie de la célula bacteriana con sitios antigénicos específicos sobre la superficie de los cabellos de la raíz de la planta huésped (Liener, 1983).

Según Liener (1976) las lectinas juegan un papel importante en funciones fisiológicas de las plantas, dentro de las cuales destacan las siguientes:

- 1.- Actúan como anticuerpos contra bacterias.
- 2.- Sirven como transporte o almacén de azúcares.
- 3.- Juegan un importante papel en el desarrollo y diferenciación de células embrionarias.
- 4.- Actúan como sustancias aglutinantes al ataque de enzimas glucoproteicas en sistemas organizados de multienzimas.

Otra función biológica atribuida a las lectinas es servir como insecticidas (Janzen y col.,1976). Esta función es interpretada en términos de adaptación de la lectina en semillas de P. vulgaris para protegerla contra el ataque de insectos predadores de semillas. Hay también evidencias que indican que las lectinas pueden servir de protección a la planta contra ciertos hongos patógenos.

Entre la amplia variedad de propiedades biológicas de las lectinas de plantas, esta la unión a glucoproteínas de la membrana del plasma, accionando muchos efectos biológicos en las células de animales (Lis y Sharon,1977).

El mecanismo de esta reacción es comparable a la interacción antígeno-anticuerpo, solo que las lectinas no se producen por inducción de respuesta inmune, sino que son innatas. Una de las propiedades biológicas mas relevantes de las fitohemaglutininas es que son glucoproteínas que poseen la habilidad de aglutinar eritrocitos y otros tipos de células distribuidas en la naturaleza (Sharon y Lis,1972).Esta capacidad de aglutinar eritrocitos de las lectinas, es específica a grupos sanguíneos de humanos (A,B,O y MN).

Algunas lectinas estimulan linfocitos latentes a dividirse y diferenciarse; y pueden finalmente llevar a cabo la división mitótica. Por lo anterior, a las lectinas se les atribuye la propiedad ser mitogénicas y se propone que la función de esta propiedad es controlar la división celular y la germinación en la planta. Sin embargo no hay evidencias de estas hipótesis (Sharon y Lis, 1972). En las fitohemaglutininas de P. vulgaris la actividad mitogénica se debe a la presencia de diferentes subunidades en la molécula de la lectina (Jaffe y col., 1974). Los efectos biológicos de las lectinas están asociados con diferentes polipéptidos (Brown y col., 1982); esto explica la variabilidad en las actividades hemaglutinante y mitogénica y al mismo tiempo la composición de los polipéptidos puede variar en preparaciones proteicas de la misma fuente. La habilidad de las fitohemaglutininas para aglutinar eritrocitos necesita de unión polivalente.

Las lectinas son tetrámeros con pesos moleculares de 120,000 las cuatro subunidades (Jaffé y col., 1974; Pusztai y Watt, 1974; Feistad y col., 1977; Leavitt y col., 1977). El rango de peso molecular de las subunidades es de 29,000-38,000 (Weber y col., 1972; Pusztai y Watt, 1974; Bollini y Chripeels, 1978). Las hemaglutininas de algunas variedades de semillas de P. vulgaris consisten de un tetrámero híbrido con dos diferentes subunidades: una subunidad reactiva a

eritrocitos (eritro-aglutinante) E y la otra subunidad reactiva a linfocitos (leuco-aglutinante) L (Felsted y col., 1981). Por lo tanto, las posibles cinco isolectinas tetraméricas pueden tener la siguiente estructura: L4, L3E1, L2E2, L1E3 y E4, (Leavitt y col., 1977; Pusztai y Stewart, 1978; Osborn y col., 1984).

Un número pequeño de lectinas son dímeros, y se obtienen de lentejas y *P. lunatus*. Con pocas excepciones, tales como soya, cada subunidad tiene un sitio de unión a azúcares. Por esta multivalencia ocurre la habilidad de las lectinas de aglutinar células o precipitar glucoproteínas; esta propiedad se pierde si la molécula se disocia en subunidades.

Manen y col., (1984) demostraron que cada isolectina tetramérica existe en cinco formas electroforéticas diferentes, dependiendo de la cantidad del catión Mn^{+2} unido a cada isolectina.

En condiciones experimentales la subunidad L parece tener muy alta afinidad para Mn^{+2} que la subunidad E. Las lectinas contienen metales y en algunos casos el requerimiento de presencia de Mn^{+2} y/o Ca^{+2} para su actividad.

La secuencia de aminoácidos revela homología entre las regiones N-terminal de las subunidades E y L de genotipos diferentes de aglutininas. Esto no incluye alteraciones en la especificidad a carbohidratos y a propiedades biológicas.

Renkonen,1950 fraccionó con acetona extractos salinos de Vicia cracca y semillas de frijol y encontró que aproximadamente el 70% es proteína y el 30% es carbohidrato en la fracción con más alta actividad hemaglutinante. Rigas y col.,(1951) reportaron que semillas de P. vulgaris producen extractos con igual contenido de polisacáridos y proteína.Las isolectinas del frijol P.vulgaris tienen similar composición de aminoácidos, pero difieren solamente en treonina, lisina y arginina. Cada isolectina contiene cerca del 4% de manosa y 2.2% de N-acetil-D-glucosamina (Leavitt y col.,1977). Existe una notable similitud en composición de carbohidratos y aminoácidos totales, de las subunidades E y L, en el mapa de péptidos tripsinados difieren (Miller y col.,1975) .

Las subunidades de las isolectinas difieren en los primeros siete aminoácidos de los veinticuatro últimos del extremo N-terminal (Miller y col.,1975). Por lo anterior, las diferencias en las propiedades biológicas de E (eritroaglutinante) y la L (mitogénica); pueden ser debidas a

resultados de pequeñas diferencias en la estructura primaria de las subunidades.

Otra de las diferencias entre las subunidades que constituyen a las isolectinas de las fitohemaglutininas es que difieren en su aminoácido N-terminal y en el punto isoelectrico. La subunidad L tiene como aminoácido N-terminal la serina y punto isoelectrico 5.25; mientras que la subunidad E tiene la alanina como aminoácido N-terminal y punto isoelectrico 5.95 (Miller y col.,1973).Las lectinas (glucoproteinas) son relativamente ricas en ácido aspártico, serina y treonina hasta en un 30% del contenido de sus aminoácidos, y son bajas en aminoácidos azufrados.En el Cuadro 1 se muestra esta composición.

Las lectinas del frijol comun P.vulgaris fueron encontradas en las fracciones proteicas de globulinas y G2/albumina; (Pusztai y Watt,1974; Manen y Miege,1977; Bollini y Chrispeels,1978).Las lectinas purificadas son solubles en agua (Manen y Miege,1977). Por otra parte, las lectinas pueden estar en forma estable complejas a carbohidratos, siendo esta característica responsable de varias de sus propiedades (Goldstein y Hayes,1978).La unión de las lectinas a carbohidratos es en forma especifica.

CUADRO No.1

Composición de aminoácidos (g/100g de proteína) de
fitohemaglutininas Phaseolus vulgaris.

| Aminoácido | Subunidades | |
|--------------|-------------|------|
| | LA | E B |
| Lisina | 3.7 | 5.5 |
| Histidina | 1.0 | 1.3 |
| Arginina | 3.6 | 2.2 |
| Asparagina | 15.6 | 14.5 |
| Treonina | 8.5 | 10.5 |
| Serina | 10.6 | 10.3 |
| Glutamina | 6.3 | 5.9 |
| Prolina | 3.1 | 3.9 |
| Glicina | 7.2 | 6.1 |
| Cistina | 0 | 0 |
| Alanina | 5.9 | 6.6 |
| Valina | 7.9 | 7.5 |
| Metionina | 0 | 0 |
| Isoleucina | 4.8 | 5.1 |
| Leucina | 10.0 | 10.9 |
| Tirosina | 2.0 | 2.5 |
| Fenilalanina | 6.4 | 5.7 |
| Triptofano | 2.7 | 2.3 |

A. Rasanen y col.,1973

B. Leavitt y col.,1977

En diferentes géneros de plantas se encuentran lectinas con la misma especificidad a carbohidratos. El frijol P. vulgaris produce fitohemaglutininas con complejos sitios de unión a carbohidratos (Pusztai y Watt, 1974; Pusztai y col., 1981).

La especificidad de las lectinas por azúcares, es establecida por la técnica de inhibición hapteno; en la cual diferentes carbohidratos son probados por su habilidad para inhibir la hemaglutinación (precipitación polisacárida o glucoproteica) por la lectina.

La especificidad de las lectinas es definida por el mejor monosacárido inhibidor. Algunos monosacáridos específicos de varias lectinas son: α -manosa frijol Fava; α -glucosa lenteja; N-acetilglucosamina germen de trigo; N-acetilgalactosamina frijol y soya; galactosa cacahuete. Aunque la mayoría de las plantas contienen lectinas (isolectinas) con un azúcar específico; varias plantas contienen dos o más lectinas que difieren en su azúcar específico.

Las lectinas de P.vulgaris son inhibidas por muy bajas concentraciones (cerca de 10nmol/ml) de un glucopéptido liberado de eritrocitos humanos por tripsina, aunque también pueden ser inhibidas por N-acetil-D-galactosamina en concentraciones 20,000 a 30,000 veces más altas que el glucopéptido (Toyoshina y col.,1972) azúcares comunmente empleados para estudios de irhibición de actividad hemaglutinante son de las forma piranosa (anillos de seis miembros).

Conclusiones de estudios especificos acerca de los sitios de unión de los azúcares de las lectinas; se refieren a que las lectinas que interactuan fuertemente con oligosacáridos tienen sitios más extensos, que las lectinas que lo hacen con monosacáridos.La fijación del azúcar a la lectina parece que involucra puentes de hidrógeno e interacciones no polares, pero no fuerzas electrostáticas.

Por otro lado, en extractos de diferentes variedades de frijoles se logra distinguir cuatro tipos de actividad hemaglutinante; con glóbulos rojos de diferentes animales :aquellos que aglutinan eritrocitos de conejo y eritrocitos tripsinizados de vaca llamados tipo A; los que aglutinan solo glóbulos rojos de conejo,llamados tipo B; los que aglutinan

solo glóbulos tripsinizados de vaca, llamados tipo C; y los que no actúan sobre ninguno de los dos glóbulos, llamados tipo D. Los extractos de tipo A y C son los más tóxicos al ser inyectados a ratas (Jaffé y Brucher, 1972).

E. Factores que Disminuyen la Actividad Hemaglutinante.

Los frijoles son importantes en los alimentos de países subdesarrollados, por ser los principales aportadores de proteína y nutrientes. Sin embargo, la presencia de factores antinutricionales en el frijol es una desventaja para el consumo de esta leguminosa. De entre los antinutrientes del frijol las fitohemaglutininas son de las más tóxicas (Pusztai y col., 1981). Por lo anterior, se han estudiado diversos tratamientos para la eliminación o disminución de fitohemaglutininas, tales como: cocimiento, remojo, germinación, e irradiación.

El conocimiento de la estabilidad térmica de las lectinas, ayuda a determinar las condiciones requeridas para su inactivación o desnaturalización. La estimación de que las lectinas son termolábiles puede no ser justificada en algunos casos (Jaffé, 1980), ya que las fitohemaglutininas del frijol pueden no ser destruidas totalmente bajo condiciones de cocimiento (Grant y col., 1982; Thompson y col., 1983); además se ha reportado que algunas lectinas soportan las condiciones del proceso del tracto digestivo. La presencia de fitohemaglutininas en alimentos preparados de frijol (*P.vulgaris*) indica que no son cocinados adecuadamente. El

22% de los alimentos preparados con frijol y maíz por amas de casa presentaron actividad hemaglutinante (Korte, 1972). Por lo anterior se sugiere que dietas de infantes no incluyan estas mezclas alimenticias. (Nachbar y Oppenheim, 1980) encontraron actividad hemaglutinante significativa en 29 de 88 productos alimenticios procesados.

Los tratamientos térmicos aplicados a frijoles tepari crudos (Phaseolus acutifolius) redujeron la actividad de la lectina hasta un 80% de la actividad inicial. En muestras tratadas a 85 °C o más alta temperatura, se observa actividad residual del 0.04-0.90%. Esta reducción dramática de la habilidad de aglutinación de las lectinas de los frijoles parcialmente cocidos, son aun niveles de actividad que pueden todavía causar problemas nutricionales (Kabbara y col., 1986). Extractos de frijoles tratados a 85 °C por 2 h presentaron actividad hemaglutinante a eritrocitos de conejo, que desapareció más rápido que la observada con glóbulos rojos de vaca activados con tripsina; por lo tanto, los extractos de frijol probados con eritrocitos de vaca que presentan actividad hemaglutinante, se dice son que mas tóxicos.

Ratas alimentadas con frijoles molidos y cocinados en agua por 2 h a 85 °C, no crecen satisfactoriamente y los extractos de sus heces presentan actividad hemaglutinante, lo

que indica que las lectinas no son destruidas totalmente bajo las condiciones mencionadas; pero se observó que el crecimiento de ratas es normal cuando son alimentadas con frijoles remojados, molidos y cocidos a 100 °C (Jaffé y Brucher, 1972). Por lo tanto, el calentamiento a temperaturas arriba de 80 °C de semillas remojadas causa una reducción continua en su actividad hemaglutinante y consecuentemente de su toxicidad.

El remojo de los frijoles generalmente forma parte del proceso de cocimiento, germinación y fermentación de los mismos. La eliminación de factores antinutricionales del frijol por remojo, depende de la temperatura y tipo de medio en el que se lleve el remojo, también depende del tipo de frijol, tiempo de remojo, y la característica de solubilidad del compuesto indeseable. Por ejemplo, el remojo del frijol (Psophocarpus tetragonolobus) en agua destilada no elimina la actividad hemaglutinante; mientras que con el remojo del frijol en un medio alcalino (2% de NaOH o KOH) se elimina completamente la actividad hemaglutinante (Sathe y Salunkhe, 1981). La actividad hemaglutinante disminuyó de un 10 a un 15% con el proceso de remojo según Lowgren y Liener (1986). Ellos reportaron también que el 90% de la actividad hemaglutinante se eliminó en frijoles tratados por 6 h a 80 °C y el 100% de inactivación en 2 h a 100 °C. La toxicidad de las semillas de frijol causada por las fitohemaglutininas

puede ser eliminada con un tratamiento a 100 °C por un mínimo de 10 min, de los frijoles completamente hidratados (Grant y col., 1982).

Sin embargo, se han encontrado algunos reportes en los que se indica que el remojo de los frijoles no reduce completamente la actividad hemaglutinante (Thompson y col., 1983). Estas investigaciones indican que tratamientos térmicos a 100 °C por 15 min o 80 °C por 2 h de frijoles remojados o cocidos a presión (15 lb/pg) por 45 min sin remojo, reducen la actividad hemaglutinante a niveles todavía detectables.

Coffey y col. (1985) reportaron que la actividad hemaglutinante es retenida en frijoles tratados a 100 °C por 10-20 min, sin embargo durante 30 min a esta temperatura es suficiente para inactivar casi todas las lectinas; por lo tanto, el tiempo de cocción es factor importante en la disminución de la actividad. La actividad hemaglutinante del frijol (Psophocarpus tetragonolobus) es estable a un tratamiento térmico en seco (100 °C por 2 h) pero puede ser destruida por un tratamiento por 5 min en autoclave a 120 °C (Tan y col., 1983). Según deMuelenaere, (1964) la resistencia térmica en seco de las lectinas recibe un énfasis especial, ya que se detecta actividad hemaglutinante después de 18 h de calor seco.

Estudios recientes de Boufassa y col., (1986) revelan que la inactivación térmica de las lectinas puras de P. vulgaris tienen un mecanismo de inactivación bifásico de primer orden, en donde el pH juega un papel importante en la velocidad de la reacción, ya que arriba de un pH 7.3 se hace lenta. Se sugieren 2 hipótesis acerca de lo antes mencionado; la primera propone que la inactivación de los tetrámeros no es en a la misma velocidad, y la segunda sugiere que el contenido de metales (Ca, Mg) aumenta la lentitud de la entrada de las fitohemaglutininas a la reacción.

