



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

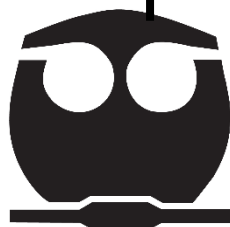
FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LA TEMPERATURA DE GERMINACIÓN
SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEÍNA, SU
DISPONIBILIDAD Y LOS FACTORES TÓXICOS
NATURALES EN DOS VARIEDADES DE FRIJOL
PELÓN (*VIGNA UNGUICULATA*) CONSUMIDOS EN
VILLAHERMOSA, TABASCO.”**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

Valeria Yunuem Apolinar Oropeza



Ciudad de México

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: M. en C. Bernardo Lucas Florentino
VOCAL: Dr. Arturo Navarro Ocaña
SECRETARIO: Q. F. B. Juan Diego Ortiz Palma Pérez
1er. SUPLENTE: Q. A. Adriana Vega Pérez
2° SUPLENTE: Q. A. Eva Patricia Bermúdez García

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**ANEXO LABORATORIO 4C, EDIFICIO A, FACULTAD DE QUÍMICA,
UNAM Y LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS,
CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE LA DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS AGROPECUARIAS, UJAT.**

ASESOR DEL TEMA:

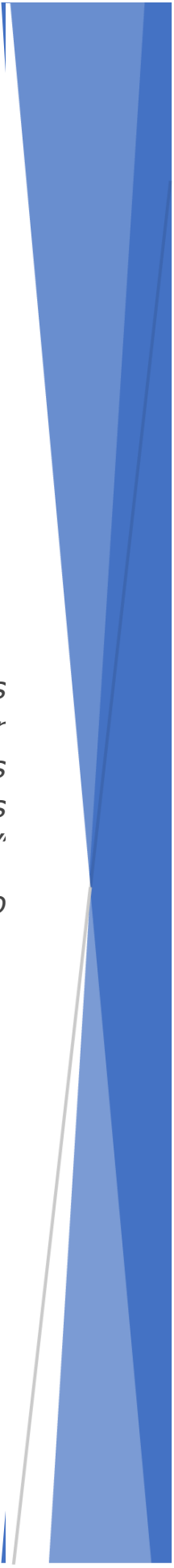
M. en C. Bernardo Lucas Florentino

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Lili Rodríguez Blanco

SUSTENTANTE (S):

Valeria Yunuem Apolinar Oropeza



*"El mayor defecto de los hombres
consiste en preocuparse por
arrancar la cizaña de los campos
ajenos descuidando el cultivo de sus
propios campos"*

-Confucio

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción.....	3
3. Objetivos	6
3.1.0 Generales	6
3.2.0 Particulares.....	6
4. Antecedentes	7
4.1.0 Generalidades de las leguminosas	7
4.1.1 Descripción botánica de la familia <i>Fabaceae</i>	8
4.1.2 <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.	8
4.1.3 Germinación.....	12
4.2.0 Factores tóxicos naturales	15
4.2.1 Inhibidores de tripsina	16
4.2.2 Lectinas	21
5 Materiales y Métodos.....	27
5.1.0 Adquisición del material biológico	27
5.1.1 Almacenamiento y Germinación de las semillas.....	27
5.1.2 Obtención de las harinas.....	28
5.2.0 Determinación de Proteína Cruda	28
5.2.1 Fundamento	28
5.2.2 Material y equipo	29
5.2.3 Reactivos	29
5.2.4 Procedimiento.....	30
5.2.5 Cálculos.....	31
5.3.0 Determinación de Proteína Verdadera	31
5.3.1 Fundamento	31
5.3.2 Material y equipo	32
5.3.3 Reactivos	32
5.3.4 Procedimiento.....	33
5.3.5 Cálculos.....	34
5.4.0 Determinación de la Digestibilidad <i>in vitro</i>	34
5.4.1 Fundamento	34

5.4.2	Material y equipo	34
5.4.3	Reactivos	35
5.4.4	Procedimiento.....	36
5.4.5	Cálculos.....	36
5.5.0	Determinación de Inhibidores de tripsina	37
5.5.1	Fundamento	37
5.5.2	Material y equipo	37
5.5.3	Reactivos	38
5.5.4	Procedimiento.....	38
5.5.5	Cálculos.....	40
5.6.0	Determinación de Lectinas (Fitohemaglutininas).....	41
5.6.1	Fundamento	41
5.6.2	Material y equipo	42
5.6.3	Reactivos	43
5.6.4	Procedimiento.....	43
5.6.5	Cálculos.....	45
6	Resultados y Discusión.....	47
6.1.0	Contenido de Proteína	47
6.1.1	Proteína en la variedad FPOC.....	47
6.1.2	Proteína en variedad FPCN	51
6.2.0	Digestibilidad proteica <i>in vitro</i>	54
6.2.1	Digestibilidad en FPOC.....	54
6.2.2	Digestibilidad en FPCN	56
6.3.0	Inhibidores de Tripsina	57
6.3.1	Contenido de U.T.I en variedad FPOC	58
6.3.2	Contenido de U.T.I en variedad FPCN	60
6.4.0	Lectinas (Fitohemaglutininas)	62
6.4.1	Contenido de UHG en FPOC	62
6.4.2	Contenido de UHG en variedad FPCN	64
7	Conclusiones	66
7.1.0	Generales.....	66
7.2.0	Particulares.....	66
8	Referencias	68

1. Resumen

Las legumbres juegan un papel muy importante en la complementación proteica de origen vegetal en la dieta, especialmente los frijoles y/o caupíes, ya que constituye un alimento de la canasta básica mexicana; en los últimos años se ha utilizado el proceso de germinación como una alternativa biotecnológica sencilla y económica para mejorar el valor nutricional y disminuir los factores tóxicos naturales presentes en este tipo de matriz alimenticia.

El presente trabajo evaluó el efecto de la temperatura y tiempo de germinación en el contenido y disponibilidad de la proteína, así como la concentración de algunos factores tóxicos naturales en dos variedades de ***Vigna unguiculata***, legumbres denominadas como frijol pelón ombligo café (FPOC) y frijol pelón corazón negro (FPCN) en la zona de la Chontalpa, Tabasco, y representan un cultivo clave para dicha región.

A través de este estudio se encontró que durante el proceso de germinación hubo un aumento en el porcentaje de nitrógeno no proteico hasta el 50 %, para ambas variedades, sin importar la temperatura del proceso; mientras que la digestibilidad proteica ***in vitro*** disminuyó para el caso de frijol pelón ombligo café de 74.51 % a casi el 60 %, independientemente de la temperatura; y en el caso del frijol pelón corazón negro la mayor disminución se registró a 29 °C, con 77.22 % de digestibilidad proteica ***in vitro***, hasta casi el 60 %.

Para el caso de inhibidores de tripsina se presentó un aumento en la concentración para la variedad de FPCN a 21 y 29 °C, de 6.19 U.T.I./mg de muestra a 10.48 U.T.I./mg de muestra, respectivamente; y para FPOC

a 29 °C, de 8.89 U.T.I./mg de muestra a 16.79 U.T.I./mg de muestra; mientras que a 21 °C no se observa una tendencia aparente

En cuanto el contenido de lectinas (fitohemaglutininas), mostró una tendencia descendiente para todas las muestras, durante el tiempo de germinación, observando un mayor descenso a la temperatura de 29 °C para ambas variedades, a nivel trazas.

2. Introducción

Las leguminosas de grano han tenido una presencia constante en la agricultura de las distintas partes del mundo, prácticamente desde sus orígenes hace unos 10 mil años, en la era del Neolítico. Las leguminosas son las plantas de donde se cosechan las legumbres que son el fruto formado por la vaina que encierra en su interior una semilla o una hilera de semillas, las cuales se consumen secas: los frijoles secos, lentejas y chícharos secos son los tipos de legumbres más conocidos y consumidos (SAGARPA, 2016).

Las legumbres alimenticias son importantes productos alimenticios en todas las zonas tropicales y subtropicales, en donde son las segundas en importancia en relación con los cereales como fuentes proteicas de origen vegetal; de acuerdo con SAGARPA (2016) los cultivos de leguminosas son importantes en cuestión de seguridad alimentaria, sobre todo para gran parte de la población de América Latina, África y Asia, ya que las legumbres forman parte de las dietas tradicionales y a menudo son cultivadas por pequeños campesinos y agricultores familiares; tan solo en México el consumo de frijol destaca entre muchos otros productos agrícolas en la dieta de la población; y se estima que su consumo anual per cápita es de 10.8 kilogramos (Gaucín, 2016).

Para las zonas rurales como lo es el caso de Comalcalco, Tabasco, la producción de especies criollas como el frijol pelón (*Vigna unguiculata*), suelen ser las más importantes para los agricultores de bajo recursos, al constituir la fuente principal de proteína de origen vegetal (Espinosa-Moreno *et al.*, 2005); aunque se sabe que la mejor fuente proteica es de origen animal, no todos los sectores de la población tiene acceso a este tipo de alimentos, por lo que las legumbres resultan una opción viable al

tener un elevado contenido proteico, de 20 a 26 % en promedio, y son consideradas como un suplemento natural de los cereales debido a que contienen cantidades adecuadas de lisina, las cuales son generalmente deficientes en aminoácidos esenciales en metionina y cistina, mientras que los cereales son deficientes en lisina, pero contiene suficientes cantidades de metionina y cistina (Kay, 1985).

Las legumbres son un cultivo esencial, fuente de nutrientes y alto contenido de proteína, son bajas en grasa y ricas en fibra soluble, gracias a esto ayudan a reducir el colesterol y controlar el azúcar en la sangre. También se ha demostrado que las legumbres ayudan a combatir la obesidad (Valencia & Román, 2004); muchas de las legumbres en grano se utilizan en todo el mundo; la mayoría son bastante sabrosas y de palatabilidad aceptable cuando se cocinan en casa, aun cuando éstas contienen factores tóxicos naturales que normalmente son eliminadas al tener un proceso de cocción adecuado.

Entre los factores tóxicos naturales de mayor importancia se encuentran:

- Inhibidores de Tripsina: Impiden la proteólisis digestiva causando un índice bajo de eficiencia proteínica, lo que a su vez resulta en un retraso en el crecimiento, en el caso de los niños.
- Lectinas: A corto plazo, interfieren con la absorción de nutrientes y a mediano plazo se comportan como enterotoxinas.

No sólo el proceso de cocción puede disminuir la concentración de factores tóxicos naturales, estudios anteriores reconocen a la germinación en diversas semillas como un proceso natural que mejora el valor nutricional y disminuye algunos factores tóxicos naturales, ya que durante la germinación de las semillas se presentan muchos cambios en su

composición, debido a la utilización de sus reservas (hidratos de carbono, lípidos y proteínas), para el desarrollo de su eje embrionario, como es el caso del ácido fítico, en su degradación para disponer de fosforo durante su desarrollo (Rodríguez-Blanco *et al.*, 2018).

Durante la germinación, las semillas necesitan ciertas condiciones ambientales favorables, como la presencia de oxígeno, luz, temperatura y la humedad que determinan el desarrollo del olor y el sabor de los germinados; entre las modificaciones que se pueden apreciar estas dos variaciones de los carbohidratos solubles y de las proteínas, así como un incremento de la vitamina C, lo que origina una mejora en el valor nutritivo de los germinados (Dávila *et al.*, 2003).

El presente trabajo tiene la finalidad de observar el beneficio nutricional que tiene la germinación como proceso biotecnológico, en el aspecto bromatológico y nutritivo, para dos variedades de *Vigna unguiculata*, denominadas en México (sobre todo en las regiones rurales de Tabasco) como frijol pelón: frijol pelón ombligo café (**FPOC**) y frijol pelón corazón negro (**FPCN**); determinando el contenido de proteína y nitrógeno no proteico, dependientes de la temperatura y del tiempo de germinación.

El estudio además observó el efecto que tiene dicho proceso en la concentración de dos de los principales factores tóxicos naturales: inhibidores de proteasas (tripsina) y lectinas; mediante técnicas analíticas validadas.

Las temperaturas y tiempos de la germinación controlada se eligieron a partir de la investigación previa sobre la actividad de la fitasa (Rodríguez-Blanco *et al.*, 2018), de cero al sexto día de germinación a 21 y 29 °C respectivamente.

3.Objetivos

3.1.0 Generales

Evaluar el efecto de la germinación a dos temperaturas (21 y 29 °C), en el contenido y biodisponibilidad de proteína, así como concentración de factores tóxicos naturales en semillas de *Vigna unguiculata*, de las variedades frijol pelón ombligo café y frijol corazón negro.

3.2.0 Particulares

- ◆ Cuantificar el contenido de proteína cruda, verdadera y nitrógeno no proteico, en las semillas sin germinar y germinadas a ambas temperaturas a sus respectivos tiempos.

- ◆ Cuantificar la biodisponibilidad de la proteína en las semillas sin germinar y germinadas a ambas temperaturas, a partir del método de digestibilidad proteica *in vitro*.

- ◆ Cuantificar el contenido de factores tóxicos naturales (inhibidores de tripsina y lectinas) en semillas sin germinar y germinadas a ambas temperaturas, y respectivos tiempos.

4. Antecedentes

4.1.0 Generalidades de las leguminosas

Las leguminosas figuran entre los primeros productos alimenticios que fueron cultivados por el hombre. De acuerdo con los restos arqueológicos hallados en Anatolia (la actual Turquía) la producción agrícola de garbanzos y lentejas se remontaría al 7000 - 8000 a.C. Las primeras "culturas permanentes", como son conocidas, pudieron evolucionar de comunidades cazadoras-recolectoras a pueblos con una incipiente agricultura gracias a las legumbres. Se han encontrado restos de su cultivo asociados al desarrollo de la agricultura desde el Mediterráneo a la India, así como en el Nuevo Mundo (Araneda, 2018).

Las semillas de leguminosas junto con los granos de cereales fueron de los primeros alimentos seleccionados por el hombre; esta selección fue probablemente muy difícil para el caso de las leguminosas; por dos razones: es una familia botánica amplia, con aproximadamente 600 géneros y alrededor de 13 mil especies; y aunque parezca irónico, esta familia de gran estima por su importancia en la dieta humana y animal, contiene una amplia variedad de factores tóxicos, por lo que se pueden considerar como plantas de cierto riesgo en su consumo (Valle-Vega & Lucas, 2000).

Las legumbres han sido parte esencial de la alimentación humana desde hace siglos. Sin embargo, su valor nutricional, en general, no es reconocido y con frecuencia su consumo no se valora lo suficiente. Esta falta de reconocimiento es inmerecida, puesto que las legumbres desempeñan una función crucial en la alimentación saludable, en la producción sostenible de alimentos y, sobre todo, en la seguridad alimentaria (FAO, 2016).

4.1.1 Descripción botánica de la familia *Fabaceae*

Las fabáceas (*Fabaceae*) o leguminosas (*Leguminosae*) son una familia del orden de las fabales, son plantas herbáceas, arbustivas o arbóreas. Tienen tallos generalmente cilíndricos, aunque a veces son de sección angulosa (guisante); en las leguminosas de interés agrícola, las yemas nacen en las axilas de las hojas, disponiéndose superpuestas y siendo casi siempre florales (yemas floríferas). A veces tienen órganos trepadores, como zarcillos foliares (veza) o tallos volubles (judía), que sirven para erguirse; los primeros son órganos sencillos o ramificados de naturaleza foliar, que poseen cierto grado de irritabilidad contráctil. Las flores se agrupan en inflorescencias racemosas, tienen simetría bilateral o radiada y son pentámeras o cinco verticilos (Mateo-Box, 1961).