Por otro lado, la germinación también contribuye a la reducción de la actividad hemaglutinante. Chen y col., (1977) reportaron reducción de la actividad hemaglutinante de 8 variedades de chícharo y frijol. Después de 4 días de germinación la reducción fue de 83.7% en Dwarf Grey; 91.9% en Early Alaska; 94.7% en Laxton Progress; y del 100 % en frijol mung y pinto. Esta reducción de la capacidad de aglutinación es probablemente debida a proteólisis de la lectina durante la germinación. La actividad hemaglutinante se destruye por hidrólisis ácida o enzimas proteolíticas tales como tripsina y pepsina . También es destruida por exposición a urea 8 M.

La irradiación sobre la actividad hemaglutinante fue estudiada por Mancini-Filho y col.(1979), así como la actividad mitogénica de las fitohemaglutininas en solución. Encontraron que es necesario una dosis de 10 Krad para el 50% de destrucción de la capacidad aglutinante; mientras que para el efecto mitogénico se requiere 7 veces más la dosis (70 Krad) para la inactivación del 50%. Una dosis de 3 Mrad no es efectiva para inactivar la hemaglutinina del frijol conteniendo arriba del 60 % de agua.

Los metales confieren alto grado de estabilidad estructural en la concanavalina A, protegiendo a la lectina contra la inactivación por calor (Doyle y col., 1976) e hidrólisis por enzimas proteolíticas (Blumberg y Tal, 1976). El efecto de los iones metálicos unidos a la concanavalina A sobre su actividad depende fuertemente del pH. Por lo tanto los iones metálicos son constituyentes de varias lectinas de productos alimenticios por lo que la eliminación de estos podría facilitar la inactivación de las lectinas de algunos alimentos.

F.-Importancia Nutricional

Algunas semillas de leguminosas crudas causan retraso en el crecimiento y algunas veces hasta la muerte cuando se incorporan en la dieta de animales. Sin embargo la toxicidad depende también de la raza y especie del animal. Honavar y col., (1962) observaron que las lectinas del frijol P. vulgaris inhibieron el crecimiento y causaron la muerte de ratas, cuando en la dieta se les dió un nivel del 0.5%. Wagh y col. (1963) notaron que el crecimiento de polluelos disminuye mucho menos que el de ratas y no detectaron muertes.

El factor tóxico del frijol común ha mostrado ser igual a su constitución de lectinas y por lo tanto, el nivel de toxicidad está directamente relacionado con el contenido de lectina y su actividad (Pusztai y Palmer, 1977). Se ha demostrado que la administración oral de lectinas de frijol a ratas, causa interferencia no específica con la absorción de nutrientes; debido a la acción de las lectinas de combinarse con el revestimiento de las células de la pared intestinal (Jaffe, 1960). Experimentos invitro con trozos de intestino de ratas alimentadas con lectinas, revelan una disminución significativa en la velocidad de absorción de glucosa a través de la pared intestinal comparado con el control (Jaffé y Camejo, 1961).

Más tarde (Eltzer y Branstrator, 1974), encontraron que diferentes lectinas que reaccionan con cavidades y bellosidades del intestino en diferentes regiones; dependiendo de la especificidad de la lectina. Las lectinas de frijol común no son inactivadas completamente después de seis días de su ingesta por acción de la pepsina (Goddard y Mendel, 1929). Se puede detectar actividad hemaglutinante en heces de ratas después de la ingesta de frijol crudo, pero no después de la ingesta de soya, por lo que indica que las lectinas de frijol son menos susceptibles a la acción de enzimas digestivas de las ratas, que las lectinas de soya. La harina de soya cruda es menos tóxica cuando se alimentan a ratas, que los frijoles crudos (Jaffé y Vegalette, 1968).

Por otro lado, un nivel de 10% de lectina en la dieta basal causa significativa disminución en las actividades enzimáticas, tales como enzimas intestinales (sucrosa, maltasa, alcalinafosfatasa, leucina aminopeptidasa y -glutamyltransferasa) y también daños serios en la mucosa intestinal de ratas. Según Thompson y col. (1986), las lectinas pueden también afectar la actividad de las enzimas, pepsina y pancreatina. Los efectos tóxicos de las lectinas del frijol Psophocarpus tetragonolobus sobre ratas esta sujeto a la acción fijadora de las lectinas a las células epiteliales del intestino e impedir la digestión y/o absorción de los nutrientes, dificultando el proceso normal de maduración de

las células epiteliales Higuchi y col.,(1984).El mecanismo de la toxicidad por ingesta de lectinas de frijol P.tetragonolobus involucra su unión a la superficie de la pared del intestino delgado,provocando disturbios en la estructura funcional de la membrana de la pared Kimura y col.,(1986).

La presencia de las lectinas de P.vulgaris en la dieta afecta el grosor y morfología microscópica del intestino.A nivel estructural las fitohemaglutininas se unen a los bordes de las células epiteliales,causando desorganización grave en los microbellos del epitelio y a medida de que los enterocitos se van haciendo anormales son liberados hacia la luz del intestino (Lorenzonn y Olsen,1982).Animales alimentados con lectinas purificadas sufren alteraciones en el epitelio del yeyuno proximal,posiblemente como resultado de una modulación en el contenido de proteína de la membrana del epitelio y cambios en el plasma de la membrana.Lo anterior resulta de un cambio en la permeabilidad de la luz del plasma de la membrana. Como ya se mencionó antes las fitohemaglutininas son resistentes a la digestión proteolítica y debido también a su alta reactividad química pueden combinarse con componentes de la digestión y unirse a células del intestino (Rossi y col.,1984).Las lectinas en la dieta pueden tener más serios problemas con respecto al crecimiento y muerte; que proteínas alimentarias que son

alergénicas o antígenicas (Pusztai y col.,1986).La característica de las lectinas de su resistencia en vivo a enzimas digestivas,marca la toxicidad de las fitohemaglutininas administradas oralmente (Sathe y Salunkhe,1984).Se observó, que la utilización de algunos aminoácidos es afectada por bajas concentraciones de hemaglutininas en ingesta de frijoles mal o insuficientemente cocidos y es demostrado por una reducción en la excreción de azufre en la orina (Korte,1973b).

La característica mas relevante de la toxicidad nutricional de las lectinas del frijol es la aparente inutilización del nitrógeno de la dieta y el aumento de la velocidad del catabolismo del tejido.Resultados de experimentos de balance de nitrógeno en ratas mostraron claramente que aumentan las pérdidas de nitrógeno fecal y urinario (Pusztai y col.,1981).Se puede asumir que las pérdidas de nitrógeno endógeno es resultado de un acelerado recambio de las células del intestino delgado.La unión de lectinas de frijol común también afecta directamente la absorción de dipéptidos (absorción de nitrógeno exógeno) a través de las células epiteliales del intestino, por inhibición directa de la dipeptidasa involucrada en el transporte de aminoácidos (Pusztai y col.,1981).Los efectos de las lectinas sobre la absorción de nitrógeno,se pueden medir mediante la inhibición de la enterokinasa unida a la

membrana de las células epiteliales, la cual activa los zimógenos de enzimas proteolíticas segregadas por el páncreas (Rouanet y col., 1983).

La toxicidad de las lectinas de semillas de leguminosas es una interacción entre la lectina y las agliconas de las glucoproteínas de las células epiteliales, siendo múltiples las consecuencias:

- 1.- Erosión y disminución de los microvellos (Sotelo y col., 1983).
- 2.- Citotoxicidad dando lugar a atrofia del bello (Hara y col., 1983).
- 3.- Fijación sobre hidrolasas de células epiteliales (Triadou y Audran, 1983) e inhibición de su actividad (Rouanet y col., 1983). 3).
- 4.- Adhesión a bacterias entéricas de la superficie mucosa (Benwell y col., 1983)
- 5.- Como agentes deteriorantes de la estructura y biología de la mucosa intestinal (Rouanet y col., 1985).
- 6.- Inducen una baja de alimento (Rouanet y col., 1985).
- 7.- Acarrean desórdenes nutricionales que impiden el crecimiento (Rouanet y col., 1985).

Lo anterior es sugerido para ratas alimentadas con

dietas que incluyen fitohemaglutininas.

Por otra parte, se han observado algunos casos de intoxicación de humanos por ingesta de frijoles crudos o parcialmente cocidos. Griebel, (1950) reportó un brote de envenenamiento masivo después del consumo de frijol parcialmente cocido. Más recientemente, varios casos de intoxicación en humanos por frijol comun son descritos en Gran Bretaña, Anonymous, (1976). Korte, (1972) reportó que las lectinas no son destruidas por cocimiento en mezclas de frijol y cereal en Africa; y como consecuencia, hay resultado de niños con diarrea, vómito y escaso crecimiento.

IV.- Materiales y Metodos.

A.- Materiales.

Las variedades de frijol común (Phaseolus vulgaris L.) con las que se realizó este trabajo se obtuvieron dentro del proyecto compartido con el Centro de Investigaciones Agrícolas de El Bajío (CIAB) y son las siguientes: 1.- Variedad flor de mayo criollo (progenitora). 2.- Variedad flor de mayo mejorada (descendiente de la variedad criolla) resistente al virus del mosaico común. Estos materiales fueron cosechados en el campo experimental del CIAB en Irapuato, Gto. y se almacenaron a 5 °C en recipientes de plástico sellados.

B.-Métodos.

1.- Tratamiento de las semillas.

Las semillas se sometieron a limpieza y posteriormente a molienda. La molienda se realizó en un molino de ciclón (UD), malla 100, y la harina del frijol ya molido se guardó en recipientes herméticamente cerrados en refrigeración.

2.- Prueba de peso de 100 semillas.

Se determinaron por triplicado los pesos de 100 semillas seleccionadas al azar de cada material.

3.- Peso hectolítrico.

Esta determinación se realizó en una balanza de peso específico marca Ohaus. Para esto se llenó un recipiente de un litro con la semilla a evaluar y se determinó su peso en la balanza citada. El valor obtenido se reportó en Kg/Hl.

4.- Dimensiones.

La longitud (l), anchura (a) y grosor (g) fueron medidos en 25 semillas seleccionadas al azar para cada variedad utilizando para ello un vernier.

5.- Análisis Proximal.

Se realizaron las determinaciones características para conocer la composición del material. Estas fueron: humedad, proteína, grasa, ceniza y fibra cruda efectuadas de acuerdo a los métodos de la A.O.A.C. (1980) y de la A.A.C.C. (1978).

5a.- Humedad.

Método 14.004 de la A.O.A.C. y 44.15 de la A.A.C.C.

Se calculó la pérdida de peso que sufre la muestra al

ser calentada, debido a la materia volátil expulsada a la temperatura utilizada en la prueba. Se usó 1 g de muestra y una temperatura de $130 \pm 3^\circ\text{C}$ por 1 h en una estufa con circulación de aire.

5b.- Proteína.

Método 14.026 de la A.O.A.C. y 46.12 de la A.A.C.C.

El porcentaje de proteína cruda se calculó a partir del nitrógeno total utilizando un factor de 6.25. En la determinación del nitrógeno total se usó el método Kjeldhal y se realizó en las unidades de digestión y destilación del sistema kjeltec (modelos 1007 y 1002, TECATOR, Suecia). La digestión se realizó con ácido sulfúrico y la destilación con hidróxido de sodio, recibiendo el destilado en una solución de ácido bórico al 4%. Finalmente en la titulación se utilizó una solución valorada de ácido clorhídrico.

5c.- Grasa.

Método 14.019 del A.O.A.C. y 30.25 de la A.A.C.C.

La determinación del extracto etéreo se efectuó de acuerdo al método de soxhlet en el sistema soxtec (modelo 1043, TECATOR, Suecia). Se extrajeron 2 g de muestra en un sistema de extracción cíclica los compuestos solubles en el disolvente usado; en este caso se empleó éter etílico

5d.- Fibra Cruda.

Método 14.020 de la A.O.A.C. y 32.10 de la A.A.C.C.

Se realizó en el sistema Labconco molido 30001. Primero se hirvió 1 g de muestra en ácido sulfúrico al 1.25% y después en hidróxido de sodio al 1.25%. El residuo obtenido se lavó con alcohol, se llevó a sequedad hasta peso constante y posteriormente se incineró. La diferencia entre el peso del residuo seco y el residuo incinerado corresponde a la cantidad de fibra cruda presente en la muestra.

5e.- Cenizas.

Método 14.06 de la A.O.A.C. y 8.01 de la A.A.C.C.

La determinación corresponde a las cenizas obtenidas al calcinar una muestra a temperatura aproximadamente de 600°C. Se calculó a partir de la incineración de 1 g de muestra en la mufla a 600°C por 4 h.

6.- Determinación de color.

La determinación del índice de color se realizó en el clorímetro Hunter Lab (modelo D25 D2A, Hunter Associates, EU) utilizando como estándar el color blanco de valores L , a y b definidos ($L = +91.2$, $a = -1.0$, $b = -1.7$). Cerca de 100 gramos de semillas se colocaron en un recipiente de vidrio (caja de petri delgada) evitando la

pérdida de luz durante las mediciones. Para compensar los efectos de la superficie irregular las lecturas de las muestras se hicieron rotando 3 veces la caja con ángulos de 90° en cada giro y haciendo nuevamente la lectura. El aparato debe ajustarse inicialmente con el estandar negro y dejarse calentar un tiempo razonable (aprox. 30 min) antes de iniciar las mediciones. A partir de los valores Hunter L , a y b , obtenidos se calculan ΔE , ΔC y ΔE define el color total de un objeto y se calcula a partir de los tres valores Hunter, como la raíz cuadrada de la suma de las diferencias L , Δa y Δb al cuadrado; estas diferencias son entre el valor correspondiente al color del mosaico que se usa como estandar.

El índice ΔC , se refiere únicamente a la cromaticidad y se calcula solo a partir de los valores a y b Hunter con la raíz cuadrada de la suma de las diferencias Δa y Δb al cuadrado.

7.- Absorción de Agua

Cien semillas intactas (no dañadas) de las dos variedades de frijol en estudio se remojaron en tres volúmenes adicionales de agua destilada a temperatura ambiente ($25 \pm 2^{\circ}C$). A intervalos de tiempo de dos horas los frijoles remojados se drenaron y pesaron; este

experimento se hizo por triplicado. Los g de agua absorbida por 100 g de muestra durante el remojo se determinaron por ganancia en peso a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Absorción de agua} = \frac{\text{peso frijol húmedo} - \text{peso frijol seco}}{\text{peso frijol seco}} \times 100$$

8.- Tiempo de Cocción

El tiempo de cocción se determinó utilizando un equipo para medición de textura de frijol tipo Mattson, de 25 agujas, con peso de agujas de 64.8 ± 0.05 g y con una punta de 2mm de diámetro. El tiempo de cocción se estableció cuando 18 agujas atravesaron cada una el grano de frijol correspondiente; esto equivale a 72% de frijoles cocidos. Esta prueba se hizo por duplicado.

9.- Determinación del nivel de Lectinas in situ (Actividad Hemaglutinante de Frijoles Crudos y Cocidos)

Para frijoles crudos la extracción de lectinas se hizo como se mencionó previamente. En el caso de frijoles cocidos, primero se remojaron 16 h con agua destilada y se cocieron sin el agua de remojo, en vasijas de barro semitapadas, se adicionó agua caliente para mantener constante el volumen de agua durante la cocción. El tiempo de cocción fue de 86 min y se determinó con

previa curva de cocimiento. Los frijoles cocidos con el caldo de cocción se congelaron y liofilizaron; posteriormente se molieron en un molino de ciclón (UD) con malla 100, y la extracción de las fitohemaglutininas se hizo como se describirá posteriormente. La cuantificación de la actividad hemaglutinante se realizó en el extracto de lectinas de frijoles crudos y cocidos como se menciona más adelante.

10.- Extracción de lectinas.

Se realizó con solución salina amortiguadora de fosfatos, pH 7.4, en una relación de 1:25 w/v . La muestra se homogeneizó en un equipo marca Ultraturrax a velocidad máxima y posteriormente se dejó toda la noche en agitación a 4°C. Después se centrifugó 40 000 x g por 30 min a 4°C. En el sobrenadante se obtuvo el extracto de lectinas. (Feisted y col.,1975; Feisted y col., 1981; Thompson y col., 1983). Al sobrenadante se le determinó proteína por el método de Kjeldahl y multiplicado por el factor 6.25.

11.- Preparación de eritrocitos de conejo tripsinizados y tratados con glutaraldehído.

Por punción cardíaca se sacaron aproximadamente 2 a 3 ml de sangre a un conejo, y se recibieron en una solución anticoagulante (con citrato de sodio, formaldehído 37%, solución salina 0.9%). Después se procedió a una serie de lavados con solución NaCl 0.9%. Los eritrocitos se resuspendieron en una solución salina amortiguadora de fosfatos y se llevaron a una absorbancia de 2.0 a una longitud de onda de 620 nm. La suspensión de eritrocitos se incubo a 37°C con tripsina al 1% por 30 min. Se continuó con una serie de lavados con solución salina al 0.9%. El paquete de eritrocitos se llevó a una absorbancia de 1.0 a 620 nm en una solución de NaCl al 0.9%; a esta suspensión se le agrego glutaraldehído al 25% y después se lavaron varias veces los eritrocitos. Finalmente se hizo una suspensión de eritrocitos al 2% v/v y esta fué la suspensión de trabajo (Lis y Sharon, 1972; Turner y Liener, 1975).

12.- Cuantificación de Actividad Hemaglutinante

Del extracto de lectinas se hicieron diluciones seriadas (1:2, 1:4, 1:8,etc.) en placas de microtitulación de fondo cónico (Dynatech Laboratores Alexandria, Virginia, USA) y se agrego un volumen de 0.05 ml de la

suspensión de eritrocitos al 2% para un volumen final de 0.1 ml. Se hicieron blancos con solución salina fosfatos y suspensión de eritrocitos al 2%; todos los tubos fueron agitados por igual. Después se dejó en reposo por dos horas y entonces se tomó la lectura de la última dilución que presentó aglutinación. En los blancos se observó sedimentación completa de los eritrocitos pudiéndose ver un botón de eritrocitos en el fondo de la placa de microtitulación. En donde el título de hemaglutinación es el recíproco de la dilución seriada.

12a.-Formas de Reportar en Diversas Unidades la Actividad Hemaglutinante.

Se han reportado diversas maneras de expresar la aglutinación que presentan las fitohemaglutininas del frijol. Algunas de estas formas son; Valdebouze y col.(1980) reportaron una unidad de hemaglutinación como la cantidad de muestra necesaria para la aglutinación bajo condiciones de prueba y expresaron la actividad hemaglutinante en unidades de hemaglutinación por mg de muestra. Según Felsted y col.(1981) el título de hemaglutinación se definió como el recíproco de la dilución seriada que precede inmediatamente al primer botón de células no-aglutinadas, y reportaron en título de eritroaglutinación por mg de proteína. Por otra parte, Pusztai y col.(1981) expresaron la actividad

específica como unidades de hemaglutinación (UH) por mg de material, donde una unidad de hemaglutinación del material se tomó como la cantidad de proteína/ml en el último tubo que dió aglutinación. Grant y col.(1983) definieron una unidad de actividad hemaglutinante (UH) como la cantidad de material/ml en la última dilución que da aglutinación visualizada al microscopio después de 16 h de reposo, y reportan como cantidad de material/ml necesario para tener una unidad de hemaglutinación (UH). Otra forma de reportar la actividad hemaglutinante es el recíproco de la dilución mas alta que dió aglutinación y se expresa en unidades de hemaglutinación (UH)/g muestra seca,(Thompson y col.,1983).En el Cuadro 2 se describen algunas de las formas de expresión de la actividad hemaglutinante. Estos valores son válidos para extractos de lectinas con la relación 1:25 de peso de harina de frijol a volumen del agente extractante que en este caso es la solución salina fosfatos ph 7.4; el material extraído después de ser centrifugado (sobrenadante) se ajustó con este mismo agente extractante a una concentración de proteína de 5mg/ml.Esta proteína se determinó aquí por microKjedahl.

Cuadro No. 2 Formas de reportar en diversas unidades de actividad hemaglutinante

| <u>A^a/</u> Título de hemaglutinación | <u>B^b/</u> mg proteína/ml | <u>Formas de Expresión</u> | |
|---|---|--|--|
| | | <u>C^c/</u> Unidades de hemaglutinación/ mg proteína | <u>D^d/</u> Unidades de hemaglutinación/ g harina ^e /seca |
| 2 | 2.5 | 4 | 283 |
| 4 | 1.25 | 8 | 566 |
| 8 | 6.3×10^{-1} | 16 | 1131 |
| 16 | 3.1×10^{-1} | 32 | 2263 |
| 32 | 1.6×10^{-1} | 64 | 4525 |
| 64 | 7.8×10^{-2} | 128 | 9051 |
| 128 | 3.9×10^{-2} | 256 | 18101 |
| 256 | 1.9×10^{-2} | 512 | 36202 |
| 512 | 9.8×10^{-3} | 1024 | 72404 |
| 1024 | 4.9×10^{-3} | 2048 | 14809 |
| 2048 | 2.4×10^{-3} | 4096 | 289618 |
| 4096 | 1.2×10^{-3} | 8192 | 579235 |
| 8192 | 6.1×10^{-4} | 16384 | 1.16×10^6 |

Cuadro 2. continuación

| A ^{a/} Título de hemaglutinación | B ^{b/} mg proteína/ml | Formas de Expresión | |
|---|-----------------------------------|---|--|
| | | C ^{c/} Unidades de hemaglutinación mg proteína | D ^{d/} Unidades de hemaglutinación/ g harina ^{e/} seca |
| 16384 | 3.1×10^{-4} | 32768 | 1.32×10^6 |
| 32768 | 1.5×10^{-4} | 65536 | 4.63×10^6 |

- ^{a/} Título de hemaglutinación es el recíproco de la última dilución en la cual se observa actividad hemaglutinante (Thompson y col., 1983).
- ^{b/} Aquí se indica la cantidad de mg de proteína/ml necesarias para dar una sola unidad de actividad hemaglutinante. La proteína se extrajo con solución salina fosfatos y se determinó con microKjeldah (Grant y col., 1983).
- ^{c/} Se reporta aquí en unidades de hemaglutinación/mg proteína que corresponden a la última dilución en la cual se presenta actividad aglutinante. Es decir, una unidad hemaglutinante es la cantidad en mg de proteína necesaria para que ocurra aglutinación en la última dilución (Valdebouze y col., 1980).
- ^{d/} La actividad hemaglutinante se expresa como el recíproco de la dilución más alta que da aglutinación, y se reporta en unidades de hemaglutinación/mg de harina seca (Thompson y col., 1983).
- ^{e/} Harina de frijol integral.

13.-Tratamiento Térmico de Lectinas Extraídas del Frijol

Extractos de lectina de ambas variedades bajo estudio, fueron estandarizados con la misma solución extractante (solución salina fosfatos) a la misma concentración de proteína (5mg/ml) a partir del nitrógeno total de Kjeldahl por el factor 6.25. También fueron ajustados a pH 7.4. Se tomó 1 ml del extracto de lectinas en tubos de vidrio de 10x100 tapados con un tapon de hule. Se introdujeron en un baño Maria. Las temperaturas de cada tratamiento fueron 65,70,75,80,85 °C (Boufassa y col.,1986). Después de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 y 60 min a cada temperatura específica se sacaron los tubos correspondientes y se congelaron con nitrógeno líquido hasta su posterior análisis. A continuación se determinó el nivel residual de actividad hemaglutinante.

14.- Análisis Estadístico

Cuando se consideró apropiado los resultados fueron analizados por la prueba de Duncan.

V.-Resultados y Discusión

A.-Propiedades Físicas

1.- Prueba de Peso

Se reportan en la Figura 1 los datos de las evaluaciones físicas realizadas para las dos variedades bajo estudio. Estas evaluaciones son peso hectolitrico y peso de 100 semillas. En la prueba de peso hectolitrico se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las variedades Flor de Mayo Criollo (FM-C) y la Flor de Mayo Mejorado (FM-RMC), reportandose valores más pequeños para esta última. La determinación de peso hectolitrico ha sido indicadora de la calidad comercial del grano. Esta prueba puede depender de entre otros factores, la forma de acomodo de las semillas en el espacio correspondiente a esta prueba; tiene la ventaja de ser una determinación rápida. También recibe esta prueba el nombre de peso específico, el cual se define como el peso de las semillas que ocupan un volumen determinado.

En la determinación del peso de 100 semillas se obtuvieron valores de 28 a 30g. Aquí la variedad con mayor peso por semilla fue la Flor de Mayo Criollo (Figura 1). Hay reportes en los cuales relacionan el tamaño y peso del grano con su contenido de proteína. Ente caso, se observó que el tamaño y el peso del Flor de Mayo Criollo fueron más grandes y su contenido de proteína menor que el del Flor de Mayo Mejorado.

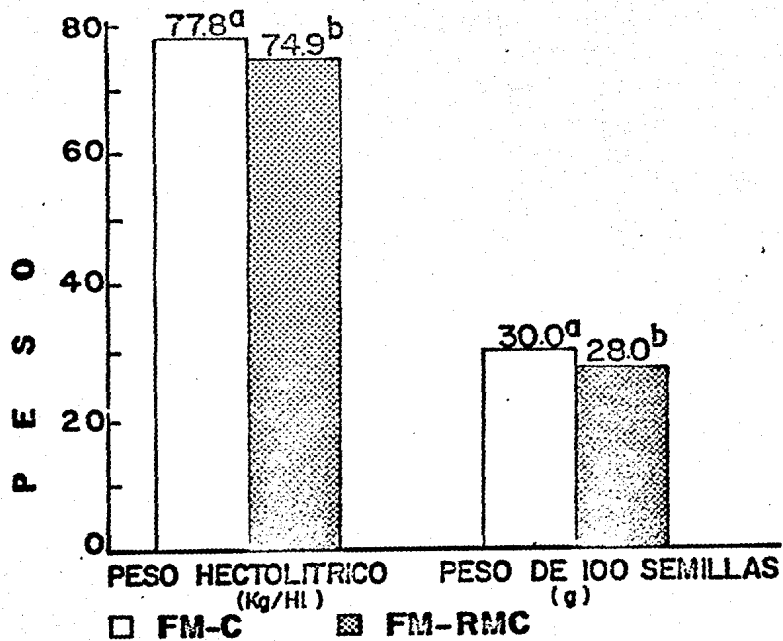


Figura 1. Peso hectolitrico y peso de 100 semillas de las semillas de dos materiales de frijol común. FM-C = Flor de Mayo Criollo; FM-RMC = Flor de Mayo resistente al mosaico común. (letras diferentes indican que los resultados son significativamente diferentes $P \leq 0.05$).

2.- Dimensiones de las Semillas

Esta prueba es importante para conocer la anatomía de las semillas de frijol y su relación con características físicas y químicas (Sefa-Dedeh y Stanley,1979). En la Figura 2 se especifican cada una de las dimensiones medidas para las variedades bajo estudio. Para la variedad Flor de Mayo Criollo se observó valores mayores a los de FM-RMC con respecto a largo y ancho, pero no ocurre lo mismo en el grueso siendo menor este valor para la variedad Criollo (Figura 3).

Esta prueba al igual que la de peso hectolitrico tiene importancia comercial por estar relacionadas directamente con el manejo transporte y almacenamiento, de granos y semillas.

3.- Medición del Color en Semillas de Frijol

Esta determinación indica que hay diferencias significativas de color entre las variedades; a pesar de su similitud de color, se puede observar en la Figura 4 que la variedad Flor de Mayo Mejorada tien valores mayores de ΔE (color total) y ΔC (cromaticidad). Por lo tanto la variedad Flor de Mayo Mejorada es mas colorida que la Flor de Mayo Criollo con respecto al estandar utilizado.

PRINCIPALES DIMENSIONES DE UNA SEMILLA DE FRIJOL

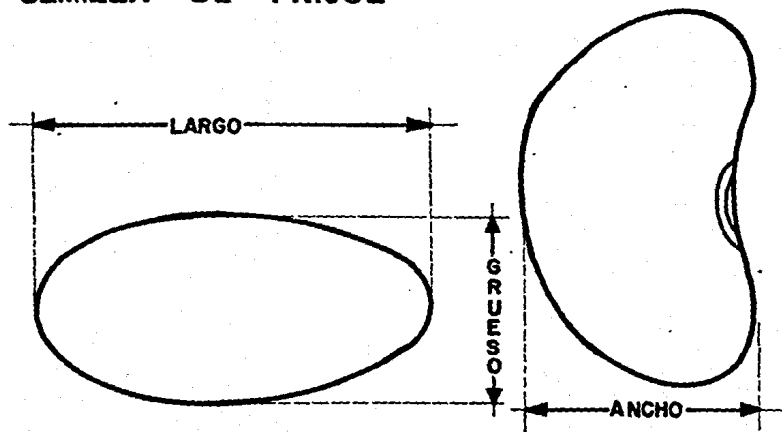


Figura 2. Dimensiones de las semillas de frijol que fueron medidas.

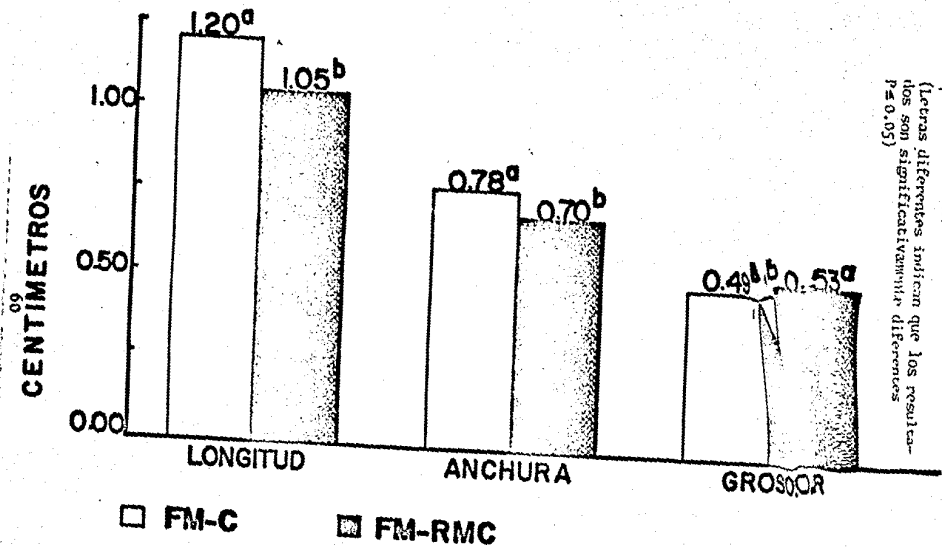


Figura 3. Dimensiones físicas de las semillas de dos materiales de frijol común. FM-C = Flor de Mayo Criollo; FM-RMC = Flor de Mayo resistente al mosaico común. (Letras diferentes indican que los resultados son significativamente diferentes $P \leq 0.05$)

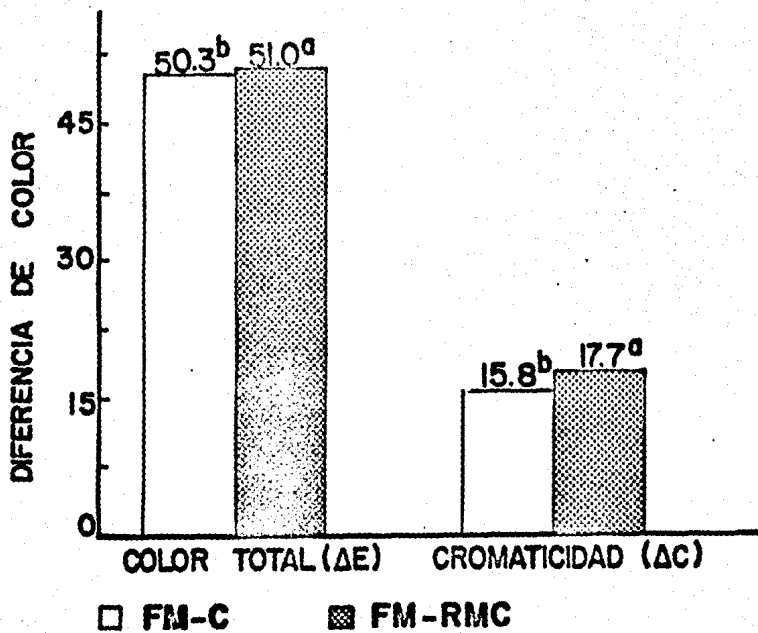


Figura 4. Diferencias de color (E) y cromaticidad (C) (Hunter-Lab) de las semillas de dos materiales de frijol común.
 FM-C = Flor de Mayo Criollo; FM-RMC = Flor de Mayo resistente al mosaico común.
 Letras diferentes indican que los resultados son significativamente diferentes $P \leq 0.05$

La prueba es importante desde el punto de vista de marcar las diferencias o similitudes de color existentes entre la variedad mejorada genéticamente y su progenitor criollo.