Para Mateo-Box (2005) el fruto es típicamente legumbre, de donde procede el nombre de la familia, aunque polimorfo, por lo que con mucha frecuencia las transformaciones que experimenta lo convierten en lomento, folículo, etc.; vulgarmente el fruto de las leguminosas recibe el nombre de vaina. Tienen semillas ordinarias, exalbuminosas, con el tegumento o episperma formado por testa y endopleura; el hilo característico para cada especie a veces con un arilo o apéndice funicular; con rafe a veces muy manifiesto; la calaza en forma de resalto o mancha sobre el tegumento y unida al hilo por medio del rafe; estrofíolo o arilo calazal, a veces muy manifiesto; micrópilo bastante visible.

4.1.2 *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Es una legumbre comestible perteneciente a la familia *Fabaceae* y a la subtribu *Phaseoleae*, de la clase de las dicotiledóneas (Walpers, 1843); en México sobre la región de La Chontalpa, Tabasco, región que se muestra en la **Figura 1**.



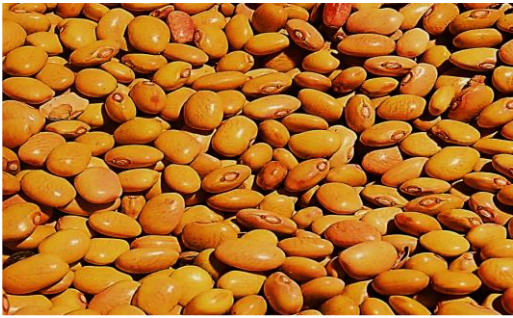
Figura 1. La Chontalpa es una de las cinco subregiones productivas en las que se divide Tabasco, está formada por cinco municipios, los más occidentales del estado: Huimanguillo (1), Cárdenas(2), Comalcalco(3), Paraíso(4) y Cunduacán(5).

La región de la Chontalpa representa el 31.08 % de la superficie del estado de Tabasco, con una extensión de 70,606.09 km², alberga el 45.7 % de la población del estado y comprende los municipios de Huimanguillo, Cárdenas, Cunduacán, Comalcalco, Paraíso, Jalpa de Méndez y Nacajuca. En esta región, el cultivo de granos alimenticios básicos ocupa un reglón importante en la actividad agrícola de los pequeños agricultores; anualmente se siembran alrededor de 35,700 ha de cultivos básicos, de las cuales 2,600 corresponden a frijol negro. Otros cultivos importantes son: caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), cacao (*Theobroma cacao*), cítricos (*Citrus spp.*), piña (*Ananas spp.*) y arroz (*Oryza sativa*). Además, se cultivan otras especies de leguminosas de grano como el **Frijol Caupí** o **Pelón** (*Vigna unguiculata* L. Walp), en particular las variedades de corazón negro y ombligo café (**Figura 2**), que junto con algunas curcubitáceas no son cuantificadas en los censos agrícolas (Lagunes-Espinoza *et al.*, 2008).

La distribución de las formas silvestres son naturales de África, pero esta especie está ampliamente cultivada en todo el mundo, se halla extendida

por los trópicos y casi todas las zonas subtropicales, posee adaptabilidad a estas zonas bajas con elevadas temperaturas (>25 °C) y pocas precipitaciones.

(Wiersema **et al.**, 1990; Delgado-Salinas & Torres-Colín, 2001).



Frijol pelón ombligo
café (FPOC)



Frijol pelón corazón
negro (FPCN)

Figura 2. Semillas de leguminosas utilizadas para el estudio.

Entre los atributos principales que tiene este cultivo leguminoso su crecimiento relativamente rápido y con gran contenido de proteína; es un valioso cultivo intermedio entre las estaciones además de ser abono verde o cultivo de rotación para dar fertilidad al suelo; es un cultivo anual, se adapta a condiciones de escasez de agua, baja fertilidad y tolera condiciones de acidez de los suelos. Este cultivo, además prospera en climas cálidos y diferentes suelos, por lo cual es posible conducir en el país planes de siembra para satisfacer las necesidades básicas de proteínas en la población (Linares, 1993).

Peters **et al.** (2003) describe a ***Vigna unguiculata*** como una herbácea anual con tallos volubles que varían en su calidad de erectos y arbustivos. Hojas trifolioladas, pecíolos de 2.5 a 12.5 cm pecíolos de 2.5 a 12.5 cm de largo. Folíolo central alabardado de 2.5 a 12 cm de largo, liso, folíolos laterales irregulares. Flores en racimos auxiliares sobre pedicelos de 15 a 30 cm de largo. Vaina péndula, lisa, de 10 a 23 cm de largo con un espeso rostro curvado hacia abajo y con 10 a 15 semillas. Semillas de 4 a 8 mm

de largo, 3 a 4 mm de ancho, de tamaño y color variables; estas características son representadas en la **Figura 3**.

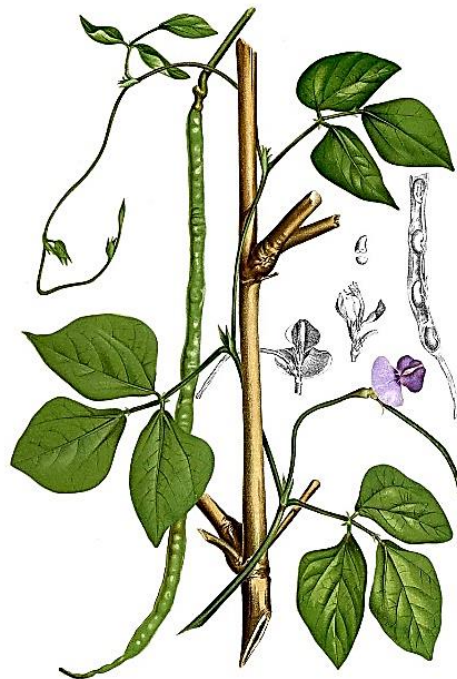


Figura 3 Esquema de *Vigna unguiculata* L. Walp

Esta especie es una de las leguminosas más tolerantes a la sequía, y se emplea como cultivo de pastoreo y muchas veces como cultivo comestible, teniendo casi las mismas necesidades climáticas que el maíz. Teme el frío hasta el punto de que si en la primavera y el otoño sobrevienen temperaturas inferiores a los 5 °C la cosecha resulta seriamente afectada. En relación con el suelo, ***Vigna unguiculata*** no es exigente, adaptándose bastante bien a casi todos los tipos de tierras (Morse, 1947).

Las variedades de ***Vigna*** poseen cáscara gruesa y un sabor descrito como "terroso". Algunos autores (López & Bressani, 2008; Martínez ***et al.***, 2002) han sugerido que se debe a la presencia de polifenoles (aproximadamente 0.1 mg ácido tánico/g de muestra). Johns (1994) determinó el contenido aleloquímico de la semilla de esta especie, y

reporto la presencia de inhibidores de proteasas (Beyra & Reyes-Ariles, 2004).

Varios autores (Johnson & Raymond, 1964; Busson, 1965; Havar- Duclos, 1976) demuestran que tiene un alto contenido en proteína, del 22 al 27 % del peso seco total, considerando que la especie es un excelente forraje para el ganado al obtener un aspecto de matorral durante la estación seca.

Esta especie a veces se usa como sedante y para promover las contracciones uterinas (Bouquet & Debray, 1974).

Con las hojas y las semillas se confeccionan cataplasmas populares en el Senegal contra la dermatitis e inflamaciones de la piel (Kerharo & Adams, 1964, 1974; Berhaut, 1976).

4.1.3 Germinación

La germinación es el proceso que desencadena la rehidratación de la semilla y el inicio de la expansión de la radícula. El metabolismo durante el desarrollo de la semilla es fundamentalmente anabólico y está caracterizado por la síntesis masiva y depósito de sustancias de reserva en los tejidos de almacenamiento y la deshidratación de los tejidos; la germinación se caracteriza por la movilización de polímeros de reserva y cambios cualitativos y cuantitativos de las enzimas catabólicas (Bewley & Black, 1994).

En la **Figura 4** se esquematiza las partes de una leguminosa en madurez, entre las primeras etapas del proceso de germinación.

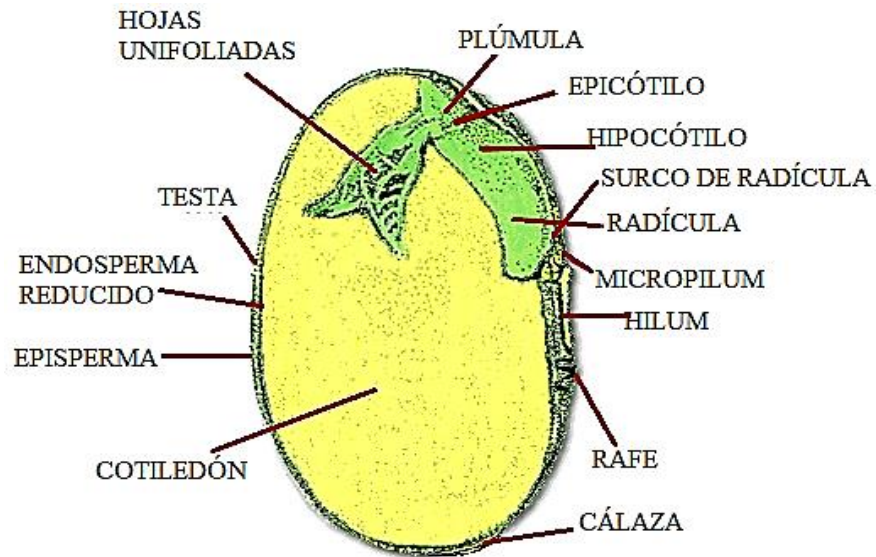


Figura 4. Corte longitudinal de una semilla de leguminosa en madurez.

El proceso de germinación involucra la transición de las células de un estado deshidratado y baja actividad metabólica a un estado hidratado y de intensa actividad metabólica.

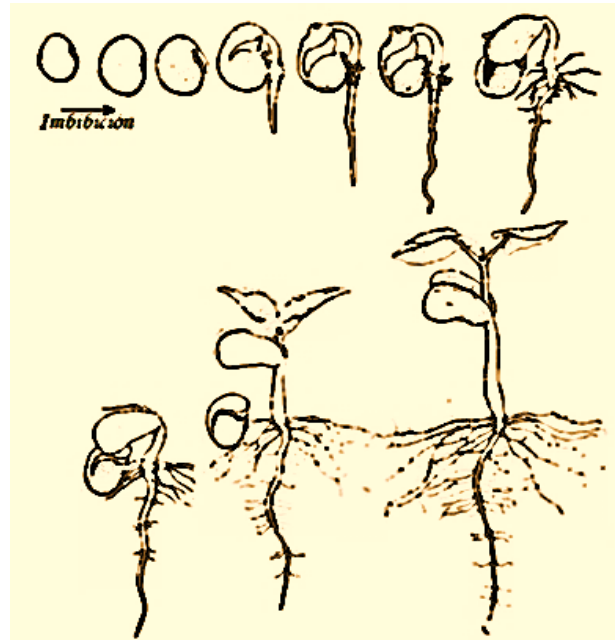


Figura 5. Fases de germinación de la semilla de leguminosa.

El agua es absorbida de manera trifásica por muchas semillas: a), imbibición, b), germinación **sensu stricto** y c), desarrollo del embrión

(Corbineau *et al.*, 1990) (**Figura 5**). La germinación *sensu stricto*, compone la verdadera fase de la germinación, resulta en el proceso de la activación del embrión.

Bewley (1994) describe como los factores ambientales externos que regulan la actividad del árbol progenitor durante la maduración de la semilla (temperatura, luz, foto y termo-período, humedad relativa, potencial de agua en el suelo), así como los parámetros internos (potencial de agua, estado nutricional y hormonal, posición de la semilla en el árbol), afectan la germinación de la semilla. Los factores ambientales directamente involucrados en el proceso de germinación son temperatura, luz, gases y disponibilidad de nutrientes.

La tasa de germinación depende en gran parte del nivel de temperatura. El límite superior es cercano a 45 °C y el inferior está entre 3 y 5 °C. Para las especies tropicales el ámbito de 25 a 30 °C es usualmente el mejor (Bonner *et al.*, 1994).

Si la semilla permanece en el suelo, debe mantener la viabilidad durante el tiempo en que es inhibida por letargo o quiescencia. El letargo puede ser primario (innato) si se origina durante la maduración de la semilla, e inducido (secundario) si es inducido después de la cosecha, en forma natural o artificial, tal como ocurre al realizarse el almacenamiento de semilla secas (Hilhorst, 1998).

El letargo inducido, se desarrolla después de la dispersión o recolección de semillas sin letargo o que emergen con letargo parcial o total. Las causas que pueden inducir letargo secundario son el nivel de humedad, la falta de suficiente luz u oxígeno, la presencia de sustancias volátiles alelopáticas, nivel alto de CO₂. El embrión de las dicotiledóneas puede ser completo, grande o pequeño, pobremente diferenciado, rudimentario,

indiferenciado o inmaduro. Este crecimiento es posterior a la imbibición de agua y existen pocas descripciones de él en las dicotiledóneas. El crecimiento intraseminal del embrión ocurre en todas las estructuras y puede iniciarse 1 o 2 días después de la hidratación (Karssen, 1995; Matilla, 2008).

Jacobson (1984) menciona que la activación celular durante la hidratación parece que sigue un patrón secuencial dentro del embrión. La secuencia de activación en los cotiledones es muy compleja y varía de una especie a otra, en algunas taxa la degradación de cuerpos proteicos y liposomas. Los cambios mayores que se observan son la degradación de las sustancias de reserva y su movilización hacia el eje embrional.

La germinación culmina con la formación de la plántula, Flores-Vindas (2013) define a la plántula como el estadio más joven del nuevo esporofito, desde la protrusión de la radícula hasta la total liberación de las estructuras protectoras, la separación de los cotiledones y el alcance de una altura de 50 cm.

4.2.0 Factores tóxicos naturales

Las semillas de leguminosas contienen de forma general compuestos o factores que pueden afectar a la salud del consumidor, y estas se pueden dividir en dos grupos, de acuerdo con Valle & Lucas (2000).

- ❖ **Agente tóxico:** Cualquier sustancia xenobiótica que es capaz de producir una anomalía fisiológica y/o anatómica a corto plazo (Toxicidad aguda o subaguda), la cual no puede ser atenuada por una simple fortificación o suplementación del alimento que lo contiene.

- ❖ **Agente antinutricional:** Sustancia presente en el alimento, que tiene la capacidad de reaccionar o interferir con un nutrimento, disminuyendo su biodisponibilidad y a largo plazo (Toxicidad subcrónica o crónica) es capaz de producir una anormalidad fisiológica y/o anatómica, que en la mayoría de los casos es irreversible. Sin embargo, el propio nutrimento puede actuar como antagonista; por lo cual una fortificación de este, en la etapa inicial del efecto dañino, puede atenuar o eliminar el problema.

En seguida se describe la naturaleza química de los factores tóxicos naturales determinados en este estudio.

4.2.1 Inhibidores de tripsina

La presencia de inhibidores enzimáticos es frecuente en la alimentación humana, sobre todo en vegetales, particularmente entre las leguminosas, tienen la capacidad de inhibir la actividad proteolítica de ciertas enzimas; estas ejercen diferentes funciones, ya sea inhibiendo los sistemas enzimáticos de sus depredadores o como funciones reguladoras, interviniendo en proceso de almacenamiento.

Aunque la inhibición de las enzimas proteolíticas se demostró por primera vez en el siglo XIX por Fredericq (1878), es a partir de 1930 cuando Read & Haas (1938) demuestran la actividad en material vegetal, mediante un extracto acuoso de harina de soja que inhibía la propiedad de la tripsina de licuar gelatina. En 1945, Kunit aisló por primera vez un inhibidor de proteasa procedente de la soya.