B.- Análisis Proximal

Los resultados sobre la composición de los materiales se presentan en el Cuadro 3. Se puede observar que la variedad Flor de Mayo Mejorada (FM-RMC) presentó mayor contenido de proteína (N x 6.25) que la variedad Criollo siendo estos valores de 23.2 y de 22.5%, respectivamente.

En cuanto a los valores de grasa (extracto etereo) se observó una diferencia del 0.6% entre las variedades, teniendo mas grasa el Flor de Mayo Criollo. El material con valores mas altos en humedad y fibra cruda correspondieron al FM-C. No se observaron diferencias en el contenido de cenizas para ninguna variedad (Arroyo-Figueroa,1986).

Cuadro 3. Composición proximal^{1/} de las semillas maduras de dos variedades de frijol común (Phaseolus vulgaris L.).

| Componente (%) | Variedades | |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Flor de Mayo Criollo | Flor de Mayo RMC |
| Humedad (base húmeda) | 11.7 ± 0.1 ^a | 10.9 ± 0.1 ^b |
| Proteína (Nx6.25) | 22.5 ± 0.2 ^b | 23.2 ± 0.3 ^a |
| Grasa (extracto etéreo) | 1.5 ± 0.2 ^a | 0.9 ± 0.1 ^b |
| Fibra cruda | 4.9 ± 0.1 ^a | 4.2 ± 0.1 ^b |
| Ceniza | 4.9 ± 0 ^a | 4.9 ± 0.1 ^a |

^{1/} Los datos mostrados son medias de triplicados ± desviación estándar, base seca a menos que se especifique otra cosa. Se usaron métodos oficiales de análisis (AOAC, 1980; AACC, 1983).

Dentro de cada componente, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $P \leq 0.05$, por la prueba de Duncan.

C.-Comportamiento Funcional

1.- Absorción de Agua

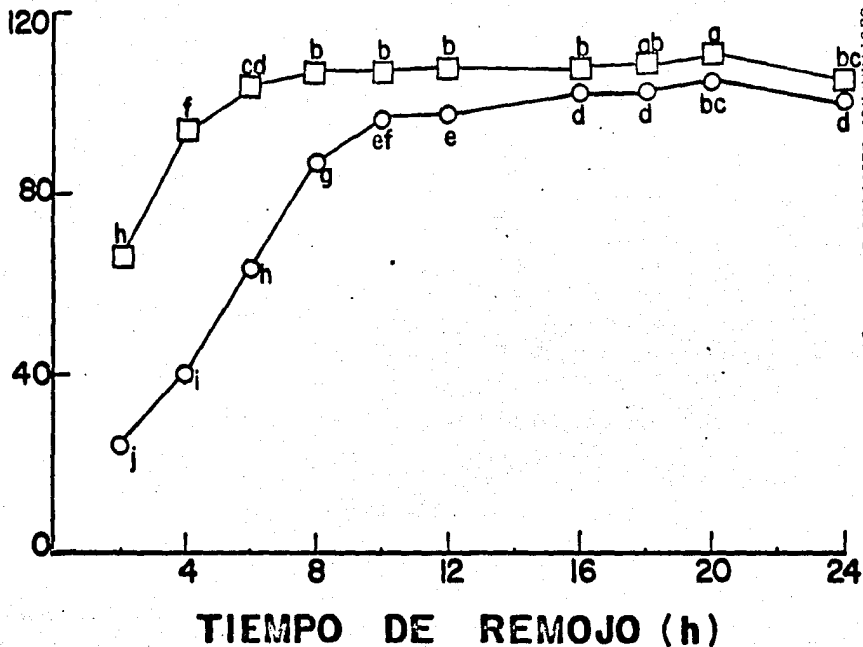
Un parámetro funcional evaluado en las dos variedades bajo estudio fue la absorción de agua, con la cual se pudo observar que el frijol Flor de Mayo Mejorado tuvo mayor capacidad de absorción de agua en menos tiempo que el frijol Flor de Mayo Criollo Figura 5. También en el total de agua absorbida se pudo ver que el frijol Flor de Mayo Mejorado (FM-RMC) fue superior en cualquier tiempo de remojo al Flor de Mayo Criollo (FM-C). A partir de las 16 hs de remojo los valores para ambas variedades estuvieron muy próximos (Deshpande y col.,1984).

Cabe mencionar que aunque las características físicas de tamaño son menores para el FM-RMC, esto sugiere que esta variedad podría tener en algunos casos un comportamiento funcional más satisfactorio.

3.- Tiempo de Cocción

La curva de cocimiento para los materiales Figura 6 revela que hay diferencias significativas en los valores de porcentaje de frijoles cocidos con respecto a un tiempo de cocción determinado, siendo mayor el porcentaje de frijoles cocidos para la variedad Flor de Mayo Mejorado (FM-RMC) en un tiempo correspondiente.

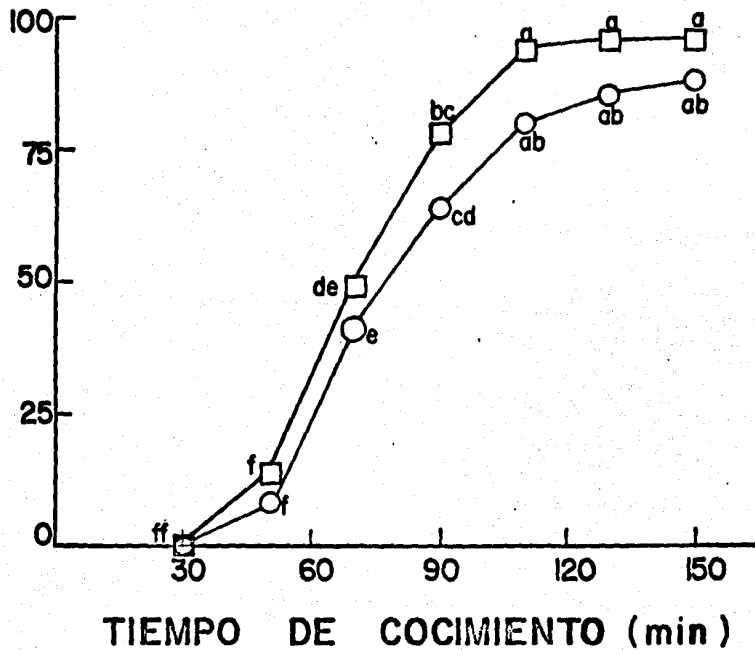
59
ABSORCION DE AGUA (%)



○ FLOR DE MAYO CRIOLLO (FM-C)
□ FLOR DE MAYO RMC (FM-RMC)

Figura 5. Curvas de absorción de agua de las semillas de dos materiales de frijol.
RIC = Resistente al mosaico común.
(Letras diferentes indican que los resultados son significativamente diferentes $P \leq 0.05$).

FRIJOLES COCIDOS (%)



- FLOR DE MAYO CRIOLLO (FM-C)
 □ FLOR DE MAYO RMC (FM-RMC)

Figura 6. Curvas de cocimiento de semillas de frijol oblicuo mediante un aparato cocedor diseñado para el efecto. Temperatura ebullición 95°C.
 RMC = Resistente al mosaico común.
 (Letras diferentes indican que los resultados son significativamente diferentes $P \leq 0.05$).

Desde el punto de vista comercial es marcadamente importante esta diferencia , pues esto implica un ahorro de tiempo y combustible para las amas de casa. Debe recordarse que menores tiempos de cocción representan un fuerte atributo de calidad de frijol (Kon,1979). Estas indicaciones del comportamiento de los frijoles al cocerse, se hizo de manera objetiva con equipo de cocción tipo Mattson.

D.- Disminución de la Actividad Hemaglutinante en el grano de Frijol por el Cocimiento

En el Cuadro 4 se muestra que los tratamientos térmicos no inactivaron completamente las fitohemaglutininas; donde se observó que hubo un 0.80% de actividad hemaglutinante residual. Como se menciona en la literatura (Kabbara y col.,1986; Kadam y col.,1987) un nivel del 0.04-0.87% de la actividad hemaglutinante residual sugiere que puede haber problemas nutricionales, aunque esto aún no está probado. Es decir, sería deseable entender la razón por la cual en ciertos casos no todas las lectinas se inactivan por el tratamiento térmico. Mas aún, sería igualmente importante establecer el papel antinutricional que estas lectinas residuales puedan ejercer después de su consumo.

Cuadro No. 4. Niveles de actividad hemaglutinante^{a/} en frijoles crudos y cocidos y porciento de disminución de la actividad hemaglutinante por efecto del cocimiento.

| <u>Variedad</u> | <u>Sin centrifugar^{b/}</u> | | <u>% Disminución de actividad hemaglutinante</u> |
|-----------------|-------------------------------------|---------|--|
| | Crudos | Cocidos | |
| FMC-86 | 1.15x10 ⁶ | 7465 | 99.2 |
| FM-M-86 | 2.32x10 ⁶ | 16165 | 99.2 |
| | <u>Centrifugado^{b/}</u> | | |
| FM-C-86 | 1.15x10 ⁶ | 467 | 99.9 |
| FM-M-86 | 2.32x10 ⁶ | 253 | 99.9 |

^{a/} Unidades de hemaglutinación/g harina seca, según Thompson y col., 1983

^{b/} El método descrito en el capítulo de Materiales y Métodos se aplicó aquí sin el efecto de la centrifugación.

Por otra parte, observando los resultados de la actividad hemaglutinante en extractos de frijoles cocidos centrifugados y no centrifugados; podemos ver que no hay cambios en la actividad hemaglutinante por efecto de la centrifugación en extractos de frijoles crudos, pero si se observó una disminución en la actividad hemaglutinante por efecto de la centrifugación de los extractos de frijoles cocidos. Por lo anterior se podría sugerir que las fitohemaglutininas de los frijoles cocidos tiene actividad aunque de alguna forma están insolubles y por consiguiente se eliminan con la centrifugación.

E.- Efecto de los Tratamientos Térmicos sobre la Actividad Hemaglutinante, de Lectinas Aisladas.

En las Figuras 7-11 se observó que el nivel de actividad hemaglutinante de las lectinas aisladas para la variedad mejorada (FM-RMC) es mayor que el nivel de actividad hemaglutinante para el FM-C. Estos hallazgos, concuerdan con los resultados obtenidos por Guevara-Lara, (1987). Este investigador encontró mayores niveles de lectinas en el material mejorado que el criollo correspondiente; empleando tanto microtitulación (actividad hemaglutinante) como el de cromatografía de afinidad.

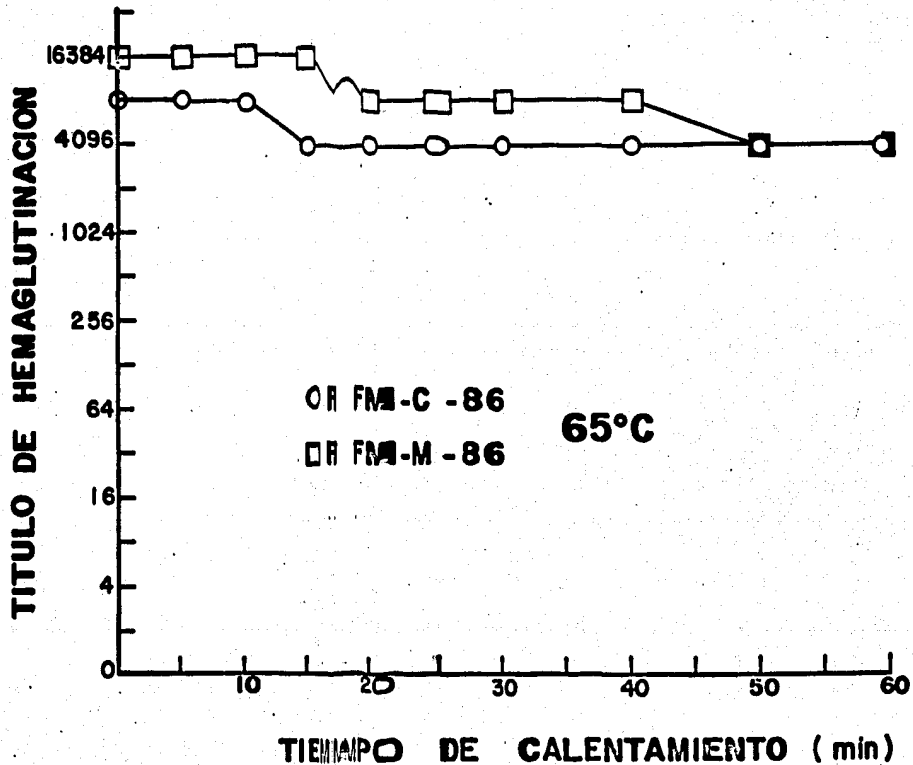


Figura 7. Curva de inactivación de fitohemaglutininas de dos materiales de Frijol a 65°C durante 60 min.

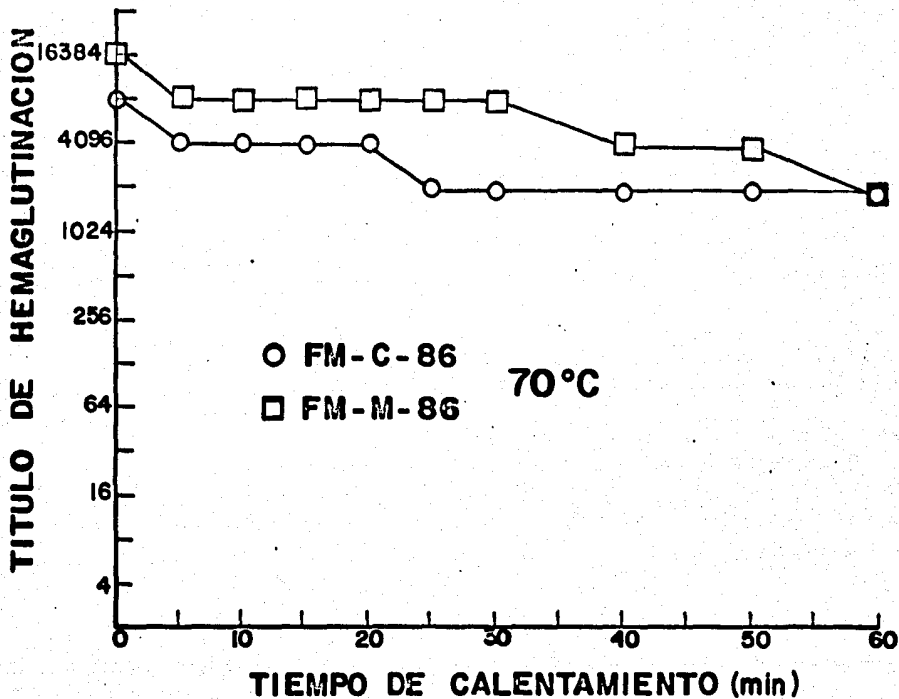


Figura 8. Curva de inactivación de fitohemaglutininas de dos materiales de frijol a 70°C durante 60 min.

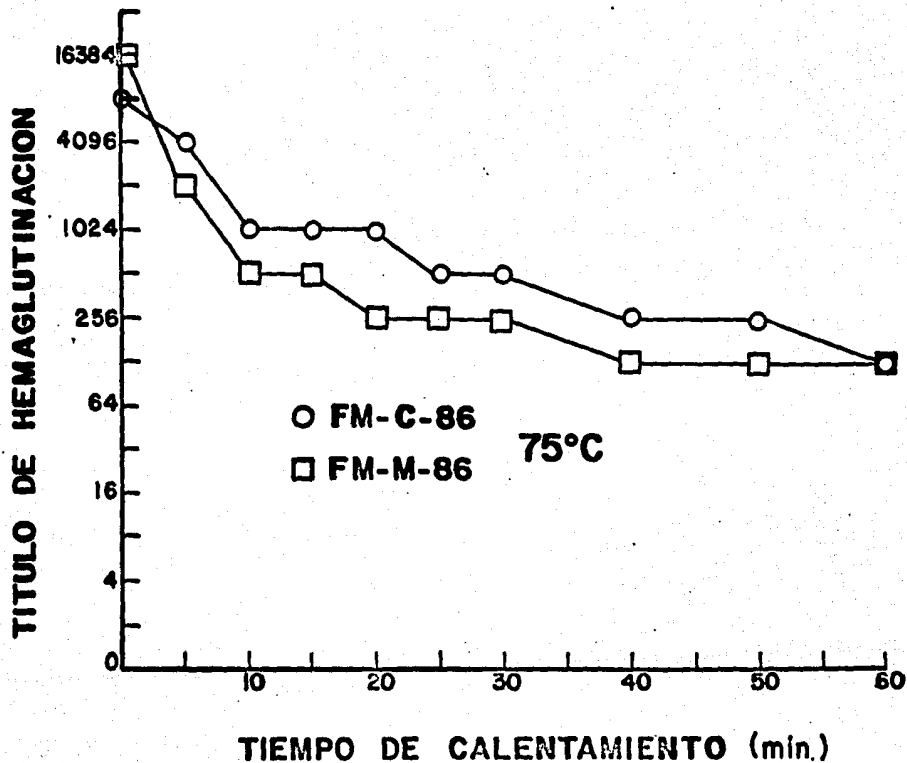


Figura 9. Curva de inactivación de Fitohemaglutinación de dos materiales de frijol a 75°C durante 60 min.

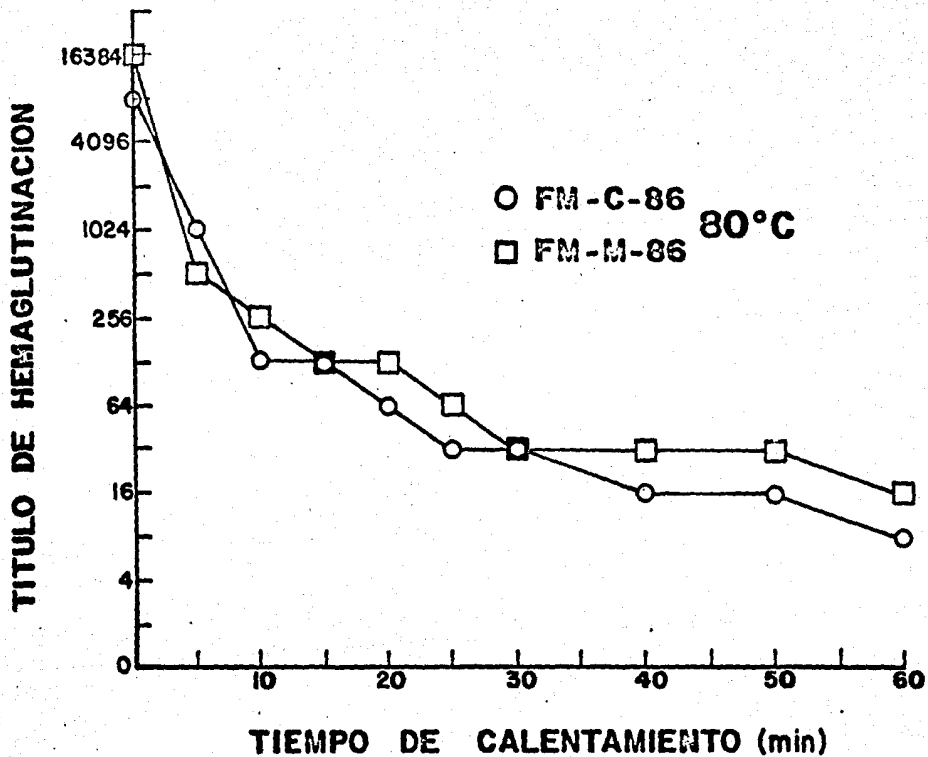


Figura 10. Curva de inactivación de fitohemaglutinación de dos materiales de frijol a 80°C durante 60 min.

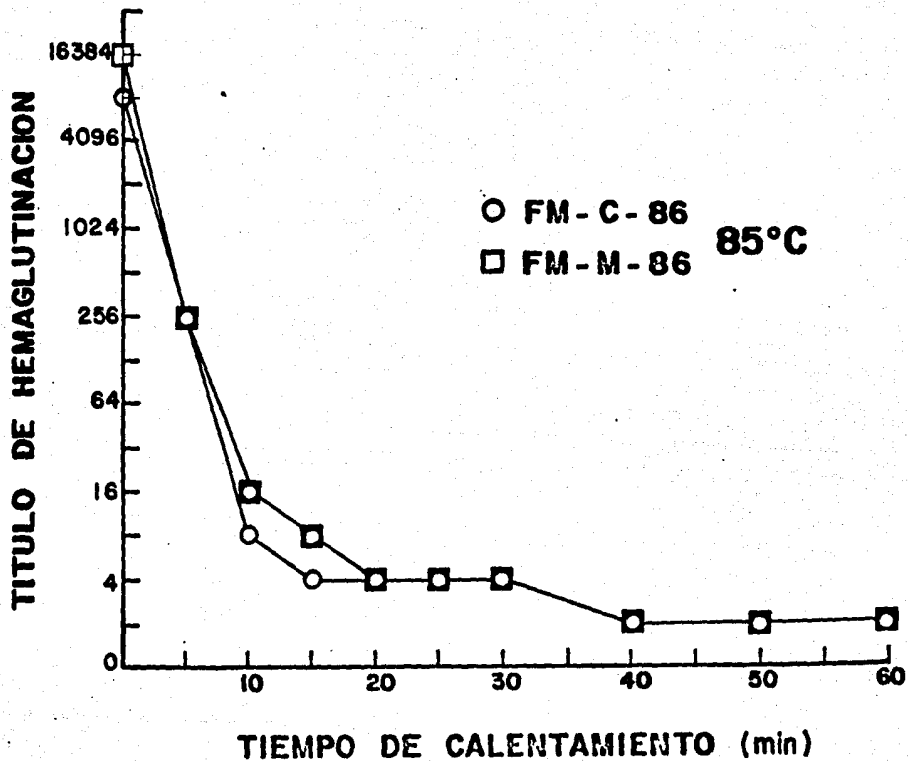


Figura 11. Curva de inactivación de fitohemaglutinación de dos materiales de frijol a 85°C durante 60 min.

A las temperaturas de 65 y 70 °C de los tratamientos térmicos se encontró que para ambos materiales hubo una disminución muy pequeña en la actividad hemaglutinante Figura 7 y 8.

Se encontró que a más altas temperaturas hubo un decremento sensible en el nivel de estas hemaglutininas Figura 9-11. Fué evidente que a los 75,80 y 85 °C para un tiempo dado de calentamiento (por ejemplo 10 min) el material FM-RMC alcanzó niveles de hemaglutinación del frijol criollo, a pesar de que el Flor de Mayo Mejorado presentó lecturas iniciales notablemente mayores. Es decir, estos resultados sugieren que la actividad hemaglutinante de la variedad mejorada decrece más rápidamente, en circunstancias dadas del tratamiento, que la del material criollo.

En la Figura 12 se agruparon los efectos de todas las temperaturas probadas sobre la actividad hemaglutinante del FM-C. En esta figura se observa como los niveles de actividad hemaglutinante fueron decreciendo a medida que la temperatura fue aumentando. En los tiempos de tratamiento mas prolongados se encontraron pocos cambios en la tasa de inactivación de lectinas a todas las temperaturas probadas (Boufassa y col.,1986).

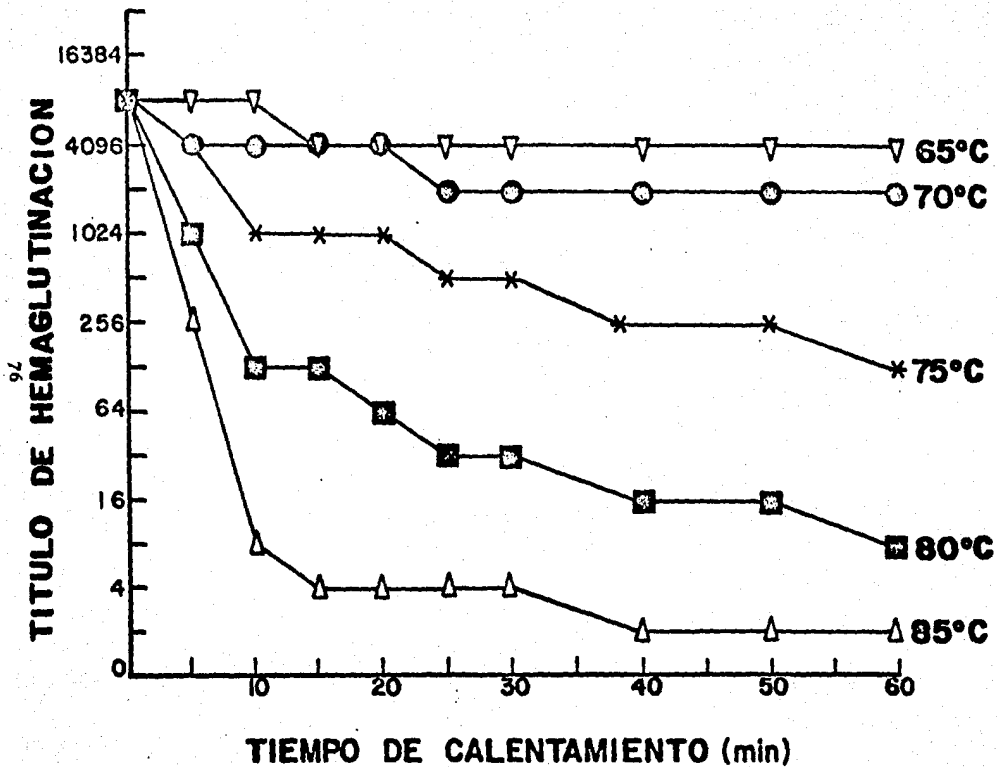


Figura 12. Curvas de inactivación de las fitohemaglutininas del frijol Flor de Mayo Criollo a las diferentes temperaturas probadas.

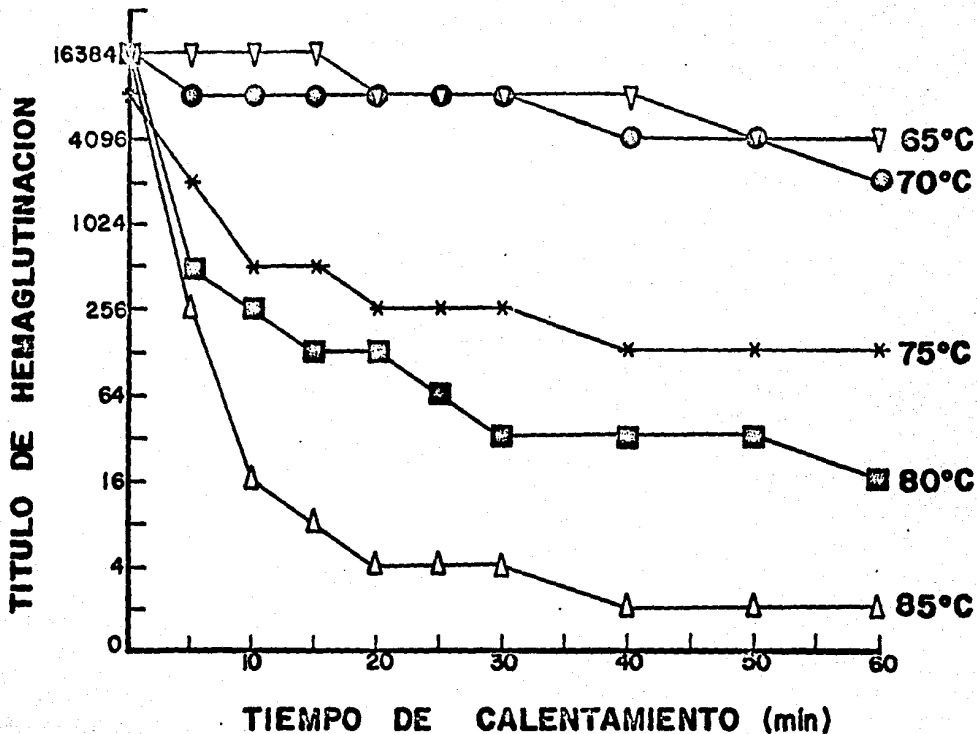


Figura 13. Curvas de inactivación de las fitohemagglutininas del frijol Flor de Mayo Mejorado a las diferentes temperaturas probadas.

Los diversos tratamientos térmicos aplicados al frijol Flor de Mayo Mejorado también se agruparon en la Figura 13. Aquí se manifiesta nuevamente los mayores niveles de actividad hemaglutinante en el tiempo cero de calentamiento de las lectinas aisladas del frijol mejorado genéticamente; en comparación al material criollo progenitor.

Igualmente, se manifestó una mayor tendencia de inactivación de fitohemaglutininas del FM-RMC en relación al FM-G, especialmente en los tiempos de calentamiento iniciales y para las temperaturas de 75, 80 y 85 °C. Asimismo, como en el caso anterior, los últimos tiempos de tratamiento generaron pocos cambios en la actividad hemaglutinante de las lectinas (Grant y col.,1982; Thompson y col.,1983).

F.- Modelos Matemáticos sobre la Actividad Hemaglutinante

En base a todos los resultados experimentales descritos en las figuras previas, se elaboraron modelos matemáticos, que permitieran, llevar a cabo un análisis con mayor profundidad de las tendencias de los niveles de lectinas, para los tiempos de calentamiento probados y para ambos materiales genéticos.

Estos modelos están basados en las siguientes hipótesis:

El tratamiento térmico da origen a subunidades con actividad hemaglutinante residual. Que la degradación de la

actividad hemaglutinante de las moléculas completas y de las subunidades ocurre a una velocidad proporcional a su concentración y es una función de la temperatura donde:

L_1 = cantidad de moléculas tetraméricas

L_2 = cantidad de subunidades con actividad hemaglutinante residual.

Estas hipótesis quedan expresadas así:

$$L_1(t) = -\alpha_1 L_1(t) \quad (1)$$

$$L_2(t) = -\alpha_2 L_2(t) + \beta L_1(t)$$

donde:

t = tiempo de calentamiento

$L_1(t)$ = cantidad de moléculas tetraméricas de lectinas en el tiempo t .

$L_2(t)$ = cantidad de subunidades con actividad hemaglutinante residual.

α_1 = tasa de desnaturalización de las lectinas (función de la temperatura).

α_2 = tasa de desnaturalización de las subunidades con actividad hemaglutinante residual (función de la temperatura).