Los inhibidores de proteasas más estudiados han sido los de tripsina, ya que la mayoría de los inhibidores enzimáticos actúan frente a esta enzima y frente a la quimiotripsina, aunque también pueden inhibir otras enzimas

proteolíticas; el efecto como agentes anti-nutritivos se relaciona con el retraso en el crecimiento y un bajo índice de la eficacia proteica.

En la **Figura 6** se presenta un esquema representativo de las rutas metabólicas relacionadas con los inhibidores de tripsina de la soya.

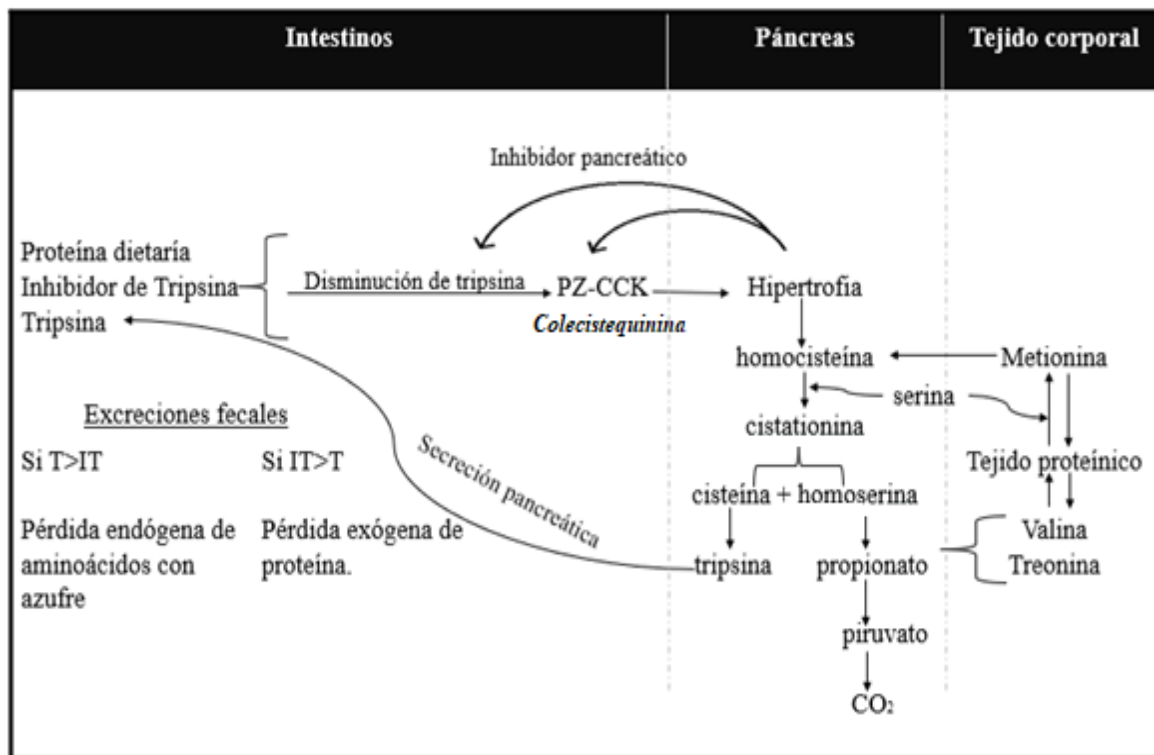


Figura 6. Efecto del inhibidor de la proteasa de soya en el valor nutritivo de la proteína. West *et al.* (1966).

El efecto de los inhibidores de la proteólisis sobre el páncreas ha sido objeto de numerosos estudios que ponen en evidencia una hipertrofia de este órgano, en respuesta a los agentes antitripsínicos, siendo muy variable según las especies animales con las que se estudia (Mitjavila, 1990).

Inhibidor tipo Kunitz de la soya

El inhibidor fue purificado por Kunitz en 1945, pero no fue hasta 1959 que Rackis *et al.* lo complementó mediante técnicas cromatográficas; se sabe que el peso molecular es de 20 mil Daltons. La secuencia completa de

aminoácidos del inhibidor de Kunitz, según lo informado por Koide & Ikenka (1973) y Koide **et al.** (1973), consta de 181 residuos de aminoácidos y dos enlaces disulfuro, con el sitio reactivo ubicado en los residuos Arg 63 e Ile 64; se sabe además que el inhibidor de Kunitz, a diferencia de la mayoría de las proteínas globulares, es bastante resistente a los agentes desnaturizantes como la urea. Los primeros intentos de dilucidar el modelo de interacción del inhibidor de Kunitz con tripsina implicaron la modificación química de los residuos de aminoácidos específicos del inhibidor o la enzima para ver si dichas modificaciones afectaban la capacidad de estos componentes para interactuar entre sí.

En los años 70 Means **et al.** (1974), y Huang & Liener (1977) propusieron como un mecanismo modelo mediante el cual el inhibidor de Kunitz interactúa con la tripsina; la tripsina inicialmente interactúa con el inhibidor virgen, de la misma manera que la tripsina interactúa con el sustrato que contiene un enlace peptídico que contiene lisina o arginina para formar un aducto tetraédrico. Sin embargo, a diferencia de un sustrato natural, el aducto así formado es muy estable debido a un ajuste complementario muy cercano, que se refuerza por una acumulación de enlaces débiles, no covalentes en la zona de contacto (Price **et al.**, 1996).

Inhibidor Bowman-Birk

Es un inhibidor que tiene propiedades bastante diferentes de las del inhibidor de Kunitz fue descrito por primera vez por Bowman (1944) y posteriormente purificado y caracterizado por Birk **et al.** (1961, 1963) y Frattali & Steiner (1969).

El inhibidor de Bowman-Birk difiere del inhibidor de Kunitz en los siguientes aspectos importantes:

Es una molécula relativamente pequeña con un peso molecular de 8 mil Daltons. Estimaciones anteriores indicaron un peso molecular de

aproximadamente 20 mil, pero esto se debió en gran parte al hecho de que esta molécula sufre una auto-asociación, que depende de la concentración (Miller *et al.*, 1969).

Es especialmente rico en residuos de cistina, ya que tiene siete enlaces disulfuro, pero carece de glicina y triptófano (Odani & Ikenaka, 1972). Es un inhibidor de doble cabezal con sitios de unión independientes para la quimotripsina y la tripsina, exhibe una marcada estabilidad hacia calor, ácido y álcali, una propiedad que probablemente es atribuible al efecto estabilizador de los enlaces di-sulfuro en la estructura de la proteína.

La estabilidad del inhibidor durante el tránsito por el estómago debe tenerse en cuenta también a la hora de evaluar un efecto potencial; el inhibidor Kunitz de la soya es inactivado totalmente por el jugo gástrico humano, mientras que el inhibidor Bowman-Birk no sucede de este modo. Estos inhibidores enzimáticos, debido a su naturaleza proteica, se desnaturalizan térmicamente en la mayoría de los casos, perdiendo su efecto antinutritivo; en el caso de las legumbres, una vez inactivados los inhibidores de proteínas obtienen interés nutricional al proporcionar aminoácidos azufrados, ya que son deficientes en sus proteínas, esto resulta de la ruptura de puentes disulfuro existentes en los inhibidores de tripsina, después de haber sido calentadas a 100 °C durante una hora (Gupta, 1987; Liener, 1989).

Inhibidores de tripsina en *Vigna unguiculata* (caupí/ cowpea, Black-eyed Pea)

El primer inhibidor de tripsina que se observó en extractos crudos de esta leguminosa por Borchers *et al.* (1974) se purificó y caracterizó posteriormente por Ventura *et al.* (Ventura & Filho, 1967; Ventura *et al.*, 1971, 1972) el peso molecular bajo (10 mil Daltons). Es un inhibidor de tripsina / quimotripsina rica en cistina. Algo más tarde, el grupo de Royer

(1975), utilizando tripsina inmovilizada, demostró la presencia de cinco iso-inhibidores con propiedades similares.

Por su parte, Gennis & Cantor (1976) describieron las propiedades de dos inhibidores de dos cabezas de la variedad Redbow de guisantes de ojo negro (en inglés Black-Eyed Peas) que se aislaron mediante cromatografía secuencial sobre tripsina y quimotripsina inmovilizadas. Ambos tenían pesos moleculares de aproximadamente 8 mil Daltons; y eran particularmente ricos en cistina, lo que sin duda explicaba su resistencia a la desnaturalización por calor y urea.

Uno de estos, BEPCI (Por sus siglas en inglés Black-Eyed Peas Chymotrypsin Inhibitor) tenía un punto isoeléctrico de 5.1 e inhibía tanto la tripsina como la quimotripsina, mientras que el otro, BEPTI (por sus siglas en inglés Black-Eyed Peas Trypsin Inhibitor), era efectivo solo contra la tripsina. Se encontró que estos inhibidores existen en solución principalmente como un equilibrio entre las formas diméricas y tetraméricas del monómero de peso molecular 8 mil Daltons (de Freitas *et al.*, 1997).

A diferencia de los inhibidores de doble cabeza Bowman-Birk, que forman complejos con tripsina y quimotripsina en sus formas monoméricas (Seidel & Liener, 1972), es la forma dimérica de estos inhibidores que interactúa con la tripsina y / o quimotripsina en dos sitios de unión independientes. En el caso de BEPTI, el dímero reacciona con una molécula de tripsina en un sitio en una de las dos subunidades (llamada "reactividad de medio sitio") y con una segunda molécula de tripsina en un sitio diferente en la otra subunidad.; el resultado neto es que el dímero puede unirse a una molécula de quimotripsina en un sitio en una de las dos subunidades y otra molécula de tripsina en un segundo sitio en la subunidad. Por lo tanto, es posible tener complejos de dímero más

tripsina, dímero más quimotripsina y dímero más tripsina más quimotripsina.

Durante el curso de sus investigaciones, Gennis & Cantor (1976) también aislaron y produjeron proteasas de semillas endógenas de guisantes de ojo negro mediante cromatografía de afinidad en inhibidor de soja Kunitz inmovilizado.

El hecho de que esta proteasa aparentemente existe en la semilla como un complejo con BEPCI sugiere que esta última puede tener alguna función fisiológica en la planta; en contraste con nuestro conocimiento detallado de su función en la planta, en el mejor de los casos, es bastante escaso y especulativo; cualquiera que sea el papel que puedan desempeñar estos inhibidores en la planta puede atribuirse razonablemente a su capacidad para inhibir las proteasas. Si su acción está dirigida principalmente hacia las proteasas endógenas de la planta o hacia las proteasas exógenas producidas por organismos invasores, es una pregunta que se observa con frecuencia, también es un enigma y puede representar un efecto secundario interesante carente de cualquier significado fisiológico verdadero en la medida en que la planta (Alonso-del-Rivero *et al.*, 2013).

4.2.2 Lectinas

Las lectinas constituyen una clase extensa de proteínas que están ampliamente distribuidas en la naturaleza, incluyendo plantas que son comúnmente consumidas en la dieta de seres humanos y animales, estas cumplen funciones de transporte e inmovilización de hidratos de carbono que forman parte específica de determinados grupos sanguíneos humanos (Rodríguez *et al.*, 2004).

La mayor característica propia de las lectinas es su habilidad de combinación reversible con azúcares y glicoconjugaciones de una manera muy específica. Fue este alto grado de especificidad lo que llevó a Boyd & Shapleigh (1954) a sugerir el término lectina (tomado de la palabra latina, **legere** = elegir/elección) para esta clase de compuestos.

Características bioquímicas y estructurales de las lectinas

La característica estructural más importante de las lectinas es el hecho de que contienen dos o cuatro subunidades, cada una de las cuales tiene un sitio de unión al azúcar, esta característica multivalente es la causa de la capacidad en las lectinas para aglutinar los glóbulos rojos mediante la unión no covalente a los restos de hidratos de carbono ubicados sobre la superficie de la membrana celular; o para precipitar las glicoproteínas, la cual se pierde si la molécula se disocia en subunidades; esta interacción entre las lectinas y los receptores de azúcar también se puede revertir o inhibir por la interacción otros azúcares en competencia. Aunque las lectinas son anticuerpos similares en su capacidad para unirse a antígenos específicos, difieren en que no son productos del sistema inmunitario, sus estructuras son diversas y su especificidad está restringida a los hidratos de carbono (Hernández **et al.**, 2005).

Las características estructurales de las lectinas se ilustran mejor con las lectinas del "Jack bean", también conocidas como Concanavalina A y la familia de las lectinas del frijol común **Phaseolus vulgaris** (Espino-Solis, 2015).

Concanavalina A. Sumner & Howell (1936) la aislaron por primera vez de "Jack bean" y han sido las lectinas de plantas más investigadas. Las principales características estructurales de estas es que son un tetrámero compuesto por cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales tiene un peso molecular de 26 mil Daltons. Cada subunidad tiene sitios de unión

para el calcio (Ca^{2+}) y el manganeso (Mn^{2+}), además de un sitio dirigido principalmente a la manosa y en menor medida a la glucosa o a las glicoproteínas que contienen estos azúcares en sus extremos no reductores (Brewer *et al.*, 1983).

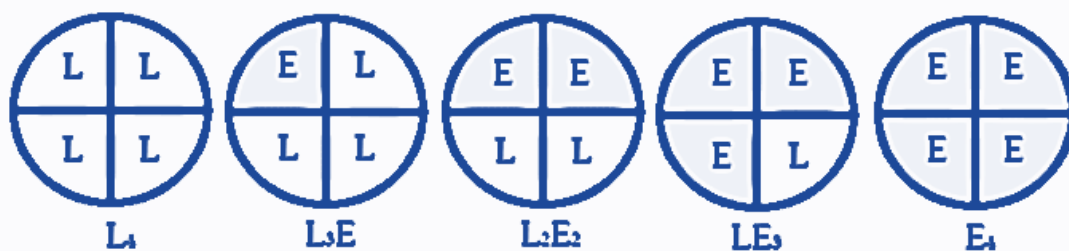


Figura 7. Representación esquemática de la estructura tetramérica de las cinco isoelectinas en *Phaseolus vulgaris*. Copyright National Academy of Science (1975).

Lectina de frijol común. A diferencia de la Concanavalina A, que consta de cuatro isómeros idénticos, surge una situación algo más complicada cuando estas subunidades no son idénticas, como lo ilustra **Figura 7**, la cual consta de cuatro subunidades designadas como E o L. Estas dos subunidades diferentes, aunque tienen pesos moleculares similares, aproximadamente 30 mil Daltons.

Las lectinas de frijol común a veces se denominan PHA o fitohemaglutininas. La PHA integra la fracción proteica de las semillas del frijol común aglutina tanto hematíes como leucocitos, se une a determinados oligosacáridos y estimula la mitosis en diferentes estirpes celulares, dentro de ellas los linfocitos (Hamelryck *et al.*, 1996). Es la lectina más abundante en estas semillas, donde alcanza entre el 5 y el 10 % del contenido proteico total (Staswick & Chrispeels, 1984) y comprende cinco glicoproteínas tetraméricas (isoelectinas) (**Figura 7**) muy estables sobre todo en medio ácido (Biswas & Kayastha, 2004) y formadas por dos polipéptidos (L=leucocito y E=hematíe) (Leavitt *et al.*, 1977) en las

combinaciones (L₄, L₃E₁, L₂E₂, L₁E₃, E₄) (Hamelryck *et al.*, 1996). Las subunidades E son responsables de la eritro-aglutinación, pero muestran poca o ninguna actividad mitogénica, mientras que las subunidades L confieren propiedades leuco-aglutinantes a la proteína nativa y tienen la máxima actividad estimulante de la mitosis (Felsted *et al.*, 1981; Monsigny *et al.*, 1978).