β = tasa de producción de subunidades con actividad hemaglutinante residual.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Las soluciones del sistema (1) tienen la forma

$$L_1(t) = L_1(0)e^{-\alpha_1 t} \quad (2.a)$$

y

$$L_2(t) = L_2(0)e^{-\alpha_2 t} + \frac{L_1(0)\beta(e^{-\alpha_2 t} - e^{-\alpha_1 t})}{\alpha_1 - \alpha_2} \quad (2.b)$$

Tratando de buscar valores para los parámetros que expliquen las gráficas de la Figura 12 se tomaron $L_1(0) = 8192$, $L_2(0) = 0$ (subunidades libres con actividad hemaglutinante) y se calcularon α_1 , α_2 , y β . Las curvas en la Figura 12 se esperaba fueran de la forma $L_1(t) + \gamma L_2(t)$ donde γ expresa que tantas veces son menos activas las subunidades que las moléculas completas.

Con los valores iniciales propuestos la ecuación (2.b) toma la forma

$$L_2(t) = \frac{8192 \beta (e^{-\alpha_2 t} - e^{-\alpha_1 t})}{\alpha_1 - \alpha_2} \quad (3)$$

Esto sugiere que cambiando β se puede pensar a γ como la constante 1. Es decir, ahora el problema se ha transformado en encontrar las curvas de la Figura 12 como la suma de una curva de la forma (2.a) (Figura 14) y una de la forma (3) (Figura 15).

81. TITULO HEMAGLUTININACION

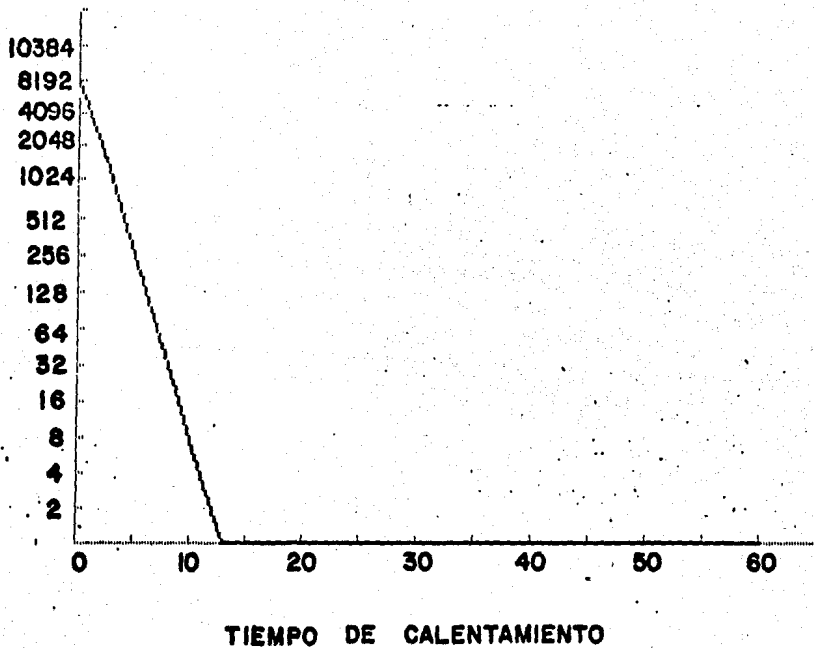
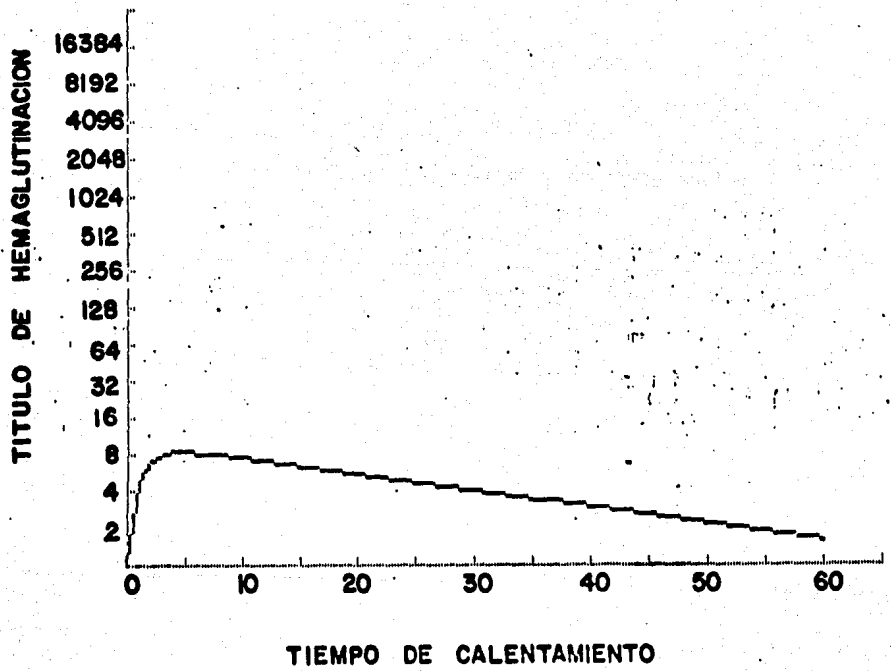


Figura 14. Curva teórica de la ecuación $L_1(t) = 8192e^{-0.7t}$ para las curvas de la Fig. 12 del FM-C.

Figura 15. Curva teórica de la ecuación
 para las curvas de la Fig. 12 del FM-C.

$$L_2(t) = \frac{8102 (0.0008)(e^{-0.31 t} - e^{-0.7t})}{0.7 - 0.031}$$



Para hacerlo se utilizó el siguiente hecho: el descenso de las curvas en la Figura 12 es durante los primeros 15 min prácticamente exponencial y el exponente debe ser muy cercano a α_1 . El decremento en el intervalo siguiente debe ser también muy cercano a α_2 . El valor de β se determina viendo para que valores de las concentraciones predomina el decaimiento de L_1 sobre el de L_2 . Es decir, viendo cuando hay más subunidades con actividad hemaglutinante residual que moléculas tetraméricas (completas).

En el caso de la Figura 13 se procedió de manera análoga tomando $L_1(0) = 16384$ y $L_2(0) = 0$. Los parámetros α_1 , α_2 y β calculados para las temperaturas utilizadas en los tratamientos térmicos, se muestran en el Cuadro 5.

Las gráficas comparativas de los parámetros α_1 , α_2 y β de ambas variedades aparecen en las Figuras 16, 17 y 18 respectivamente. Con estos valores y con las ecuaciones descritas previamente se obtuvieron las gráficas teóricas que aparecen en la Figura 19 para el FM-C y en la Figura 20 para el FM-RMC. En estas dos últimas figuras se incluyeron también con fines comparativos las gráficas experimentales que fueron presentadas en las Figuras 12 y 13 se puede observar una extraordinaria concordancia entre el comportamiento teórico y experimental de estas gráficas. Es decir, las hipótesis

Cuadro 5. Cálculo de α_1 , α_2 y β para las temperaturas experimentales probadas para las variedades FM-C y FM-RMC.

| Temperatura (°C) | Parámetros ^{a/} | | | | | |
|---------------------|--------------------------|--------|------------|--------|---------|--------|
| | α_1 | | α_2 | | β | |
| | FM-C | FM-RMC | FM-C | FM-RMC | FM-C | FM-RMC |
| 65 | 0.1 | 0.2 | 0.009 | 0.018 | 0.1 | 0.2 |
| 70 | 0.16 | 0.23 | 0.016 | 0.02 | 0.09 | 0.19 |
| 75 | 0.26 | 0.38 | 0.025 | 0.027 | 0.15 | 0.013 |
| 80 | 0.39 | 0.6 | 0.03 | 0.04 | 0.004 | 0.007 |
| 85 | 0.7 | 0.72 | 0.031 | 0.04 | 0.0008 | 0.0005 |

^{a/} α_1 = tasa de desnaturalización de las lectinas; α_2 = tasa de desnaturalización de las subunidades con actividad hemaglutinante residual;

β = tasa de producción de subunidades con actividad hemaglutinante.

TASA DE DESNATURALIZACION

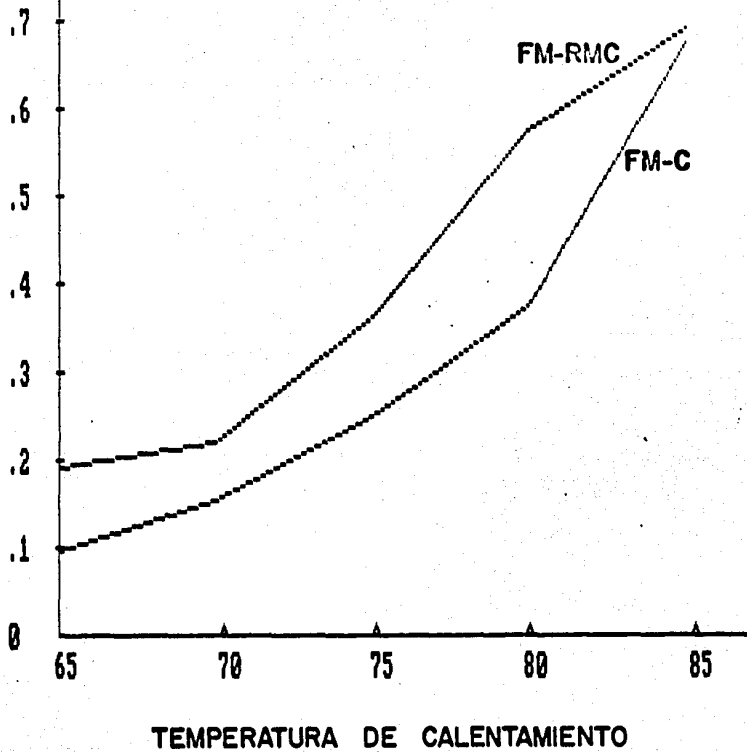
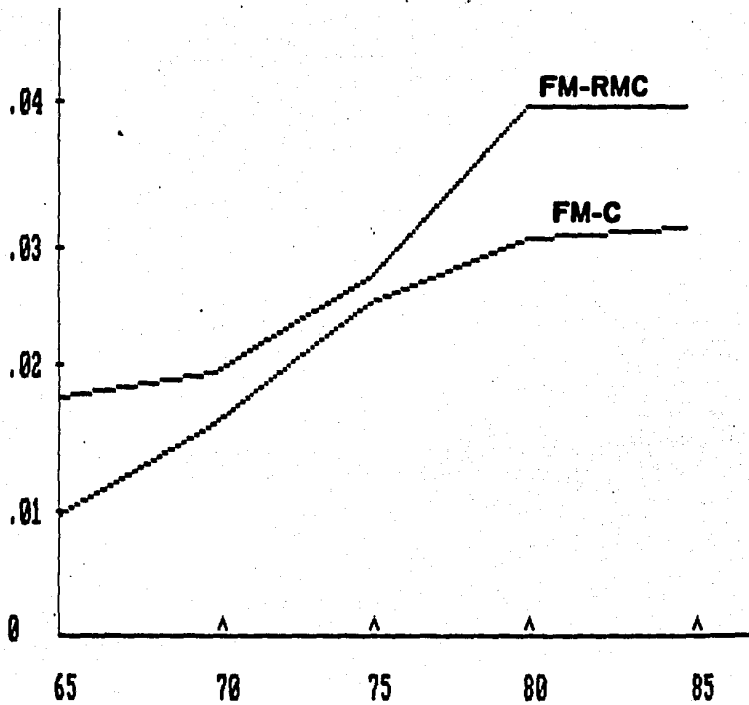


Figura 16. Curvas del parámetro α_1 para las fitohemaglutininas de Flor de Mayo Criollo (FM-C) y el Flor de Mayo Mejorado (FM-RMC).

VALORES DE α_1

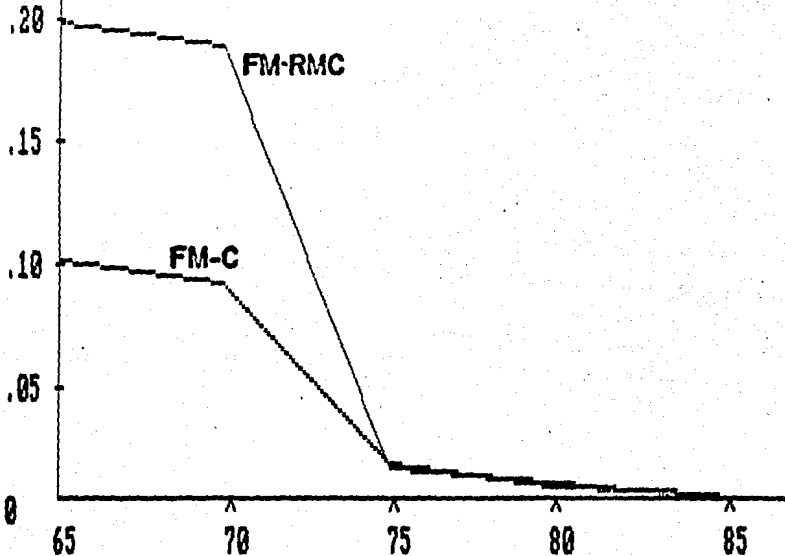
TASA DE DESNATURALIZACION



TEMPERATURA DE CALENTAMIENTO

VALORES DE α_2

Figura 17. Curvas del parámetro α_2 para las fitohemaglutinas de Flor de Mayo Criollo (FM-C) y el Flor de Mayo Mejorado (FM-RMC).

TASA DE DESNATURALIZACION
(NORMALIZADA $\alpha = 1$)

TEMPERATURA DE CALENTAMIENTO

VALORES DE β

Figura 18. Curvas del parámetro β para las fitohemaglutininas de Flor de Mayo Criollo (FM-C) y el Flor de Mayo Mejorado (FM-RMC).

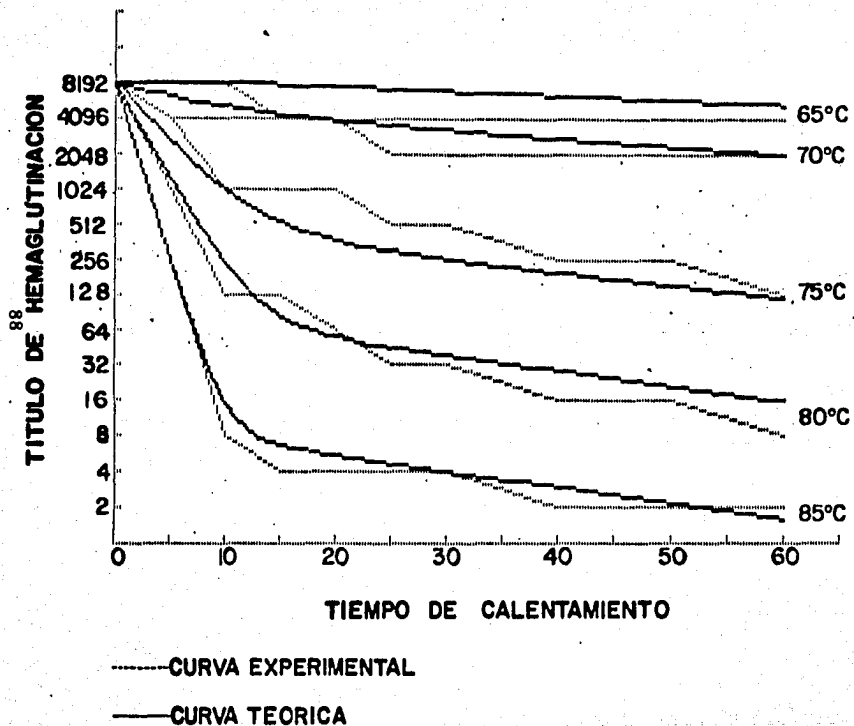
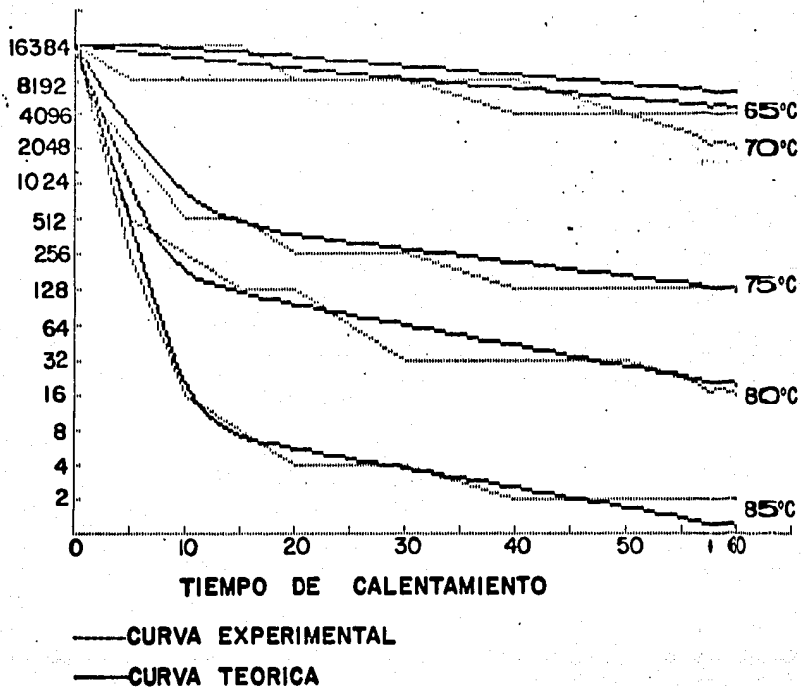


Figura 19. Curvas comparativas entre las gráficas experimentales y teóricas de inactivación de fitohemaglutininas de Ft-C.