Las isolectinas tienen una composición aminoacídica muy semejante; sólo difieren en los aminoácidos treonina, lisina y arginina y carecen de aminoácidos azufrados (Leavitt *et al.*, 1977). Los oligosacáridos presentes en la proteína tienen un alto contenido de manosa (4 %) y N-acetil-D-glucosamina (2.2 %) (Digestión con α -manosidasa y endo- β -N-acetil-glucosaminidasa H). Aparecen también otros hidratos de carbono como fucosa y xilosa (Staswick & Chrispeels, 1984; Vitale *et al.*, 1984).

Interacción con los intestinos

Debido a su capacidad para unirse a las glicoproteínas en la superficie de las vellosidades que recubren el intestino delgado, las lectinas conducen a una interferencia con la absorción de nutrientes (Van Den Broeck *et al.*, 1999).

Jaffe (1973) fue el primero en sugerir que la toxicidad de las lectinas de *P. vulgaris* podría deberse a la capacidad de unirse a sitios receptores específicos en la superficie de las células epiteliales que recubren el tracto intestinal. Los estudios posteriores de Pusztai *et al.*, (1993) proporcionaron evidencias adicionales de la unión *in vivo* de diversas lectinas a la mucosa intestinal y los efectos fisiológicos que se pudieran producir. La naturaleza precisa del sitio del receptor de los enterocitos sigue siendo incierta, pero se cree que es idéntica, o al menos similar, al sitio de unión en los eritrocitos para la lectina E₄. Esta conclusión se basa

en el hecho de que un glucopéptido aislado de la membrana de los eritrocitos inhibió la unión de E₄ a la membrana de las microvellosidades de la mucosa intestinal (Valdés-Paneca *et al.*, 2012).

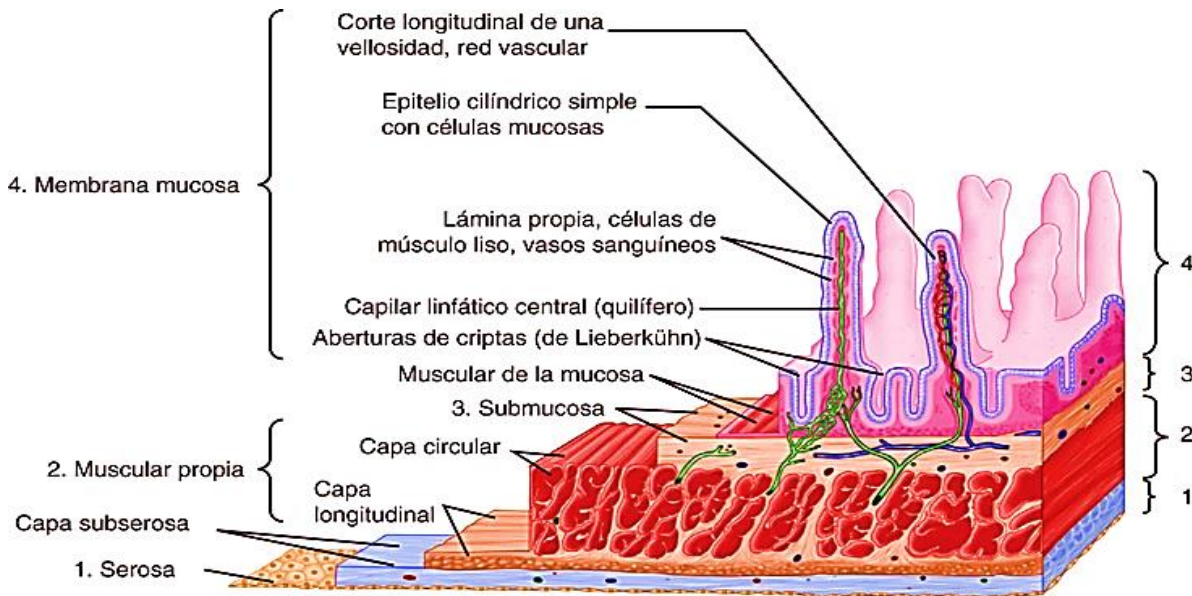


Figura 8. Corte longitudinal del intestino delgado, detallando las capas de éste. Brunicardi *et al.*, 2015. Derechos Mc. Graw Hill Education.

Una de las principales consecuencias del daño infligido a la mucosa intestinal (estructura que se observa en la **Figura 8**, donde muestra que dicha mucosa está formada por vellosidades, redes vasculares, epitelios cilíndricos, músculo liso, vasos sanguíneos y capilares linfáticos) por las lectinas es un grave deterioro en la absorción de nutrientes a través de la pared intestinal. Al utilizar una técnica conocida como perfusión vascular intestinal, es posible demostrar que las lectinas pueden interferir con la absorción de un nutriente como la glucosa. Sin embargo, la capacidad de las lectinas para interferir con la capacidad de absorción del intestino no se limita a los azúcares.

Otros investigadores han demostrado que la inclusión de lectinas en la dieta de ratas causó una malabsorción de aminoácidos, lípidos, vitamina B₁₂ y una interferencia en el transporte de iones; otros efectos tóxicos

pueden atribuirse a su entrada en el sistema circulatorio (Liener, 1997); la unión de las lectinas y la mucosa intestinal produce un cambio en la actividad de enzimas, una hipersecreción de proteína endógena debido a la descamación de células dañadas, un aumento en la producción de mucinas y una pérdida de proteínas del plasma en el lumen intestinal; además, existe la posibilidad que, debido al daño que infligen las lectinas a la mucosa intestinal, algunas bacterias puedan encontrar una ruta de ingreso al sistema circulatorio y de esta forma infecten órganos internos (Elizalde *et al.*, 2009).

Función de la fitohemaglutinina (PHA) en la planta.

De acuerdo con Ruíz-Álvarez & Hernández-Triana (2004), la PHA se acumula, sobre todo, en las vacuolas de almacenamiento del parénquima de los cotiledones de las semillas, aunque también se concentra en las raíces de la planta, específicamente (vacuolas de los meristemas de las raíces primarias y en las paredes celulares de las raíces elongadas).

Ésta actúa protegiendo las semillas contra virus, bacterias, hongos y herbívoros invertebrados, papel determinado en gran medida, por la capacidad de reconocer y unirse a glucanos extraños a la planta (Peumans & Damme, 1995; Rudiger, 1998).

5 Materiales y Métodos

5.1.0 Adquisición del material biológico

Las dos variedades legumbres locales de *Vigna unguiculata*, ombligo café y corazón negro, se adquirieron por parte de la Dra. Lili Rodríguez Blanco (2018), en el Municipio de Comalcalco, Tabasco, México.

5.1.1 Almacenamiento y Germinación de las semillas.

Se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología de Alimentos, de la División Académica de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Las semillas se seleccionaron, y se almacenaron utilizando técnicas tradicionales (Lagunes-Espinoza *et al.*, 2008), para su posterior utilización. Las condiciones de remojo y tiempo de germinación se establecieron en base a los hallazgos de Hegeman y Garbau (2001).

La germinación de las legumbres y la obtención de las harinas se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento establecido por Rodríguez-Blanco *et al.* (2018), donde previo a los ensayos experimentales, las semillas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante media hora. Posteriormente se hicieron lavados consecutivos con agua destilada, hasta alcanzar pH neutro (Díaz *et al.*, 2007). Las semillas limpias se sometieron a un proceso de remojo ácido (ácido cítrico 1 %) durante 18 a 20 horas a temperatura ambiente (TA), utilizando una relación semilla: agua de 1:3 (p/v), posteriormente se drenaron, y se pasaron a cajas Petri con papel absorbente comercial, para iniciar el proceso de germinación a tres temperaturas diferentes (21 y 29 °C) en oscuridad, con 70 a 80 % de humedad, durante 0, 2, 4 y 6 días. Durante el proceso de germinación las semillas fueron hidratadas por aspersión, con una solución de ácido cítrico al 1 % cada 12 horas.

5.1.2 Obtención de las harinas

Terminados los tiempos de germinación de cada leguminosa, las semillas se secaron a 55 ± 2 °C durante 48 horas, se dejaron enfriar a TA y se realizó una molienda fina para cada una.

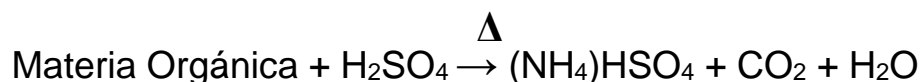
Los germinados molidos se pasaron a través de un tamiz de malla #100 para obtener la harina; la cual se guardó en frascos de vidrio a temperatura ambiente, hasta su uso.

5.2.0 Determinación de Proteína Cruda

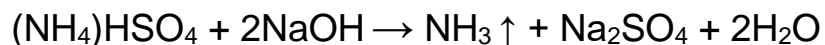
La determinación de proteína cruda se realizó de acuerdo con el método descrito en el AOAC con ligeras modificaciones, empleado usualmente para la determinación de nitrógeno en alimentos (AOAC, 2006).

5.2.1 Fundamento

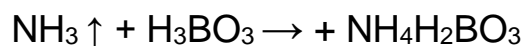
Este método consiste en la oxidación de toda la materia orgánica debido a la acción de ácido sulfúrico y calor en presencia de catalizadores metálicos y peróxido de hidrógeno, formando dióxido de carbono, agua y sulfato ácido de amonio. A este proceso se le llama digestión.



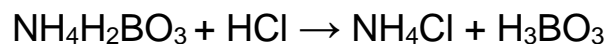
Una vez que se ha reducido completamente el nitrógeno orgánico a inorgánico. Se deja enfriar la solución, se diluye y mediante una solución alcalina se libera el nitrógeno en forma de amoniaco.



Este amoniaco después de destila, recibándose en una solución de ácido bórico.



Posteriormente se titula con ácido clorhídrico para conocer la cantidad de nitrógeno contenida en la muestra.



El contenido de nitrógeno se multiplica por un factor de conversión para expresar en términos de porcentaje de proteína cruda; usualmente se multiplica por 6.25, basándose en la suposición que la proteína promedio contiene alrededor de 16 % de nitrógeno por unidad de peso.

5.2.2 Material y equipo

- Digestor, marca TECATOR, Modelo Ab-20/40
- Equipo de microdestilación, marca TECATOR, Kjeltec Auto 1030 Analyzer
- Tubos de digestión, marca TECATOR de 100 mL
- Balanza analítica, marca Sartorius Analytic.

5.2.3 Reactivos

- Caseína
- Glucosa anhidra (reactivo analítico)
- Mezcla digestiva

Se disolvieron 1.8 g de sulfato de cobre pentahidratado en 12 mL de agua destilada y una vez bien, se agregaron 20 mL de ácido ortofosfórico (H_3PO_4).

Se adicionan con suma precaución 258 mL de ácido sulfúrico concentrado, de manera que resbale por la pared del recipiente, agitando por aproximadamente 30 min.

- Peróxido de hidrógeno al 30 %
- Solución de ácido clorhídrico 0.01 N valorada.
- Solución de hidróxido de sodio al 40 % p/v

- Sulfato de potasio (reactivo analítico).
- Solución de ácido bórico con indicadores.

Se pesaron 10 g de ácido bórico y colocaron en un matraz aforado de 1 L; se adicionó agua y agitó hasta disolverse, a continuación, se adicionó 10 mL de indicador de verde de bromocresol al 0.1 % en metanol (100 mg de verde bromocresol en 100 mL de metanol) y 7 mL de indicador de rojo de metilo al 0.1 % en metanol (100 mg de rojo de metilo en 100 mL de metanol).

El color café rojizo se ajustó con ácido o álcali, de la siguiente manera: se tomó una alícuota de 2.5 mL y añadió 10 mL de agua, la solución debía de mostrar un tono grisáceo. Como persistió el color rojo, se ajustó con NaOH 0.1 N o H₂SO₄ 0.1 N, hasta vire. Esta solución se regresó al matraz volumétrico, hasta que en la primera dilución se presentó el tono gris.

5.2.4 Procedimiento

Digestión de la muestra

Se pesaron 50 mg de muestra sobre un papel para proteína, posteriormente el papel se dobló para introducirlo dentro del tubo de digestión, se añadieron 0.5 g de sulfato y 5 mL de mezcla digestiva al tubo de digestión. Para la predigestión se puso el tubo en el digestor por 15 min (250 °C) y después se retiró del equipo para su enfriamiento a temperatura ambiente. Después se añadieron 3 mL de peróxido de hidrógeno al 30 %, nuevamente se colocó en el digestor a 370 °C por un intervalo de una hora. Se considera que la digestión se ha terminado cuando la mezcla de digestión es transparente con una coloración ligeramente verde o azul, sin presentar manchas o puntos negros.

Destilación y titulación

Se utilizó el equipo de microdestilación de la marca Tecator, Kjeltex para realizar la destilación y titulación. Para ello se comprobó que los tanques de reactivos estuviesen en el nivel necesario para trabajar. La bureta se llenó con la mezcla de ácido bórico e indicadores, sin que contuviera burbujas; se subió el botón "steam" a la posición "on"; se esperó hasta que el vapor se generó y posteriormente el equipo realizó la destilación. Se corrió un blanco que contuvo el equivalente de peso de muestra en glucosa, además de un control de caseína. Al terminar, se anotó el volumen de ácido clorhídrico gastado que apareció en la pantalla.

5.2.5 Cálculos

El volumen final que se ocupó para realizar los cálculos del porcentaje de proteína cruda provino de la diferencia del volumen de la titulación de la muestra menos el volumen de la titulación del blanco.

$$\%N_2 = \frac{(P - B) \times N \times meq}{m} \times 100$$

P: mililitros de titulación de la muestra.

B: mililitros de titulación del blanco.

N: normalidad de la solución de ácido clorhídrico.

meq: miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m: peso de la muestra en gramos.

$$\%Proteína Cruda = \%N \times F$$

F: Factor de conversión (6.25)

5.3.0 Determinación de Proteína Verdadera

Se realizó la determinación de proteína verdadera, a través la técnica analítica validada de acuerdo con Lucas *et al.* (1988).

5.3.1 Fundamento

El nitrógeno no proteico puede dar resultados falsos en el contenido de proteína cuando se utiliza la determinación de nitrógeno Kjeldahl. La técnica para la cuantificación de proteína verdadera se basa en la solubilización del nitrógeno no proteico, para su eliminación, y la posterior

separación por precipitación de la proteína a través de un cambio iónico del medio, a partir de tungstato de sodio.

5.3.2 Material y equipo

- Agitador magnético
- Balanza analítica, marca Sartorius Analytic.
- Barras magnéticas de 12 x 5 mm
- Digestor, marca TECATOR, Modelo Ab-20/40
- Equipo de microdestilación, marca TECATOR, Kjeltex Auto 1030 Analyzer
- Papel Whatman #50.
- Tubos de digestión, marca TECATOR de 100 mL

5.3.3 Reactivos

- Caseína
- Glucosa anhidra (reactivo analítico)
- Mezcla digestiva

La misma mezcla que fue utilizada en la determinación para proteína cruda.

- Peróxido de hidrógeno al 30 %
- Solución precipitante

Se disolvieron 10.0025 g de tungstato de sodio y 3.0201 g de fosfato de sodio dibásico dodecahidratado ($\text{Na}_5\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), en 40 mL de agua, después se añadieron 44 mL de HCl 2 N y se mezcló.

Posteriormente se aforó a 100 mL en un matraz aforado.

- Solución de hidróxido de sodio al 40 % p/v
- Sulfato de potasio (reactivo analítico).
- Solución de ácido bórico con indicadores.
- Solución de ácido clorhídrico 0.01 N valorada.

La misma solución que fue preparada para la determinación de proteína cruda.

5.3.4 Procedimiento

Proceso de precipitación

Se pesaron 70 mg de cada una de las muestras finamente molidas y se colocaron en un vaso de precipitados de 100 mL; se adicionaron 5 mL de agua caliente (50 °C) y agitó mecánicamente por 15 min; se agregaron 2 mL de solución precipitante y se dejaron en reposo por 10 min; posteriormente se transfirieron uno por uno, y por separado, a un embudo Büchner con papel filtro Whatman #50, utilizándose aproximadamente 50 mL de agua caliente para lavar cada uno de los vasos.