TITULO DE HEMAGLUTININACION



planteadas y los modelos matemáticos desarrollados se acercan notablemente a lo que ocurre en la práctica con la pérdida de actividad hemaglutinante del frijol estudiado.

Conclusiones

— Se encontró que el frijol mejorado genéticamente presentó un peso hectolítrico y un peso individual de semillas ligeramente menor que su progenitor criollo.

— Las evaluaciones subjetivas de color no mostraron diferencias para ambas variedades. Sin embargo, la determinación colorimétrica objetiva indicó pequeñas diferencias estadísticamente significativas de este parámetro. Es decir, estas observaciones resultaron ser altamente satisfactorias ya que el frijol mejorado, con alta potencia agronómica, mostró tener un color equivalente al material criollo, según las pruebas visuales; como se sabe el frijol FM-C tiene un mercado bien establecido de consumo de ahí la importancia de su similitud.

— El Flor de Mayo Mejorado mostró un ligero aumento del contenido de proteína, siendo este mayor que el del material criollo.

— La absorción de agua del FM-RMC fue mayor en todos los tiempos de remojo probados que la del frijol criollo. Sin embargo, el patrón de cocimiento del FM-RMC exhibió una tendencia estadísticamente igual que la del FM-C.

— Uno de los resultados mas interesantes obtenidos en este trabajo se refiere al significativamente mayor nivel de hemaglutininas presentado por el frijol resistente al virus del mosaico común, en comparación al frijol sin esa resistencia. Esto es, sería deseable investigar la probable relación existente entre niveles de lectinas y resistencia a patógenos en variedades de frijol de consumo comercial.

— Otro resultado altamente sobresaliente producto de esta investigación fué que la tasa de decremento de la actividad hemaglutinante del frijol mejorado fué mayor que la del criollo en los tiempos iniciales empleados en los tratamientos térmicos.

— En base a las hipótesis y modelos matemáticos presentados en Resultados y Discusión se concluye que durante el tratamiento térmico está ocurriendo simultáneamente la inactivación de la actividad

hemaglutinante) de la molécula tetramérica y la generación de subunidades con actividad hemaglutinante residual. Estas subunidades también se están inactivando en el tratamiento térmico probado.

Si bien la tasa de desnaturalización de la actividad hemaglutinante del frijol criollo y del frijol mejorado es similar en lo general, se mostró una diferencia en esta tasa producto de una constante de temperatura. Es oportuno señalar que este desfase térmico en la estabilidad de las lectinas fue generado por el mejoramiento genético del frijol. En otras palabras, el mejoramiento genético deberá estar ejerciendo una modificación en el arreglo molecular de las lectinas (fitohemaglutininas) del frijol criollo; ya que dió origen a lectinas con una mayor actividad hemaglutinante y una estabilidad térmica ligeramente menor a las lectinas del progenitor.

— Por lo anterior, se estima que el mejoramiento genético generó una isolectina con alguna (s) subunidad (es) más termolábiles.

— Finalmente vale la pena enfatizar que el mejoramiento genético produjo un mayor nivel de lectinas en el material resistente al virus del mosaico común; lectinas que probablemente debido a su arreglo molecular

exhibieron una estabilidad ligeramente menor en su actividad hemaglutinante para ciertas condiciones de los tratamientos térmicos, en comparación a la variedad de frijol sin resistencia al patógeno mencionado.

Resumen

Se estudiaron los cambios en la estabilidad térmica de las lectinas (fitohemaglutininas) y algunos parámetros funcionales en semillas de frijol común (Phaseolus vulgaris L.). Se utilizaron dos variedades de frijol; la variedad Flor Mayo Criollo (FM-C), progenitora de la segunda variedad en estudio Flor de Mayo Mejorada (FM-RMC) resistente al virus del mosaico común. Ambas variedades tienen gran importancia por su aceptación comercial y culinaria en la región de El Bajío.

El material Flor de Mayo Mejorada (FM-RMC) presentó algunas diferencias en las propiedades funcionales con respecto al material criollo (e.g. mayor capacidad de absorción de agua). Sin embargo, los tiempos de cocción de ambos materiales fueron estadísticamente equivalentes.

Para ambas variedades el efecto del cocimiento de las semillas in situ generó una disminución similar de la actividad hemaglutinante. Se presentó un nivel mayor de actividad hemaglutinante en las lectinas extraídas del frijol Flor de Mayo Mejorada, que en las del Criollo.

El comportamiento térmico de estas lectinas fue similar en lo general para ambas variedades. Sin embargo se observó una mayor tasa de inactivación o desnaturalización de las

lectinas del material FM-RMC. El mejoramiento genético confirió una mayor termolabilidad a las lectinas del material generado (FM-RMC), además de proporcionar un nivel mayor de actividad hemaglutinante, en relación al progenitor.

VIII.-Bibliografía

- A. A. C. C. 1983. "Approved Methods". American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Mn.
- Allen, K. N. y Brillantine, L. 1969. A survey of hemagglutinins in various seeds. J. Immunol. 102:1295. Citado por Mancini-Filho y col.,(1979).
- Allen, A. K., Desai, N. N., Neuberger, A. y Creeth, J. M. 1978. Biochem. J. 171:665-674. Citado por Lis y Sharon,(1981).
- Andrewes, A. T. 1974. Navy Charicot)-bean (Phaseolus vulgaris) lectin isolation and characterization of two components from a toxic agglutinating extract. Biochem. J. 139:421-429.
- Andrews, A. T. y Jayne-Williams, D. J. 1974. The identification of a phytohaemagglutinins in raw navy beans (Phaseolus vulgaris L.) toxic for japanese quail (Coturnix coturnix japonica). Br. J. Nutr. 32:181-188.
- Anonymous.1976.Br.Med.J.2:1268-1270.Citado por Jaffe,(1980).
- A.O.A.C.1980."Official Methods of Analysis", 13ed. Association of Official Analytical Chemists, Whashington,D.C.

- Arroyo-Figueroa, M. G. 1986. Propiedades biofísico-químicas y funcionales del frijol común (Phaseolus vulgaris). Tesis de Ingeniero Bioquímico. Instituto Tecnológico de Celaya.Celaya, Gto., México.
- Aub, J. C., Tieslau, C. y Lankester, A. 1963. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 50:613-619. Citado por Lis Sharon,(1981).
- Benwell, J. G., Boldf, D.H., Meyers, J.,Weber Jr,F. L.,Miller, B. y Howard,R.1983.PHA derived from red kidney bean (Phaseolus vulgaris) a cause for intestinal malabsorption associated with bacterial overgrowth in the rat.Gastroenterology, 84:506-511. Citado por Rouanet y col., (1985).
- Bliss, F. A. y Brown, J. W. S. 1983. Breeding common bean for improved quantity and quality of seed protein.En "Plant Breeding Reviews".vol.I. pp.59-91.(Ed.) J.Janick .AVI Publishing Co. Westport, Ct.
- Blumberg,S. y Tal,N.1976.Biochim.Biophys.Acta 453:357-364.Citado por Lis y Sharon,(1981).
- Bollini,R. y Chrispeels,M.J.1978.Characterization and subcellular localisation of vicilin and phytohaemagglutinin,the two major reserve proteins of Phaseolus vulgaris. Planta. 142:291-298.
- Borrebaeck, C. A. K. 1984. Dection and characterization of a lectin from non-seed tissue of Phaseolusvulgaris. Planta. 161:223-228.

- Boufassa, G., Lamfont, J., Rouanet, J. M. y Besancon, P. 1986. Thermal inactivation of lectins (PHA) isolated from Phaseolus vulgaris. Food Chem. 20:295-304.
- Boyd, W. C. y Reguera, R. M. 1949. J. Immunol. 62:333-338. Citado por Puztai y col.,(1983).
- Boyd, W. C. y Shapleigh, E. 1954. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). Science 119:419-423.
- Bressani, R. y Elias, L. G. 1974. En "New Proteins Foods" vol.1 pp. 230-236. (Ed.) A. M. Altschul. Academic Press, New York, N.Y. Citado por Fernández y col.,(1982).
- Brown, J. V. W. S., Osborn, T. C., Bliss, F. A. y Hall, T. C. 1982. Bean lectins part I: relationships between agglutinating activity and electrophoretic variation in the lectin-containing G2/albumin seed proteins of french bean (Phaseolus vulgaris L.). Theor. Appl. Genet. 62:263-271.
- Calderon de la Barca, A. M., Ochoa, J. L. y Valencia, M. E. 1985. Effect of the extraction of a hemagglutinin on the nutritive value of Amaranthus leucocarpus seeds. J. Food Sci. 50:1700-1702.
- Coffey, D. O., Webersax, M. A., Hosfield, G. L. y Brunner, J. R. 1985. Evaluation of the hemagglutinating activity of low-temperature cooked kidney beans. J. Food Sci. 50:76-77.

- de Muelenaere, H. J. H. 1964. Effect of heat treatment on the hemagglutinating activity of legumes. *Nature*, 201:1029-1030.
- Deshpande, S. S., Sathe, S. K. y Salunkhe, D. K. 1984. Interrelationships between certain physical and chemical properties of dry beans (Phaseolus vulgaris L.). *Qual Plant. Plant. Food Hum. Nutr.* 34:53-58.
- Doyle, R. J., Thomasson, D. L. y Nicholson, S. K. 1976. Stabilization of concanavalin A by metal ligands. *Carbohydr. Res.* 4:111-118. Citado por Zahnley, (1984).
- Etzler, M. y Branstrator, M. L. 1974. *J. Cell Biol.* 62:329-343. Citado por Jaffé, (1980).
- Felsted, R.L., Egorin, M. J., Leavitt, R. D. y Bachur, N. R. 1977. Recombinations of subunits of Phaseolus vulgaris isolectins. *J. Biol. Chem.* 252:2967-2971.
- Felsted, R.L., Leavitt, R.D. y Bachur, N.R. 1975. Purification of the phytohemagglutinin family of proteins from red kidney beans (Phaseolus vulgaris) by affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Acta* 405:72-81.
- Felsted, R. L., Li, J., Pokrywka, G., Egorin, M. J., Spiegel, J. y Dale, R. M. K. 1981. Comparison of Phaseolus vulgaris cultivars on the basis of isolectin differences. *Int. J. Biochem.* 13:549-557.

- Fernández, R., Elias, L. G., Braham, J. E. y Bressani, R. 1982. Trypsin inhibitors and hemagglutinins in beans (Phaseolus vulgaris) and their relationship with the content of tannins and associated polyphenols. J. Agric. Food Chem.30:734-739.
- Goddard, V. R. y Mendel. L. B. 1929. J. Biol. Chem. 82:447-463. Citado por Jaffé,(1980).
- Goldstein, I. J. 1972. En "Methods of Carbohydrate Chemistry" vol.6, pp. 106-119. (Ed) R. L. Whistler y J. N. BeMiller. Academic Press, New York. N. Y. Citado por Lis y Sharon, (1981).
- Goldstein, I. J. y Hayes, G. E. 1978. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals.En "Adv. carbohydrate Chem. Biochem. "cap. 35 pp. 127-340. (Ed.) R. S. Tipson y D. Horton. Academic Press, New York, N. Y.
- Goldstein, I. J., Highes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T. y Sharon, N. 1980. What should be called a lectins Nature (London) 285:66-71
- Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T. y Sharon,N. 1980. What should be called a lectin?. Nature (London)285:66-69.
- Grant, G., More, L. J., McKenzie, N. H. y Pusztai, A. 1982. The effect of heating on the hemagglutinating activity and nutritional properties of bean (Phaseolus vulgaris) seeds. J. Sci. Food Agric. 33:1324-1326.

- Grant, G., More, L. J., McKenzie, N. H., Stewart, J. C. y Puzsai, A. 1983. A survey of the nutritional and hemagglutination properties of legume seeds generally available in the UK. *Brit. J. Nutr.* 50:207-214.
- Griebel, C. 1950. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 90:191-199. Citado por Jaffé, (1980).
- Guevara Lara, F. 1987. Estudios sobre la biosíntesis de proteínas de reserva y lectinas en frijol común (Phaseolus vulgaris L.). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato. Irapuato, Gto. México.
- Hara, T., Tsukamoto, I. y Miyochi, M. 1983. Oral toxicity of Kinotoki bean (Phaseolus vulgaris) lectin. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 29:589-593. Citado por Rouanet y col., (1985).
- Hayes, C. E. y Goldstein, I. J. 1974. *J. Biol. Chem.* 249:1904-1914. Citado por Goldstein y Hayes, (1976).
- Hewitt, D. y Coates, M. E. 1969. *Proc. Nutr. Soc.* 28:47A. Citado por Andrews y Jayne-Williams, (1974).
- Higuchi, M., Tsuchiya, I. y Iwai, K. 1984. Growth inhibition and small intestinal lesions in rats after feeding with isolated winged bean lectin. *Agric. Biol. Chem.* 3:695-701.

- Honavar, P. M., Shih, C. V. y Liener, I. E. 1962. Inhibition of the growth of rats by purified hemagglutinin fractions isolated from Phaseolus vulgaris. J. Nutr. 77:109-114.
- Howard, I. K., Sage, H. J. y Horton, C. B. 1972. Arch. Biochem. Biophys. 149:323-326. Citado por Lis y Sharon,(1981).
- Jaffé, W. G. 1960. Arzneim. Forsch. 10:1012-1016. Citado por Jaffé,(1980).
- Jaffé, W. G. 1970. En "Recursos Proteínicos en América Latina" pp.228-239. (Ed) M,Behar,R,Bressani.Institute of Nutrition of Central America. Citado por Fernández y col.,(1982).
- Jaffé, W. G. 1980. Hemagglutinins (lectins). En "Toxic Constituents of Plant Foodstuffs" cap.3 pp 73-95. (Ed.) I.E. Liener. Academic Press, New York, N Y.
- Jaffé, W. G. y Bachur, O. 1972. Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemagglutininas de frijoles (Phaseolus vulgaris). Arch. Latinoamer. Nutr. 22:267-281.
- Jaffé, W. G. y Gamejo, H. 1961. Acta Cient. Venez. 12:59-63. Citado por Jaffé,(1980).
- Jaffé, W. G. y Hannig, K. 1965. Fractionation of proteins from kidney beans (Phaseolus vulgaris). Arch. Biochem. Biophys. 109:80-91.