Digestión

Se colocó el papel filtro con la proteína soluble precipitada e insoluble, en cada tubo de digestión, y se agregaron 0.5 g de K_2SO_4 5 mL de mezcla digestiva; se colocó el tubo durante 15 minutos en el digestor a una temperatura de 340 °C; se retiraron los tubos del digestor hasta enfriarse a temperatura ambiente, se añadieron 3 mL de peróxido de hidrógeno al 30 % y se colocaron nuevamente en el digestor a 370 °C por intervalo de una hora. Se considera que la digestión está realizada, cuando el tubo no muestra manchas ni puntos negros y además de la mezcla de digestión es translúcida con ligero tono verde-azuloso.

Destilación y titulación

La destilación se realizó en el equipo de Kjeltex, una vez que los tubos se enfriaron. El equipo se enjuaga con un tubo sin muestra y una vez listo se agregaron 25 mL de agua destilada a los tubos con muestra, colocándose el tubo y cerrando la puerta de seguridad, iniciando la

destilación y titulación, tal como se explicó en la determinación de proteína cruda (ver pág. 33).

5.3.5 Cálculos

Para realizar los cálculos, es conveniente correr un blanco donde se sustituye la muestra por el equivalente de peso en glucosa o sacarosa, tratándose de la misma forma que las muestras. Se calcula el porcentaje de proteína verdadera de la misma forma que para el cálculo de proteína cruda (ver pág. 34).

5.4.0 Determinación de la Digestibilidad *in vitro*

Este método multienzimático *in vitro* reemplaza el procedimiento *in vivo*, simulando la digestión natural para determinar la biodisponibilidad de las proteínas (AOAC, 2005).

5.4.1 Fundamento

El fundamento se basa en la digestión de las proteínas del alimento por proteólisis, utilizando tripsina, pepsina y α -quimiotripsina, liberando un protón por cada ruptura de enlace peptídico, disminuyendo así el pH. Al existir esta correlación entre la liberación de H^+ y la digestibilidad de la proteína es posible evaluar la disminución del pH, indicando que mientras más bajo sea el valor del pH será más digerible la proteína.

5.4.2 Material y equipo

- Agitador, marca Corning Mod. PC-310.
- Agitadores magnéticos 1/2' tipo arroz.
- Balanza analítica Sartorius Analytic.
- Manguera de hule para agua.
- Potenciómetro con electrodo de calomel, marca Corning Mod. 100EQ (con pendiente de 95 %)

- Termocirculador a 37 °C ± (0.5 °C), marca Grant Mod. 5E-10.
- Termocirculador a 55 °C ± (0.5 °C), marca Polystat (VWR Scientific Mod. 112)
- Vasos para digestibilidad

5.4.3 Reactivos

- Ácido clorhídrico diluido a diferentes concentraciones (1 N, 0.2 N, 0.1 N)
- Estándar de caseína liofilizada.
- Hidróxido de sodio diluido a diferentes concentraciones (1 N, 0.2 N, 0.1 N)
- Solución enzimática "A"

Se disolvieron en agua destilada las unidades BAEE requeridas de las siguientes enzimas:

Tripsina pancreática porcina tipo IX (Sigma T-0134) tiene 16,700 unidades BAEE por 1 mg de proteína; siendo equivalente a 1 mg de tripsina, por lo que se requiere:

$$\frac{1 \text{ mg de proteína} \times 227,040 \text{ unidades BAEE}}{16,700 \text{ unidades BAEE}} \times \frac{1 \text{ mg de tripsina}}{1 \text{ mg de proteína}} = 13.595 \text{ mg de tripsina}$$

Pepsina de mucosa gástrica porcina (Sigma P-7000), 2,321 unidades BAEE; un gramo de pepsina contiene 424 unidades/mg de peptidasa, por lo tanto, para disolver 2,321 unidades de pepsina se requiere:

$$\frac{1 \text{ mg de peptidasa} \times 2,321 \text{ unidades BAEE}}{424 \text{ unidades BAEE}} = 5.47 \text{ mg de proteasa}$$

α -quimotripsina pancreática bovina tipo II (Sigma C-1421), 1,860 unidades BAEE; una unidad de α -quimotripsina hidroliza un μ mol de BTEE (N-bezoil-L-Tirosina-étil éster) por minuto a pH 7.8 a 25 °C. Contiene

57.24 unidades/mg de α -quimotripsina, por lo tanto, para disolver 1,860 unidades de α -quimotripsina se requiere:

$$\frac{1 \text{ mg de } \alpha - \text{ quimotripsina} \times 1,860 \text{ unidades BAE}}{57.24 \text{ unidades BAE}} = 32.495 \text{ mg de } \alpha - \text{ quimotripsina}$$

- Solución enzimática "B"

Se disolvieron 65 unidades de caseína de proteasa bacteriana (Sigma P-5147) con 10 mL de agua desionizada en un matraz aforado de 10 mL. Cada mg de proteasa tiene 5.9 unidades. Se necesitan 65 unidades de caseína de proteasa, por lo tanto:

$$\frac{1 \text{ mg de proteasa} \times 65 \text{ unidades BAE}}{5.9 \text{ unidades BAE}} = 11.017 \text{ mg de proteasa}$$

5.4.4 Procedimiento

Se pesó en el vaso digestor la muestra o caseína, la cual se utilizó como control cuantitativo de referencia (Digestibilidad= 90 %), que debe proveer 10 mg de nitrógeno proteínico y se le añadieron 10 mL de agua destilada se colocó en agitación a 37 °C durante una hora, posteriormente se midió el pH y se ajustó a 8.0 ± 0.03 con HCl o NaOH según fuera necesario. Inmediatamente se adicionó 1.0 mL de la solución de enzimas A, la cual permaneció 10 min en agitación; posteriormente se cambió la temperatura a 55 °C y se añadió la solución de enzima B, permaneciendo en agitación por 9 min, al término se cambió la temperatura a 37 °C durante 1 min y se mide inmediatamente el pH.

5.4.5 Cálculos

El porcentaje de digestibilidad se obtiene al sustituir el valor de la lectura del pH de la muestra en la siguiente ecuación; con la condición de que el control de caseína muestre un valor de pH igual a 6.42 ± 0.05 .

$$\text{Digestibilidad (\%)} = 234.84 - 22.56(\text{pH})$$

5.5.0 Determinación de Inhibidores de tripsina

La técnica se basa en observar la inhibición producida por un extracto acuoso de la muestra sobre una solución estándar de tripsina (Kakade *et al.*, 1974).

5.5.1 Fundamento

El extracto diluido o directo se pone en contacto con una solución estandarizada de tripsina (40 µg/10 mL), y después de cierto tiempo se determina la actividad proteolítica remanente, por medio de un substrato sintético, BAPNA (N-α-benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida-HCl), el cual producirá una coloración que puede leerse en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm. Esta coloración es inversamente proporcional al contenido de onda de inhibidores de la muestra.

Una U. T. (unidad de tripsina), es arbitrariamente definida como un incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 de mezcla de reacción descritas por Kakade *et al.* La actividad de inhibidores de tripsina se expresa en términos de U. T. I. (unidades de tripsina inhibida).

5.5.2 Material y equipo

- Agitador magnético múltiple, marca Corning Stirrer, modelo 440825.
- Buretas de 15 mL y 30 mL.
- Espectrofotómetro, marca Genesys™ 10.
- Gradilla para tubos.
- Mezclador de tubos Vortex, marca Laline, modelo Supermiker.
- Parrilla de agitación magnética con calentamiento "WiseStir", modelo SMHS-3.
- Potenciómetro, marca Thermo scientific, modelo Orion 3 star.
- Tubos de ensaye 16 x 125 cm.

- Vasos de precipitados.

5.5.3 Reactivos

- Ácido acético 30 % v/v.
- Ácido clorhídrico 0.001 N.
- Muestra de referencia (harina desengrasada de soya)
- Hidróxido de sodio (NaOH) 0.01 N.
- Solución amortiguadora de TRIS (Merck: # 108382), pH 8.2, 0.05 M.

Se disolvieron 0.05 g de TRIS (hidroximetil-amino metano P.M. 121.14 g/mol) y 1.264 g de CaCl₂ (Merck: #2388) anhidro en 900 mL de agua destilada. Posteriormente se ajustó el pH a 8.2 y aforó a un volumen de 1 L.

- Solución BAPNA (Sigma: B-4875)

Se disolvieron 100 mg de N- α -benzoyl-DL-arginina-4-nitroanilida-HCl en 2.5 mL de dimetilsulfóxido (Sigma: D-4540) , a la cual se le añadió 250 mL de la solución amortiguadora TRIS, previamente calentada a 37 °C.

NOTA: ESTA SOLUCIÓN SE PREPARA EL MISMO DÍA DE USO, Y SE MANTUVÓ A 37 °C.

- Solución estándar de tripsina

Se pesó con suma exactitud 4 mg de tripsina bovina (Sigma: T-1426) y se disolvió en 200 mL de HCl 0.001 N, por lo cual la solución contenía 20 μ g de tripsina por mL, manteniéndose en refrigeración, donde pudo durar de 2 a 3 semanas sin pérdida apreciable de actividad.

- Termocirculador a 37 °C, marca Grant, modelo 5E-10.

5.5.4 Procedimiento

Preparación del extracto

Se pesó 1 g de muestra finamente molida y desengrasada, en un vaso de precipitados, adicionando 45 mL de hidróxido de sodio 0.01 N, a esta suspensión se le ajustó el pH a 9.6 ± 0.2 y se aforó con agua a 50 mL. En seguida se transvasó a un vaso con magneto para la agitación mecánica a 300 rpm por dos horas y media. Posterior a este tiempo, se retiró el magneto y se dejó reposar por media hora; mediante decantación se separó el sobrenadante del residuo insoluble.

El sobrenadante debe ser diluido hasta el punto de que 1 mL produzca una inhibición de 40 a 60 % este requisito es indispensable para reducir la desviación estándar relativa.

Debido a que algunos sobrenadantes ya tenían una coloración amarillenta (interfiriendo con la lectura en espectrofotómetro a 410 nm), se optó por el uso de carbón activado: 0.1 g en la solución aforada a 50 mL, en agitación mecánica a 150 rpm por 30 min, y posteriormente se filtró por gravedad con papel filtro de poro abierto.

Determinación de la actividad

Se pipetearon porciones de 0.0, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8 mL de extracto directo o diluido, y se ajustaron 2.0 mL de volumen total con agua destilada. Se agregaron 2.0 mL de solución estándar de tripsina y posteriormente se introdujeron a Baño María en el Termocirculador Grant, a 37 ± 0.5 °C por espacio de 10 min exactos.

Posteriormente se adicionaron 5 mL de solución BAPNA (a 37 °C) a cada tubo y se mantuvo dicha mezcla de reacción en Baño María por exactamente 10 min cronometrados. La reacción enzimática se detuvo por la adición de 1 mL de ácido acético al 30 %; el cual se homogenizó mediante el uso del Vortex.

Para cada dilución (tubo de ensaye) se trabajó su respectivo blanco, con las mismas porciones de extracto directo o diluido a los cuales se les adicionaron 2 mL de solución de tripsina e inmediatamente después se

les adicionó 1.0 mL de ácido acético al 30 %. Después se introdujeron a Baño María a 37 ± 0.5 °C por exactamente 10 min, y posteriormente se les agregó 5 mL de BAPNA, inmediatamente se regresaron al Termocirculador por 10 min cronometrados. Pasado este tiempo se retiraron del Baño María.

Para cada lectura en el espectrofotómetro a 410 nm, se ajustó el aparato a 0.0 de absorbancia (100 % T) mediante sus respectivos blancos; dónde 0.0 mL de extracto es la referencia de tripsina, sobre la cual se basaron los cálculos.

5.5.5 Cálculos

Para pasar de una lectura de absorbancia a unidades de tripsina, se realizó el siguiente calculo:

$$U.T. = A \times 100$$

A: Absorbancia en nm.
U.T.: Unidades de tripsina.

Para cada alícuota de la serie, se calculó su valor de U.T., que se determina al restar el valor del dato de referencia, de la siguiente forma:

$$U.T.I. = U.T_R. - U.T.$$

U.T.I.= Unidades de tripsina inhibida.
U.T.=Unidades de tripsina de cualquier tubo.
U.T_R. = Unidades de tripsina del tubo de referencia.

Con este dato es posible calcular el valor de U.T.I./mL de cada una de las alícuotas.

Cuando los inhibidores son de tipo Kunitz, al graficar la actividad enzimática inhibitoria (U.T.I./mL) como una función de la alícuota del extracto de prueba, se observa una correlación lineal negativa, de donde se obtiene el valor extrapolado, correspondiente al valor cero de la solución inhibitoria.

Este dato extrapolado, es el valor más cercano a la actividad inhibitoria verdadera, si es que se trata de inhibidor tipo Kunitz.

En el caso de que las muestras no presenten una correlación lineal satisfactoria ($r < -0.9$), se puede trabajar el valor promedio de la serie de alícuotas, reportado en términos de U.T.I./mL.

$$\left(\frac{UTI}{mg \text{ muestra}} \right) = \frac{B \times F \times 50}{1000mg}$$

B= valor extrapolado o promedio en U.T.I./mL.

F= Factor de dilución, el cual depende de la(s) dilución(es) realizada(s), cuando se trabaja el extracto directo F=1.

$$F = \frac{A_1}{a_1} \times \frac{A_2}{a_2}$$

A_i= Aforo(s).

a_i= Alícuota(s).

El presente trabajo de investigación reporta en unidades de inhibición por miligramo de muestra.

5.6.0 Lectinas (Fitohemaglutininas)

Se realizó la determinación de lectinas mediante el método de microtitulación, debido a su alta sensibilidad del ensayo; el método resulta adecuado debido a que Jaffé en 1972 encontró una adecuada correlación entre este método y la toxicidad de las lectinas del frijol común (*Phaseolus vulgaris*).

5.6.1 Fundamento

La metodología se basa en la capacidad de aglutinación de los eritrocitos que tienen las lectinas o fitohemaglutininas, por efecto de sus receptores específicos presentes. Consiste en hacer microdiluciones seriadas de un extracto acuoso, expresando los resultados en forma cuantitativa con respecto a una referencia, que en este caso se trata de la lectina comercial de *Phaseolus vulgaris* (faseolotoxina). Se determina el punto final de la

aglutinación de los glóbulos rojos, en particular de hámster dorado (*Mesocricetus auratus*), que previamente fueron lavados y sensibilizados con solución de proteasa.

Se determina la cantidad mínima del extracto acuoso de la muestra que puede producir aglutinación y se relaciona con la cantidad mínima de lectina de referencia que produce una prueba positiva de aglutinación, definiéndose la unidad hemaglutinante (UHG) como el equivalente a 1mg de dicha lectina (Lucas & Sotelo, 1993).

5.6.2 Material y equipo

- Balanza analítica, marca Sartorius, modelo A210-P.
- Centrífuga, marca Eppendorf, modelo 5702.
- Dispositivo para lectura de placas.
- Embudo de vidrio.
- Espectrofotómetro, marca Coleman Junior, modelo II A.
- Filtros de vidrio de poro fino (40 – 100 μm) Foos-Tecator P2
- Gasas
- Incubadora a 37 ± 0.5 °C, marca Blue-M.
- Jeringa de 5 o 10 mL, calibre 22.
- Matraz aforado de 10 mL.
- Microdilutor de 50 μL .
- Parrilla de agitación múltiple, marca Corning Stirrer, modelo 440825.
- Placas de microtitulación tipo "V"
- Pipeta automática multicanales.
- Tubos de centrífuga de 15 mL con graduación.
- Vasos de precipitados de 50 mL.
- Microtiter kit (Cook Eng Alexander, Virginia, USA).
- Embudo de filtración detalle corto.

- Pipeta volumétrica de 0.5 y 2.0 mL
- Pipeteador de goteo (50 µL)
- Matraz Erlenmeyer de 25, 125 y 250 mL.

5.6.3 Reactivos

- Solución de lectina de frijol Red Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris*) (PHT)-Phytohemaglutinina PFA-P, polvo liofilizado (Sigma: L-8754).
- Solución anticoagulante, solución de heparina 1000 UI.
- Solución salina al 1 % preparada con agua desionizada.
- Solución salina al 0.9 % preparada con agua desionizada.
- Solución de proteasa (Sigma: P-5147) al 0.2 % en solución salina al 0.9 %

5.6.4 Procedimiento

Preparación del extracto

Se pesaron 0.1 g de muestra molida finamente en un mortero (<5 % de grasa) y se suspendió en 10 mL de solución salina al 1 %, se realizó la extracción con agitación usando un agitador magnético durante dos horas a 300 rpm. El extracto se centrifuga a 3000 rpm durante 15 min; el sobrenadante se separó con un filtro de vidrio P2 y se lavó el residuo con solución salina al 1 %; finalmente el extracto filtrado se llevó a un volumen de 10 mL.

Preparación de la sangre

La sangre del hámster se obtuvo por vía ocular, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 50mL con solución anticoagulante, posteriormente se transvaso a tubos de centrífuga, para que fuese lavada tres veces con solución salina al 0.9 % en una proporción 1:5 sangre:SSI. Se centrifugó durante 10 min a 1500 rpm y se eliminó el sobrenadante por decantación.

Después del último lavado se midió en el tubo la cantidad del paquete de eritrocitos y se diluyó al 4 %, para lo cual por cada 1 mL de paquete de eritrocitos se adicionaron 24 mL de solución salina al 0.9 %.

Sensibilización de los eritrocitos

Por cada 10 mL de la suspensión de glóbulos rojos al 4 % se adicionaron 1 mL de la solución de proteasa al 0.2 %, se agitaron suavemente para su homogenización y colocaron en la incubadora a 37 ± 1 °C por espacio de una hora, después del tiempo se elimina el sobrenadante de proteasa centrifugando a 1500 rpm por 10 min; se lavó nuevamente el paquete de eritrocitos tres veces con solución salina al 0.9 % y se resuspendió el paquete de eritrocitos ya lavados al 4 %.

Ajuste de la suspensión de eritrocitos

Se tomó 0.5 mL de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados y se adicionaron 2.0 mL de solución salina al 0.9 %, posteriormente se leyó el porcentaje de transmitancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 620 nm, utilizando como blanco la solución salina al 0.9 %. La lectura que debe obtenerse es de 24 ± 1 % de transmitancia. Cuando se obtuvo un porcentaje menor, se diluyó con más solución salina al 0.9 %, hasta llegar al valor deseado. Cuando se obtuvo un porcentaje mayor, la suspensión nuevamente se centrifugo y realizo el mismo procedimiento en la toma de 0.5 mL de esta nueva suspensión de glóbulos rojos y 2.0 mL de solución salina.

Microtitulación

En las placas de microtitulación tipo "V" se colocó en cada pozo de una hilera 100 μ L de solución salina al 0.9 % utilizando la micropipeta multicanal y evitando tocar las paredes del pozo.

Para realizar la microdilución seriada, se llenó el microdilutor de 50 µL introduciéndolo en el extracto de la muestra problema y al sacarlo se eliminó el extracto adherido al vástago del microdilutor en el primer pozo de la hilera, introduciéndolo y rotándolo sin excesiva presión (durante 20 segundos) y se pasó con cuidado a los siguientes pozos.

Lo anterior también se realizó para la solución diluida 1:100 de lectina de ***Phaseolus vulgaris*** que sirvió de referencia para la determinación cuantitativa.

Para el blanco negativo de lectinas se ocupó una hilera de cada placa que solo contenía solución salina al 0.9 %.

Con un pipeteo de gota se colocó en cada pozo 50 µL de la suspensión de glóbulos rojos (constantemente se homogenizó suavemente, para evitar la sedimentación de los eritrocitos); se giró la placa en forma circular y colocó en la incubadora a 37 ± 1 °C durante una hora.

Lectura

Se colocó la placa de microtitulación sobre el dispositivo de lectura y se observó por el espejo el fondo de los pozos de cada hilera; se reportó la máxima dilución que presenta prueba positiva de aglutinación de la muestra problema y del estándar de ***Phaseolus vulgaris***.

5.6.5 Cálculos

Para determinar el contenido de unidades de hemaglutininas en gramo de muestra se realizaron los siguientes cálculos.

Límite de detección del método.

$$E = M \times D$$

E= Cantidad que realmente se coloca en el primer pozo para hacer la dilución seriada.

D= Cantidad de muestra tomada por el microdilutor en µL.

M= Concentración de lectina en solución final (µg/mL)

Si se ha realizado dilución se expresa:

$$\frac{1 \text{ mg PHT}}{10 \text{ mL}} \times \frac{1}{100} = \frac{1 \times 10^{-3} \text{ mg de PHT}}{\text{mL}} = \frac{1 \text{ } \mu\text{g PHT}}{\text{mL}}$$

PHT. Faseolotoxina

$$E = \left(\frac{1 \text{ } \mu\text{g}}{\text{mL}}\right)(50 \text{ } \mu\text{L})\left(\frac{1 \text{ mL}}{1,000 \text{ } \mu\text{L}}\right)$$

$$E = 0.05 \text{ } \mu\text{g}$$

Límite de detección del método, o sea la cantidad de lectina que produce prueba positiva de aglutinación.

$$L = 2 \times \left(\frac{E}{3^t}\right)$$

L: Cantidad de lectina requerida para prueba positiva en aglutinación en μg
t: Lectura hasta el último pozo que dio positiva la aglutinación (Título).

Determinación de aglutinación en la muestra:

$$e = m \times D$$

e: Cantidad utilizada realmente de la muestra problema en el primer pozo de la hilera respectiva.
m: Concentración de muestra en el extracto directo diluido (expresado en mg/mL)
D: Cantidad de muestra tomada por el microdilutor (50 μL).

$$m = \left(\frac{\text{g de muestra}}{10 \text{ mL}}\right)\left(\frac{1,000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}\right) F$$

g: Gramos de muestra para la extracción.
F: Factor de dilución.

Relación entre el límite de detección de la lectura de referencia (L) y el límite que da prueba positiva con la muestra.

$$R_E = \left(\frac{L}{L_m}\right) = \left(\frac{\mu\text{g PHT}}{\text{mg M}}\right) = \left(\frac{\text{mg PHT}}{\text{g M}}\right)$$

R_E =Relación equivalente.

Si se define que una unidad de hemaglutinación (UHG) es equivalente a un mg de la lectina de referencia, se puede expresar el resultado en UHG/g muestra, cuando no sea el caso de frijol (***Phaseolus vulgaris***), tal como lo es este estudio.

6 Resultados y Discusión

6.1.0 Contenido de Proteína

A continuación, se muestran los resultados sobre el contenido de nitrógeno proteico y no proteico, para las variedades: frijol pelón ombligo café (**FPOC**) y frijol pelón corazón negro (**FPCN**), sin germinar y para los tres tiempos de germinación (2, 4 y 6 días) a sus correspondientes temperaturas (21 y 29 °C)

6.1.1 Proteína en la variedad FPOC

En la **Tabla 1** y **Tabla 2** se presentan los resultados en porcentaje de proteína cruda (**PC**) y verdadera (**PV**), para la temperatura de 21 y 29 °C respectivamente; para conocer el porcentaje de nitrógeno no proteico (**NNP**).

Tabla 1. Contenido de nitrógeno y proteína (%) en FPOC germinado a 21 °C^a.

Muestra	N Total	NPV ^b	PC ^c	PV ^c	NNP ^d
FPOC S/G ^e	3.90±0.04	3.56±0.04	24.36±0.26	22.25±0.26	9.42
FPOC 2Días	3.71±0.09	3.39±0.14	23.18±0.56	21.20±0.86	8.63
FPOC 4Días	3.91±0.04	2.79±0.04	24.46±0.28	17.44±0.26	28.65
FPOC 6Días	4.27±0.12	2.91±0.02	26.71±0.73	18.16±0.13	31.85

^a. Se presentan los valores promedios ± desviación estándar (n=3).

^b. NPV: Porcentaje de nitrógeno en la cuantificación de proteína verdadera.

^c. Contenido de proteína= (N × 6.25)

^d. $NNP = \frac{[(\%N \text{ Total}) - (\%NPV)]}{\%N \text{ Total}} \times 100$

^e. S/G: Sin germinación.

Se encontró que el contenido de proteína cruda (**PC**) en las semillas sin germinar fue de 24.36 % mientras que el contenido de proteína verdadera (**PV**) que fue de 22.25 %, lo que resulta en un 9.42 % de nitrógeno no proteico en la harina de la semilla sin germinar; este resultado es común

en los alimentos de origen vegetal, sobre todo en forrajes, gramíneas y leguminosas, tal como lo describe Sosulski & Gilbert (1990).

Trabajos previos (Higueldo-López, 2014; Aramendis-Tatis *et al.*, 2016) mostraron que los valores de porcentaje para la proteína cruda para *Vigna unguiculata*, se encuentran entre el 24 y 26 % para la forma no germinada (S/G), y se observa un aumento con el desarrollo de la germinación; sin embargo, se puede observar cómo se reduce el contenido de proteína verdadera (PV) de manera significativa, en un corto periodo de germinación (6 días), para ambas temperaturas; como consecuencia el porcentaje de nitrógeno no proteico (NNP) aumenta.

Tabla 2. Contenido de nitrógeno y proteína (%) en FPOC germinado a 29 °C^a.

Muestra	N Total	NPV ^b	PC ^c	PV ^c	NNP ^d
FPOC S/G ^e	3.90±0.04	3.56±0.04	24.36±0.26	22.25±0.26	9.42
FPOC 2Días	4.22±0.02	3.70±0.08	26.36±0.13	23.09±0.48	12.32
FPOC 4Días	5.05±0.06	2.66±0.07	31.59±0.40	16.66±0.49	47.13
FPOC 6Días	5.99±0.08	2.87±0.18	37.44±0.51	17.94±1.15	52.09

^a. Se presentan los valores promedios ± desviación estándar (n=3).

^b. NPV: Porcentaje de nitrógeno en la cuantificación de proteína verdadera.

^c. Contenido de proteína= (N × 6.25)

^d. $NNP = \frac{[(\%N \text{ Total}) - (\%NPV)]}{\%N \text{ Total}} \times 100$

^e. S/G: Sin germinación.

Dicho nitrógeno no perteneciente a alguna estructura proteica, puede tratarse de amoníaco, urea, aminoácidos, ácidos nucleicos, etc., dónde los dos primeros no tienen un valor nutritivo para animales monogástricos, pero resultan de gran importancia para los animales de poligástricos (rumiantes), ya que puede utilizar tanto nitrógeno proteico como nitrógeno no proteico, como resultado de la actividad de los microorganismos del rumen, una parte del nitrógeno de los alimentos

para los rumiantes puede administrarse, en reemplazo de las proteínas, en forma de compuestos nitrogenados sencillos (Garriz & López, 2002).

Para determinar si el NNP que aumenta durante el tiempo de germinación es o no viable para el caso de animales monogástricos o rumiantes, es necesario verificar si el nitrógeno encontrado corresponde a aminoácidos libres o de otro origen.

En términos generales se observa a 21 °C (**Tabla 1**) como el PC se mantiene hasta el sexto día de germinación, y el aumento del mismo a 29°C (**Tabla 2**). Sin embargo al comparar con los resultados respecto al NNP, en ambos casos, se muestra que solo representa la tendencia ascendente del nitrógeno no proteico, y el descenso de PV.

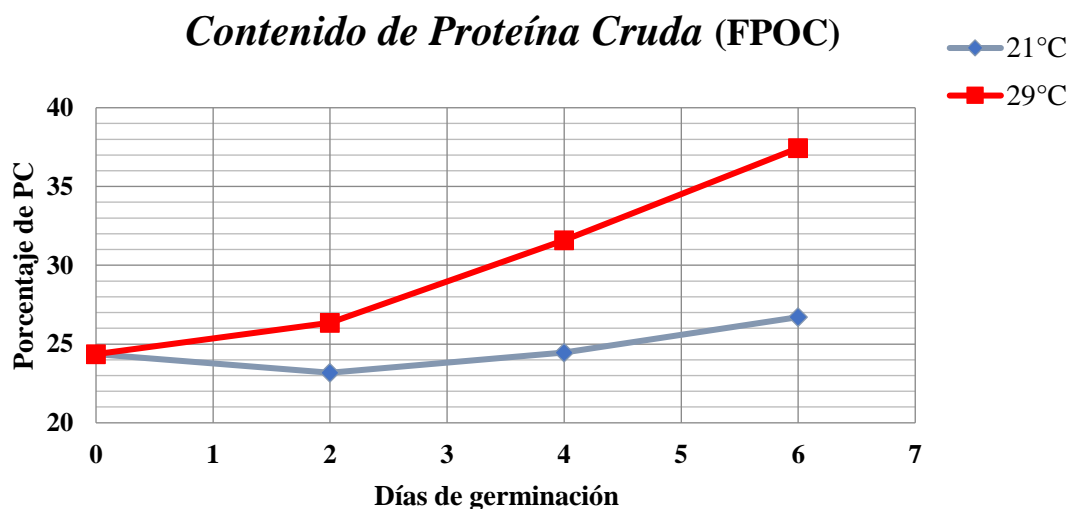


Figura 9. Efecto del tiempo de germinación en el contenido de Proteína Cruda para FPOC a 21 °C y 29 °C.

Algunas investigaciones anteriores (Jara *et al.*, 1981; Sathie & Venkataraman, 1983) es notable una disminución en los carbohidratos y proteínas de reserva, así como un aumento en los azúcares libres, aminoácidos y péptidos, lo que podría relacionarse, en este estudio, con el aumento en el porcentaje de NNP.

Con el inicio de la imbibición (entre el día 0 y 2 de germinación) se reanuda la actividad metabólica de la semilla y de acuerdo con Matilla (2008), la hidratación de la semilla provoca la hidrólisis de algunas formas "conjugadas" de fitohormonas y su transformación en "libres". A partir de esta liberación, se inicia la acción hormonal del proceso de desarrollo que conduce a la germinación de la semilla, lo que podría ser otra explicación para el ascenso en el contenido de NNP, tal cómo se observa en la **Figura 10**.

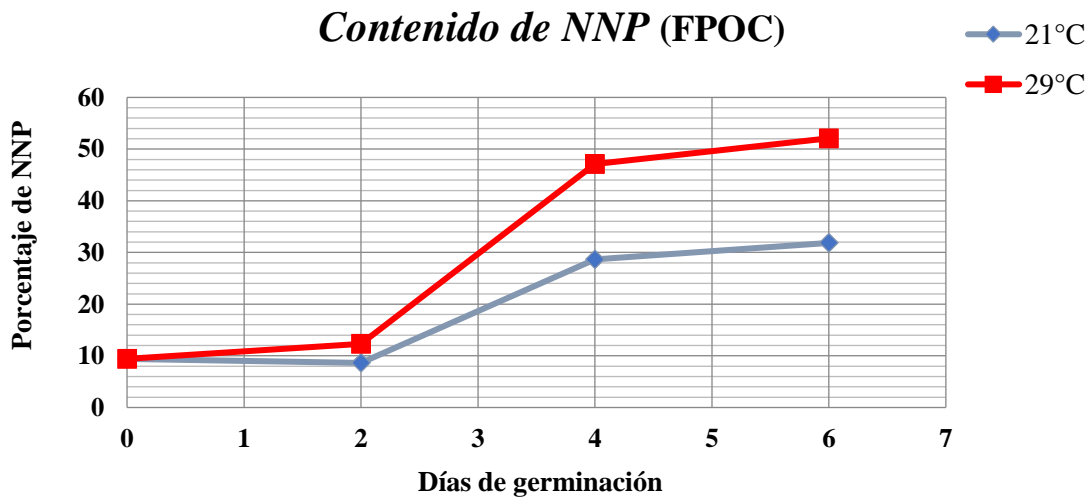


Figura 10. Efecto del tiempo de germinación en el contenido de Nitrógeno No Proteico para FPOC a 21 °C y 29 °C.