- Jaffé, W. G., Levy, A. y Gonzalez, D. I. 1974. Isolation and partial characterization of bean phytohemagglutinins. *Phytochem.* 13:2685-2693.
- Jaffé, W. G., Vega Lette, C. L. 1968. *J. Nutr.* 94:203-210.
Citado por Jaffé, (1980).
- Jansen, D. H., Juster, H. B. y Liener, I. E. 1976. Insecticidal action of the phytohemagglutinins in black beans on a bruchbeetle. *Science.* 192:795-801.
- Jayne-Williams, D. J. y Hewitt, D. 1972. *J. Appl. Bact.* 35:331-337. Citado por Andrews y Jayne-Williams, (1974).
- Kabbara, S. A. R., Abbas, I. R., Scheerens, J. G., Tinsley, A. M. y Berry, J. W. 1986. Soaking and cooking parameters of tepary beans: effects of cooking time and cooking temperature on hardness and activity of nutritional antagonists. *Plant Foods Hum. Nutr.* 36:295-307.
- Kadam, S. S., Smithard, R. R., Eyre, M. D. y Armstrong, D. G. 1987. Effects of heat treatments on antinutritional factors and quality of proteins in winged bean. *J. Sci. Food Agric.* 39:267-275.
- Kalliasapathy, K., Perera, P. A. J. y MacNeil, J. H. 1985. Soaking studies on winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* L. DC) to process full-fat flour and determine its shelf-life stability. *J. Food Scie.* 50:773-778.
- Kakade, M. L. y Evans, R. J. 1965. *Br. J. Nutr.* 19:269.
Citado por Jayne-Williams y Hewitt, (1974).

- Kimura, T., Nakata, S., Harada, Y. y Yoshida, A. 1986. Effect of ingested winged bean lectin on gastrointestinal function in the rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 32:101-110.
- Kochibe, N. 1986. Mannose binding lectins of Vicia tetrasperma seed and their immunological relationship to other legume lectins of similar specificity. *Plant Cell Physiol.* 27:661-669.
- Kon S. E. 1979. Effect of soaking temperature on cooking and nutritional quality of beans. *J. Food Sci.* 44:1329-1333.
- Korte, R. 1972. Heat resistance of phytohemagglutinins in weaning food mixtures containing beans (Phaseolus vulgaris). *Ecology of food and nutrition.* 1:303-307.
- Korte, R. 1973b. Weanling food nutrition. Paper Presented at IVth Intern. Congr. Nutr., Mexico City. Citado por Liener, (1975).
- Kortt, A. A. y Caldwell, J. B. 1985. Isolation of the acidic and basic lectins from winged bean seed (Psophocarpus tetragonolobus (L.) DC). *J. Sci. Food Agric.* 36:863-870.
- Landsteiner, K. y Raubitachek, H. 1908. *Zbl. Bakt. I. Abt.* 45:660-663. Citado por Pusztai y col., (1983).
- Leavitt, R. D., Felsted, R. L. y Bachur, N. R. 1977. Biological and biochemical properties of Phaseolus vulgaris isolectins. *J. Biol. Chem.* 252 9:2961-2966.
- Liener, I. E. 1955. The photometric determination of the hemagglutinating activity of soyin and crude soybean extracts. *Arch. Biochem. Biophys.* 54:223-231.

- Liener, I. E. 1962. Toxic factors in edible legumes and their elimination. Am. J. Clin. Nutr. 11:281-294. Citado por Fernández y col.(1982).
- Liener, I. E. 1969. Toxic constituents of plant foodstuffs. pp.409-427. Academic Press, London y New York, N. Y. Citado por Andrews,(1974).
- Liener, I. E. 1975. Protease inhibitor and hemagglutinins of legumes. En "Evaluation of Proteins for Humans" cap.14 pp.284-298. (Ed.) G. E. Bodwel. The AVI Publishing Co.
- Liener, I. E. 1976. Phytohemagglutinins (phytolectins). Ann. Rev. Plant Physiol. 27:291-310.
- Liener, I. E. 1983. Toxic constituents in legumes. En "Chemistry and Biochemistry of Legumes" cap.5 pp. 217-257. (Ed.) S. K. Arora, Edward Arnold Publishers, London.
- Lis, H., Lotan, R. y Sharon, N. 1974. Ann. N. Y. Acad. Sci. 234:232-238. Citado por Lis Sharon,(1981).
- Lis, H. y Sharon, N. 1972. Soybean (Glycine max) agglutinin. Meth. Enzymol. 28:360-368.
- Lis, H. y Sharon, N. 1973. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). An. Rev. Biochem. 42:541-574. Citado por Goldstein y Hayes,(1978); Lis y Sharon,(1981); Muller,(1983).

- Lis, H. y Sharon, N. 1977. Lectins: their chemistry and application to immunology. En "The Antigens" vol. 4, pp. 429-529. (Ed.) M. Sela. Academic press, New York, N. Y. Citado por Kortt y Caldweell,(1985).
- Lis, H. y Sharon, N. 1981. Lectins in higher plants. En "The biochemistry of plants" cap.10 pp. 371-453. Vol.6. Proteins and Nucleic Acids. (Ed.) A. Marcus, P. K. Stumpf y E. E. Conn. Academic Press, New York, N Y.
- Lorenzsonn, V. y Olsen, W. A. 1982. In vivo responses of rats intestinal epithelium to intraluminal dietary lectins. Gastroenterology, 82:838-845. Citado por Pusztai,(1985).
- Lowgren, M. y Liener, I. E. 1986. The effect of slow-cooking on the trypsin inhibitor and hemagglutinating activities and in vitro digestibility of brown beans (Phaseolus vulgaris, var. Stella) and kidney beans (Phaseolus vulgaris, var. Montcaim). Qual. Plant Plant. Food Hum. Nutr. 36:147-154.
- Makela, O. 1957. Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. Suppl. 11:1-156. Citado por Goldstein y Hayes,(1978).
- Mancini-Filho, J., Lajolo, F. M. y Vizeo, D. M. 1979. Lectins from red kidney beans: radiation effect on agglutinating and mitogenic activity. J. Food Sci. 44:1194-1200.
- Manen, D., Manen, J. F. y Morgan, M. R. 1984. Phaseolus vulgaris lectin heterogenety related to their metal content. Plant Science Letters 37:105-109.

- Manen, J. F. y Miege, M. N. 1977. Purification et caracterisation des lectins isolees dans les albumines et les globulines de Phaseolus vulgaris L. *Physiol. Veg.* 15:163-173.
- Marinkovich, V. A. 1964. *J. Immuol.* 93:1194. Citado por Pusztai y col.,(1983).
- Masson, P., Tome, D., y Gaborit, T. 1986. Large-scale preparation and characterization of pea seed lectins (Pisum sativum L.). *Lebensin-Wiss. U. Technol.* 19:138-143.
- Mialonier, G., Privat, J. P., Monsigny, M., Khalem, G. y Durand, R. 1973. Isolement, propriétés physico-chimiques et localisation in vivo d'une phytohémmagglutine (lectine) de Phaseolus vulgaris L.(var.rouge). *Physiol. Veg.* 11:519-537.
- Miller, J. B., Hsu, R., Heinrichson y Yachnin, S. 1975. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72:1388-1391. Citado por Lis y Sharon,(1981).
- Miller, J. B., Noyes, G., Heinkson, R., Kingdon y Yachnin, S. 1973. *J. Exp. Med.* 138:939-951. Citado por Lis y Sharon (1981).
- Muller, H. P. 1983. The genetic control of seed protein production in legumen. En "Seed protein: biochemistry, genetic, nutritive value" cap. 6 pp. 328-332 (Ed.)W.Gottschak y H. P. Muller. Publishers, Nijhoff, M. y Junk, W. The Hague, Boston, London.

- Nachbar, M. S. y Oppenheim, J. D. 1980. Lectins in the United States diet: a survey of lectins in commonly consumed foods an a review of the literature. Am. J. Clin. Nutr. 33:2338-2345.
- Osborn, T. C., Manen, J. F., Brown, J. W. S. y Bliss, F. A. 1984. Bean lectins IV: genetic variation in the non-denatured structure of lectins from different Phaseolus vulgaris L. cultivars. Theor. Appl. Genet. 67:547-552.
- Paredes-López, O., Montes-Ribera, R., González-Castañeda, J. y Arroyo-Figeroa, M, G. 1986. Comparison of selected food characteristic of three cultivars of bean Phaseolus vulgaris. J. Food Technol. 21:487-494.
- Pauly, G. B. 1974. Ann. N. Y. Acad. Sci. 234:145-160. Citado por Jaffé,(1980).
- Planque, K. y Kijive, J. W. 1977. Binding of pea lectins to aglycan type polysaccharide in the cell walls of Rhizobium leguminosarum. FEBS Lett 73:64-76 .Citado por Muller,(1973).
- Pueppke, S. G. 1979. Plant Physiol. 64:575-580. Citado por Pusztai y col,(1983).
- Pueppke, S. G., Baver, W. D., Keegstra, K. y Ferguson, A. L. 1978. Plant Physiol. 61:779-784. Citado por Lis y Sharon,(1981).

- Pusztai, A. 1985. Constraints on the nutritional utilization of plant proteins. *Nutr. Abstr. Reviews* (series B) 55:363-369.
- Pusztai, A., Clarke, E. M. W., Grant, G. y King, T. P. 1981. The toxicity of Phaseolus vulgaris lectins. Nitrogen balance and immunochemical studies. *J. Sci. Food Agric.* 32:1037-1046.
- Pusztai, A., Clarke, E. M. W. y Stewart, J. G. 1979b. Nutritional evaluation of kidney beans (Phaseolus vulgaris) chemical composition, lectin content and nutritional value of selected cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 30:843-848.
- Pusztai, A., Croy, R. R. D., Grant, G., y Stewart, J. G. 1983. Seed lectins: distribution, location and biological role. En "Seed Protein "cap.3 pp.53-71. (Ed.) J. Daussant, J. Mosse y J. Vaughan. Academic Press. London, New York, N Y.
- Pusztai, A., Grant, G. y Oliveira, J. T .A. 1986. Local (gut) and systemic responses to dietary lectins. *IRCS Med. Sci.* 14:205-208.
- Pusztai, A. y Palmer, R. 1977. *J. Sci. Food Agric.* 28:620-628. Citado por Grant y col., (1983).
- Pusztai, A. y Stewart, J .G. 1978. Isolectins of Phaseolus vulgaris physicochemical studies. *Biochim. Biophys. Acta* 536:38-49

- Pusztai, A. y Watt, W. B. 1974. Isolectins at Phaseolus vulgaris. A comprehensive study of fractionation. *Biochem. Biophys. Acta* 365:57-71.
- Rasanen, V., Weber, T. H. y Grasbeck, R. 1973. *Eur. J. Biochem.* 38:193-200. Citado por Lis y Sharon, (1981).
- Renkonen, K. O. 1948. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* 26:66. Citado por Pusztai y col., (1983).
- Rekonen, K. O. 1950. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* 28:45-53. Citado por Toms y Western, (1971).
- Rigas, D. A. y Johnson, E. A. 1964. Studies on the phytohemagglutinin of Phaseolus vulgaris and its mitogenicity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 113:800-818.
- Rigas, D. A., Li, J. G. y Osgood, E. E. 1951. *Am. J. Med.* 10:776-780. Citado por Toms y Western, (1971).
- Rigas, D. A. y Tisdie, V. V. 1969. *Experientia* 25:399-401. Citado por Jaffé, (1980).
- Rossi, M. A., Mancini-Filho, J. y Lajolo, F. M. 1984. Jejunal ultrastructural changes induced by kidney beans (Phaseolus vulgaris) lectins in rats. *Br. J. Exp. Path.* 65:117-123.
- Rouanet, J. M., Besancon, P. y Lafont, J. 1983. Effect of lectins from leguminous seeds on rat duodenal enterokinase activity. *Experientia.* 39:1356-1357.

- Rouanet, J. M., Lanfont, J., Chalet, M., Creppy, A. y Besancon, P. 1985. Effects of dietary kidney bean (Phaseolus vulgaris) lectins in growing rats. Nutr. Report. Intern. 30:237-244.
- Rouge, P. 1975. C. R. Acad. Sci. Paris Ser. D 280:2105-2108. Citado por Lis y Sharon,(1981).
- Sathe, S. K. y Salunkhe, D. K. 1981. Investigations on winged bean (Psophocarpus tetragonolobus (L.) DC) proteins and antinutritional factors. Paper presented at the 2nd Int. Winged Bean Seminar. Colombo, Sri Lanka.
- Sathe, S. K. y Salunkhe, D. K. 1984. Technology of removal of unwanted components of dry beans. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 21:263-287.
- Sefa-Dedeh, S. y Stanley, D. W. 1979. The relationship of microstructure of cowpeas water absorption and dehulling properties. Cereal Chem. 56:379-384.
- Sharon, N. y Lis, H. 1972. Lectins: cell agglutinating and sugar specific protein. Science 177:949-959.
- Sotelo, A., Licea, A. G., Gonzalez-Garza, M. T., Velasco, E. y Feria-Velasco, A. 1983. Ultrastructural changes of epithelial intestinal cells induced by the ingestion of raw Phaseolus vulgaris. Nutr. Rep. Int. 27:329-336. Citado por Rouanet y col.,(1985).
- Stockert, R. J., Morell, A. G. y Scheinberg, I. H. 1974. Science. 186:365-366. Citado por Jaffé,(1980).

- Sumner, J. B. y Howell, S. F. 1936. J. Biol. Chem. 115:583-588. Citado por Lis y Sharon,(1981).
- Takahashi, T., Ramachandramurthy, P. y Liener, I. E. 1967. Some physical and chemical properties of a phytohemagglutinins isolated from Phaseolus vulgaris. Biochim. Biophys. Acta 133:123-133.
- Tan, N. H., Rahim, Z. H. A., Khor, H. T. y Wong, K. Ch. 1983. Winged bean (Psophocarpus tetragonolobus) tannin level, phytate content, and hemagglutinating activity. J. Agric. Food Chem. 4:916-917.
- Thompson, L. U., Rea, R. L. y Jenkins, D. J. A. 1983. Effect of heat processing on hemagglutinin activity in red kidney beans. J. Food Sci. 48:235-236.
- Thompson, L. U., Tenebaum, A. V. y Hui, H. 1986. Effect of lectins and the mixing of proteins on rate of protein digestibility. J. Food Sci. 51:150-152.
- Tom, G. C. y Western, A. 1971. Phytohaemagglutinins. En "Chemotaxonomy of the Leguminosae" cap. 10 pp. 367-462 (Ed) J. B. Harborne, D. Boulter y B. L. Turner. Academic Press, London.
- Toyoshina, S., Fukuda, M. y Osawa, T. 1972. Biochemistry, 11:4000-4005. Citado por Lis y Sharon,(1981).

- Triado, N. y Audran, E. 1983. Interaction of the brush-border hydrolases of the human small intestine with lectins. *Digestion* 27:1-4.
- Turner, R. H. y Liener, I. E. 1975. The use of glutaldehyde-treated erythrocytes for assaying the agglutinating activity of lectins. *Anal. Biochem.* 68:651-653.
- Uhlenbruck, G. y Steinhausen, G. 1972. *Blut.* 25:335-337. Citado por Jaffé,(1980).
- Valdebouze, P., Bergeron, E., Gaborit, T. y Delort-Laval, J. 1980. Content and distribution of trypsin inhibitors and hemagglutinins in some legume seeds. *Can. J. Plant Sci.* 60:695-701.
- Wagh, P. V., Klaustermeier, D. F., Waibel, P. E. y Liener, I. E. 1963. *J. Nutr.* 80:191-195. Citado por Jaffé,(1980).
- Wagh, P. V., Klaustermeier, D. F., Waibel, P. E. y Liener, I. E. 1963. *J. Nutr.* 80:191-195. Citado por Jaffé,(1980).
- Weber, T. H., Aro, H. y Nordman, C. T. 1972. Characterization of lymphocyte-stimulating blood cell-agglutinating glycoproteins from red kidney beans (Phaseolus vulgaris). *Biochim. Biophys. Acta* 263:94-105.
- Zahnley, J. C. 1984. Stability of enzyme inhibitors and lectins in food and the influence of specific binding interactions. En "Nutritional and Toxicological Aspects of Food Safety" cap.17 pp.333-339. (Ed.) M. Friedman, Plenum Press. London, New York, N Y.