Debido a que al principio de la hidratación las células cotiledonares contienen granos de almidón, cuerpos proteicos y liposomas, se puede observar un aumento en el contenido de nitrógeno no proteico debido al comienzo de la degradación de sustancias de reserva, entre ellas la hidrólisis de las proteínas (Mauseth, 2014), iniciando la liberación de aminoácidos.

De acuerdo con Bewley (1997) el transporte hacia afuera de los cotiledones, y su posterior reconformación de los aminoácidos a nuevas proteínas, se inicia después de 5 a 6 días, una vez formada por completo

la plantúla, por lo que se puede especular, en este caso, que después de este periodo se observaría un aumento en el contenido de proteína real (PV).

6.1.2 Proteína en variedad FPCN

En la **Tabla 3** y **Tabla 4** se presentan los resultados en porcentaje de proteína cruda (PC) y verdadera (PV), para la variedad de frijol pelón corazón negro **FPCN**, a las temperaturas de 21 y 29 °C respectivamente; con el fin de conocer el porcentaje de nitrógeno no proteico (NNP).

Tabla 3. Contenido de nitrógeno y proteína (%) en FPCN germinado a 21 °C^a.

Muestra	N Total	NPV ^b	PC ^c	PV ^c	NNP ^d
FPCN S/G ^e	3.56±0.04	3.25±0.02	22.25±0.24	20.33±0.14	8.71
FPCN 2Días	3.39±0.03	2.90±0.02	21.17±0.19	18.09±0.12	14.45
FPCN 4Días	3.65±0.13	2.57±0.15	22.84±0.83	16.04±0.92	29.59
FPCN 6Días	3.86±0.12	2.69±0.13	24.11±0.74	16.81±0.80	30.31

^a. Se presentan los valores promedios ± desviación estándar (n=3).

^b. NPV: Porcentaje de nitrógeno en la cuantificación de proteína verdadera.

^c. Contenido de proteína= (N × 6.25)

^d. NNP= $\frac{[(\%N \text{ Total}) - (\%NPV)]}{\%N \text{ Total}} \times 100$

^e. S/G: Sin germinación.

Ya que existe un recambio de proteínas durante los primeros seis días de la germinación en las dicotiledóneas, se puede inferir que el estudio puede representar la degradación de proteínas de reserva de la aleurona, para su reutilización de los aminoácidos en la síntesis de nuevas enzimas hidrolíticas (Azcon-Bieto, 1996).

Al igual que la variedad de FPOC, el contenido de NNP muestra un porcentaje común para legumbres, con 8.71 %, (**Tabla 1, Tabla 2**). El comportamiento es similar para los días en que sucede la germinación, a 21 °C y 29 °C, llegando a tener el 50 % del nitrógeno no proteico para el sexto día, germinado a 29 °C.

Tabla 4. Contenido de nitrógeno y proteína (%) en FPCN germinado a 29 °C^a.

Muestra	N Total	NPV ^b	PC ^c	PV ^c	NNP ^d
FPCN S/G ^d	3.56±0.04	3.25±0.02	22.25±0.24	20.33±0.14	8.71
FPCN 2Días	4.39±0.05	3.03±0.06	27.41±0.31	18.94±0.35	30.98
FPCN 4Días	4.35±0.07	2.57±0.01	27.16±0.41	16.07±0.09	40.92
FPCN 6Días	4.56±0.04	2.22±0.18	28.52±0.24	13.88±1.12	51.32

^a. Se presentan los valores promedios ± desviación estándar (n=3).

^b. NPV: Porcentaje de nitrógeno en la cuantificación de proteína verdadera.

^c. Contenido de proteína= (N × 6.25)

^d. $NNP = \frac{[(\%N \text{ Total}) - (\%NPV)]}{\%N \text{ Total}} \times 100$

^e. S/G: Sin germinación.

Se observa un aumento importante en el contenido de proteína cruda (**Figura 11**), pero que es explicado a mayor detalle con la tendencia ascendente del contenido de nitrógeno no proteico (**Figura 12**).

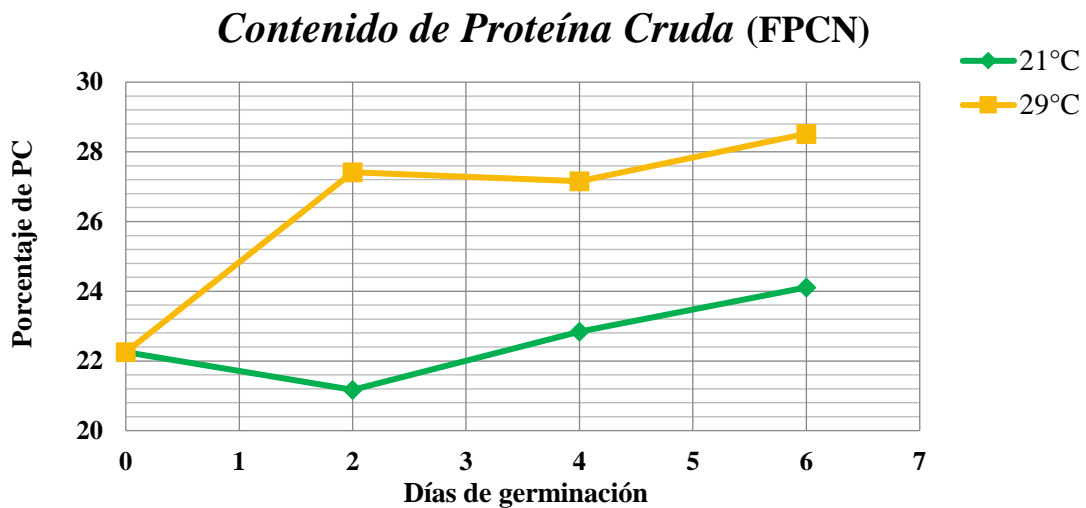


Figura 11. Efecto del tiempo de germinación en el contenido de Proteína Cruda para FPCN a 21 °C y 29 °C.

Este nitrógeno no proteínico puede provenir de aminoácidos libres, debido a la hidrólisis de proteínas durante el proceso de germinación, ya que se ha reportado que las reservas de carbohidratos se terminan y una parte

de la proteína puede ser usada como sustrato respiratorio (Chen *et al.*, 1975).

Es importante mencionar que no solo ocurre el proceso de proteo-síntesis durante la germinación, también se inicia la proteólisis por las células aleuronares liberando enzimas proteolíticas (endo y exopeptidasas), que resultaron ser mayores a las de la proteo-síntesis (Rosabal-Ayan *et al.*, 2014).

El recambio explicaría el aumento de NNP para el día 6 de germinación y su respectiva dependencia a la temperatura a 29 °C , tal como se observa en la **Figura 12**.

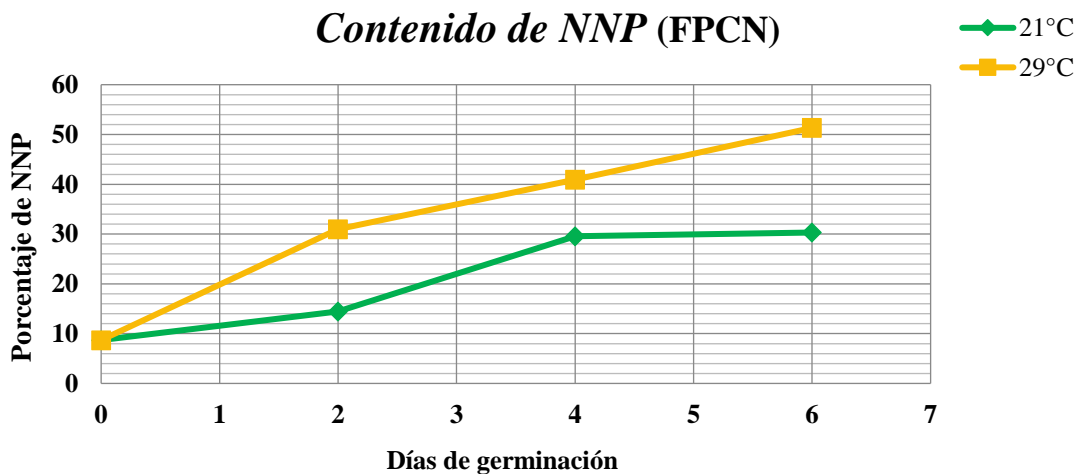


Figura 12. Efecto del tiempo de germinación en el contenido de Nitrógeno No Proteico para FPCN a 21 °C y 29 °C.

Resultados similares a los obtenidos en este trabajo, han sido reportados por otros autores para otras legumbres germinadas, donde se ha observado invariablemente que la proteína cruda se incrementa conforme avanza el tiempo de germinación, al igual que el nitrógeno no proteico (Shah *et al.*, 2011; Rumiayati *et al.*, 2012; Wongsiri *et al.*, 2015; de Silva *et al.*, 2017). De tal forma que el incremento de la cantidad de nitrógeno se puede explicar por los productos de la biosíntesis o hidrólisis

de enzimas o proteínas, presencia de ácidos nucleicos, aminoácidos libres y polipéptidos.

Es importante destacar la presencia del NNP en un alimento determinado, principalmente en caso de fórmulas infantiles (Agostini *et al.*, 2000; Pérez-Conesa *et al.*, 2005) ya que el ser humano requiere principalmente la proteína verdadera y sus aminoácidos esenciales, para llevar a cabo parte de sus funciones vitales. Por ello, sería conveniente determinar que aminoácidos libres u otros componentes nitrogenados están presentes en este NNP, ya que caso contrario al humano; para animales multigástricos, como lo son los rumiantes, el NNP es una de las fuentes de nitrógeno importante y valioso para el desarrollo de esos organismos (DairyCo, 2013; Jin *et al.*, 2018).

Por ejemplo, las recomendaciones para la concentración de proteína bruta en las raciones de vacas lecheras varía entre el 12% para una vaca seca hasta 18% para una vaca en plena lactación. El nitrógeno no proteico puede ser especialmente utilizado cuando la ración contiene menor de 12-13% de proteína bruta (Wheeler, 2006).

6.2.0 Digestibilidad proteica *In vitro*

En parte el valor nutritivo de las proteínas depende de su disponibilidad, en este estudio se evaluó la digestibilidad *in vitro* de este nutriente, para ambas variedades de *Vigna unguiculata*, y sus respectivas temperaturas de germinación, a través de un sistema multi-enzimático simulando la digestión enzimática de un organismo monogástrico como lo es el ser humano.

6.2.1 Digestibilidad en FPOC

En la **Tabla 5**, se presentan los resultados de digestibilidad proteica *in vitro* para la variedad de *Vigna unguiculata*, frijol pelón ombligo café

(FPOC), desde la semilla sin germinación hasta el día 6 de este proceso biológico, para ambas temperaturas (21 y 29 °C).

Tabla 5. Digestibilidad proteica *in vitro* en FPOC, germinado a 21 °C y 29 °C^a.

Muestra	%D(21 °C) ^b	%D(29 °C) ^c
FPOC S/G ^d	74.51±0.83	74.51±0.83
FPOC 2 días	68.79±2.75	65.79±0.84
FPOC 4 días	67.89±1.12	61.05±1.25
FPOC 6 días	63.91±1.30	62.86±1.33

^a. Valor promedio ± desviación estándar; (n=3)

^b. % de digestibilidad proteica en muestras germinadas a 21 °C.

^c. % de digestibilidad proteica en muestras germinadas a 29 °C.

^d. S/G: Sin proceso de germinación.

Para presentar gráficamente la disminución de la digestibilidad proteica *in vitro*, se muestra la **Figura 13**.

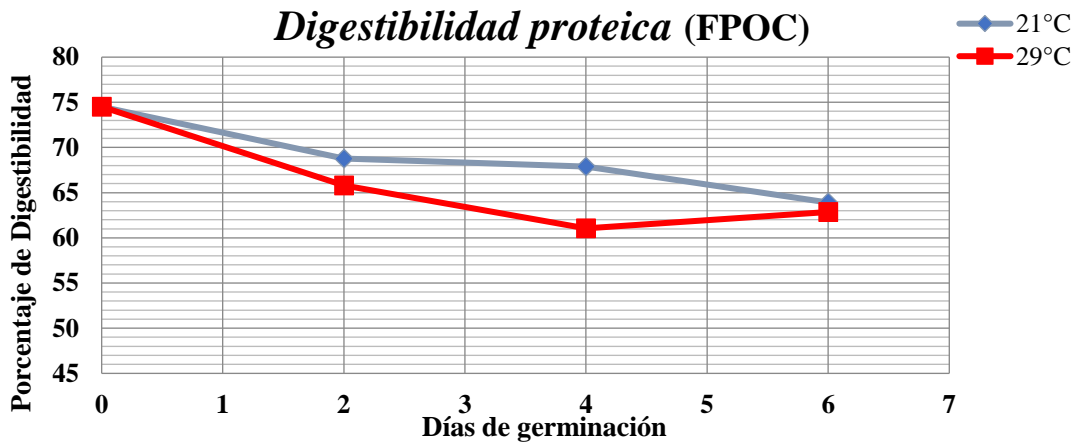


Figura 13. Efecto del tiempo de germinación en la Digestibilidad proteica para FPOC a 21 °C y 29 °C.

Para esta determinación, se observó que la tendencia es similar para ambas temperaturas, aunque disminuyó con mayor rapidez a 29 °C.

El decremento de la digestibilidad *in vitro* de la proteína es de 74.51 % a aproximadamente 63 %; lo anterior concuerda con lo reportado por Harmuth & Hoene (1988), quienes encontraron que la digestibilidad de la

proteína en semillas de frijol mungo (*Vigna radiata*), disminuyó de 82 % a 79 % durante un periodo de germinación en cuatro días.

6.2.2 Digestibilidad en FPCN

Los resultados de la **Tabla 6**, corresponden a los datos de digestibilidad proteica in vitro para la variedad de *Vigna unguiculata*, frijol pelón corazón negro (**FPCN**) a 21 °C y 29 °C de germinación, y sus respectivos tiempos de germinación.

Se observa que el valor más alto de digestibilidad *in vitro* corresponde al frijol sin germinación, con el 77.22 % de digestibilidad proteica, lo que resulta en una digestibilidad aceptable, ya que para la leguminosa *Phaseolus vulgaris* presenta una digestibilidad del 59 %, de acuerdo a Sgarbieri (1982).

Tabla 6. Digestibilidad proteica *in vitro* en FPCN, germinado a 21 °C y 29 °C^a.

Muestra	%D(21°C) ^b	%D(29°C) ^c
FPCN S/G ^d	77.22±1.16	77.22±1.16
FPCN 2 días	77.47±1.37	64.74±0.23
FPCN 4 días	68.27±0.34	62.56±0.34
FPCN 6 días	66.02±0.26	59.85±0.47

^a. Valor promedio ± desviación estándar; (n=3)

^b. % de digestibilidad proteica en muestras germinadas a 21 °C.

^c. % de digestibilidad proteica en muestras germinadas a 29 °C.

^d. S/G: Sin germinación.

Sin embargo, la tendencia, al igual que en la variedad **FPOC (Figura 13)**, desciende como avanza el tiempo de germinación tal como muestra la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, donde la menor digestibilidad se presentó el día 6 de germinación a 29 °C con apenas el 60 %; también se puede observar la dependencia con la temperatura en la velocidad con la que decrece la digestibilidad.

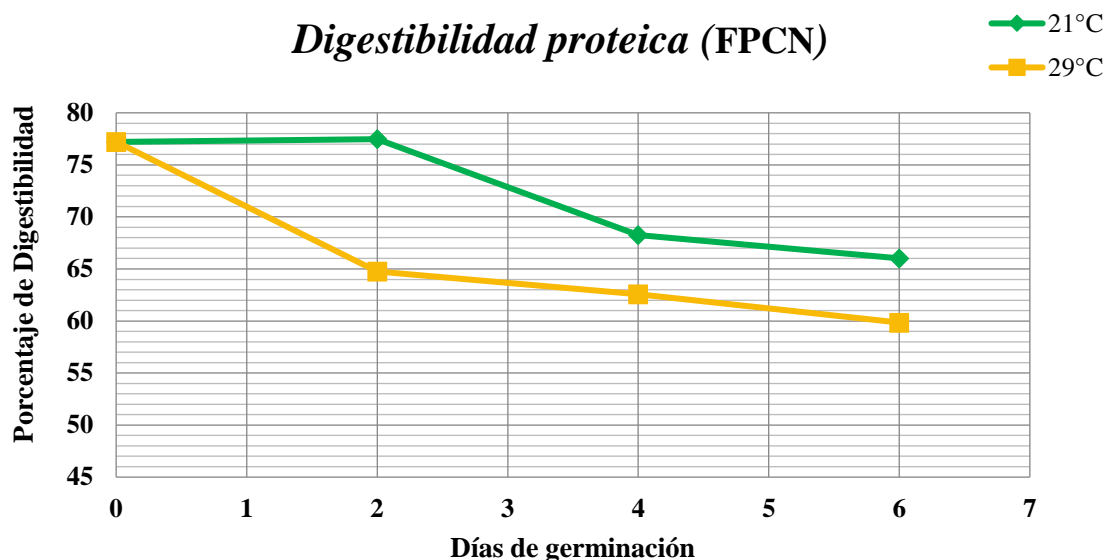


Figura 14 Efecto del tiempo de germinación en la Digestibilidad proteica para FPCN 21 °C y 29 °C.

La tendencia decreciente de la digestibilidad podría deberse a la interacción de ciertos componentes presentes en el frijol, que pueden interferir con la actividad enzimática, como sería el caso de los inhibidores de proteasas, inhibiendo la tripsina y la quimiotripsina, por la formación de complejos estables e inactivos, ocasionando una hidrólisis incompleta de las cadenas peptídicas; además, si como avanzó la germinación se presenta la ruptura de las proteínas y liberación de aminoácidos al colocar el sistema multi-enzimático, éste ya tendrá mucho menos enlaces peptídicos que hidrolizar y menor liberación de protones (H^+) lo que indicara baja digestibilidad, de acuerdo a la metodología empleada, por lo que si se realizase un estudio de digestibilidad *in vivo*, los resultados podrían ser diferentes, mostrando mayor asimilación de estos aminoácidos libres.

Inhibidores de Tripsina

Ya que los inhibidores de tripsina se encuentran entre los principales factores tóxicos naturales que pudiesen interferir en la digestibilidad

proteica basal y es común encontrar en muchos recursos vegetales que se utilizan con fines alimenticios

6.2.3 Contenido de U.T.I en variedad FPOC

Los resultados de inhibidores de tripsina correspondientes a frijol pelón ombligo café, **FPOC**, se presentan en la **Tabla 7**, a sus correspondientes tiempos y temperaturas de germinación.

Tabla 7. Inhibidores de Tripsina FPOC, germinado a 21 °C y 29 °C^{ab}.

Muestra	U.T.I./mg(21°C) ^c	U.T.I. /mg(29°C) ^d
FPOC S/G	8.89±0.11	8.89±0.11
FPOC 2 días	4.20±0.09	5.55±0.37
FPOC 4 días	6.39±0.47	15.78±0.65
FPOC 6 días	6.77±0.15	16.79±0.15

^a Expresado en Unidades de Tripsina Inhibida en un miligramo de muestra (UTI/mg)

^b Valor promedio ± desviación estándar; determinación por triplicado (n=3)

^c Contenido de UTI/mg en muestras germinadas a 21 °C.

^d Contenido de UTI/mg en muestras germinadas a 29 °C.

En la **Figura 15**, se comparan ambas temperaturas de germinación y se observa una disminución en el contenido de inhibidores de tripsina para el día 2, sin embargo, en los días posteriores, se muestra una tendencia de incremento en el contenido de este factor anti-nutritivo, en particular para la germinación a 29 °C.

La tendencia para la germinación a 29 °C, podría explicar, en cierta medida, la disminución de la digestibilidad proteica *in vitro* a lo largo de la germinación observada en este estudio; ya que estos compuestos de naturaleza proteínica inhiben la acción de las enzimas digestivas (Alizadeh, 2012).

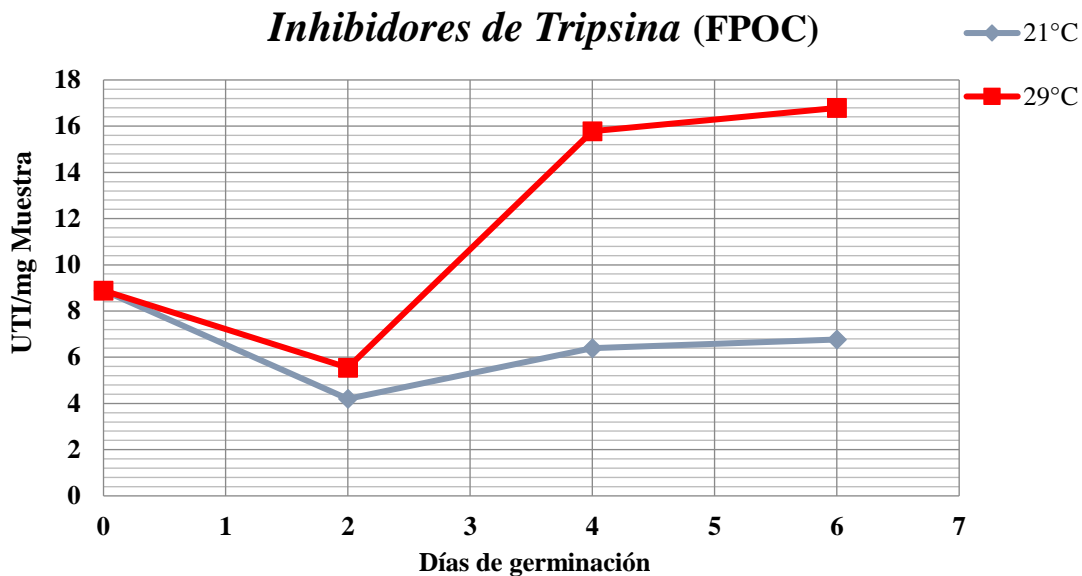


Figura 15 Efecto del tiempo de germinación en el contenido de inhibidores de tripsina para FPOC a 21 °C y 29 °C.

Para el tratamiento a 21 °C, no muestra claramente ninguna tendencia, ya que se muestra en la **Tabla 7** que al final se obtiene un valor cercano al inicial, y de manera más grafica en la **Figura 15** ; sin embargo a 29 °C de germinación, para el día 2 de tratamiento, se muestra una ligera disminución mientras que para los siguientes días se observó un incremento en la concentración, presentando un riesgo al estar por encima del límite máximo permitido, de acuerdo con Kakade, con 15.78 U.T.I./mg y 16.79 U.T.I./mg, respectivamente para 4 y 6 días.

Según Rajesh *et al.* (2005) ha descrito como los inhibidores forman complejos con las enzimas, bloqueando el sitio catalítico o modificando la conformación de la enzima, lo cual trae como consecuencia la reducción de la actividad catalítica, lo que podría explicar la tendencia decreciente de la digestibilidad de proteína *in vitro* que se observó anteriormente (ver pág. 54).

6.2.4 Contenido de U.T.I en variedad FPCN

En la **Tabla 8**, se muestran los resultados obtenidos para el contenido de inhibidores de tripsina en la muestra de frijol pelón corazón negro, **FPCN**, germinados a 21 y 29 °C, para los diferentes periodos de germinación.

Tabla 8. Inhibidores de Tripsina en FPCN, germinado a 21 °C y 29 °C^{ab}.

Muestra	U.T.I./mg(21 °C) ^c	U.T.I. /mg(29 °C) ^d
FPOC S/G	6.19±0.40	6.19±0.40
FPOC 2 días	8.52±0.60	5.56±0.18
FPOC 4 días	7.04±0.50	6.86±0.13
FPOC 6 días	10.48±0.96	8.42±0.10

^aExpresado en Unidades de Tripsina Inhibidas en un miligramo de muestra (UTI/mg)

^bValor promedio ± desviación estándar; determinación por triplicado (n=3)

^cUTI/mg(21°C): Contenido de UTI/mg en muestras germinadas a 21 °C.

^dUTI/mg(29°C): Contenido de UTI/mg en muestras germinadas a 29 °C.

El contenido de inhibidores de tripsina para FPCN en su forma no germinada fue de 6.19 UTI/mg, debajo del límite máximo permitido, propuesto por Kakade, al igual que la forma no germinada de FPOC (**Tabla 7**).

En la **Figura 16** se presenta el comportamiento de ambos tratamientos, donde se observa el incremento en el contenido de inhibidores de tripsina desde el día 2 para 21 °C y el día 4 para 29 °C; para el día 6 de la germinación a 21 °C el contenido de UTI/mg está ligeramente por encima del límite máximo permitido propuesto por Kakade, con 10.48 UTI/mg.

Los inhibidores de la tripsina como proteínas (globulinas) son capaces de inhibir la tripsina y la quimiotripsina pancreática (García-Esteban, 2014), impidiendo la hidrólisis proteica, lo que puede interferir en la determinación de digestibilidad proteico *in vitro*.

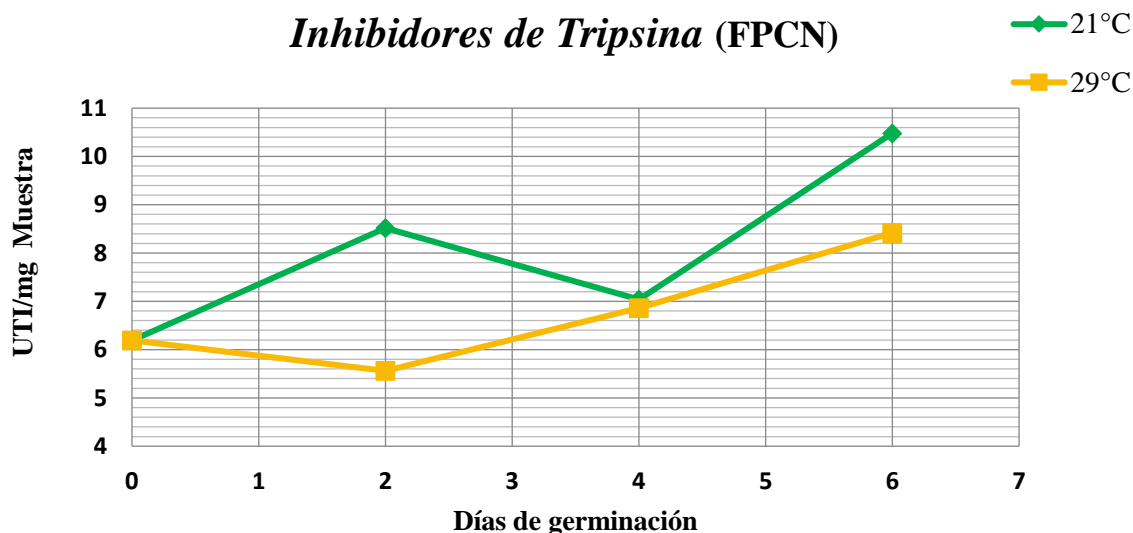


Figura 16. Efecto del tiempo de germinación en el contenido de inhibidores de tripsina para FPCN a 21 °C y 29 °C.

El comportamiento ascendente puede deberse a que conforme a la planta se va desarrollando, empieza el aumento de algunos agentes anti-nutritivos, como los inhibidores de tripsina como mecanismo de defensa (Blanco-Labra & Aguirre-Mancilla, 2002); los inhibidores de proteasas se acumulan durante la maduración de la semilla o tubérculo sugiriéndose que estos elementos facilitan la acumulación de proteínas de reserva atenuando las actividades de las proteasas. Se presume que una función es la de protección de las semillas al ataque de herbívoros durante la embriogénesis y maduración (Pearce *et al.*, 1988).

Algunos autores (Belmar, 2001; Salgado & Valdez, 2006) muestran que el efecto más importante de los inhibidores de proteasas es la inhibición del crecimiento, producida principalmente por la inactivación de la tripsina y quimotripsina, debido a la formación de complejos estables e inactivos, debido a una hidrólisis incompleta de las cadenas peptídicas por parte de estas enzimas digestivas y por consiguiente, una disminución en la digestibilidad de la proteína.

De confirmarse posteriormente en un ensayo *in vivo*, que los inhibidores que se obtuvieron en este estudio son suficientes para la disminución de la digestibilidad *in vivo*, estos inhibidores podrían conjuntamente ocasionar un aumento en la secreción pancreática de las enzimas digestivas como tripsina, elastasa, amilasa y quimotripsina; todas estas ricas en aminoácidos, principalmente azufrados como las cisteína y metionina, dando como resultado la pérdida de proteína endógena, además de la subutilización de la proteína dietaria (Muzquiz *et al.*, 2006).

6.3.0 Lectinas (Fitohemaglutininas)

Debido a que las lectinas se encuentran presentes en la mayoría de las especies de legumbres, en contenido variable, a algunas de ellas se les considera como enterotoxinas, ya que aparte de disminuir la absorción inespecífica de nutrientes, pueden causar un daño severo al epitelio gastrointestinal, por lo que se realizó la determinación semicuantitativa de estos factores tóxicos naturales, de tipo termosensibles.

6.3.1 Contenido de UHG en FPOC

El contenido de lectinas o fitohemaglutininas se presentan en la **Tabla 9**, para el frijol pelón ombligo café, **FPOC**, a sus respectivos tiempos y temperaturas (21 y 29 °C) de germinación.

Tabla 9. Contenido de lectinas en FPOC, germinado a 21 °C y 29 °C^{ab}.

Muestra	UHG/g(21 °C) ^c	UHG/g(29 °C) ^d
FPOC S/G	0.466	0.466
FPOC 2 días	0.092	0.034
FPOC 4 días	0.092	0.092
FPOC 6 días	- ^e	0.034

^a Expresado en Unidades de Hemaglutinación en un gramo de muestra (UHG/g)

^b Se presentan los valores de la mediana (n≥5)

^c Contenido de UHG/g en muestras germinadas a 21 °C.

^d Contenido de UHG/g en muestras germinadas a 29 °C.

^e Debajo del límite de detección (<0.007 UHG/g muestra)

A partir del día 6 de germinación a 21 °C, ya no es posible detectar el contenido de lectinas mediante este método, por lo que se puede inferir que se encuentra por debajo del límite de detección (0.007 UHG/g que equivale a menos de 7 ppm o sea trazas).

Para ambos tratamientos existe una tendencia decreciente en el contenido de lectinas y en la **Figura 17** se presenta gráficamente este descenso.

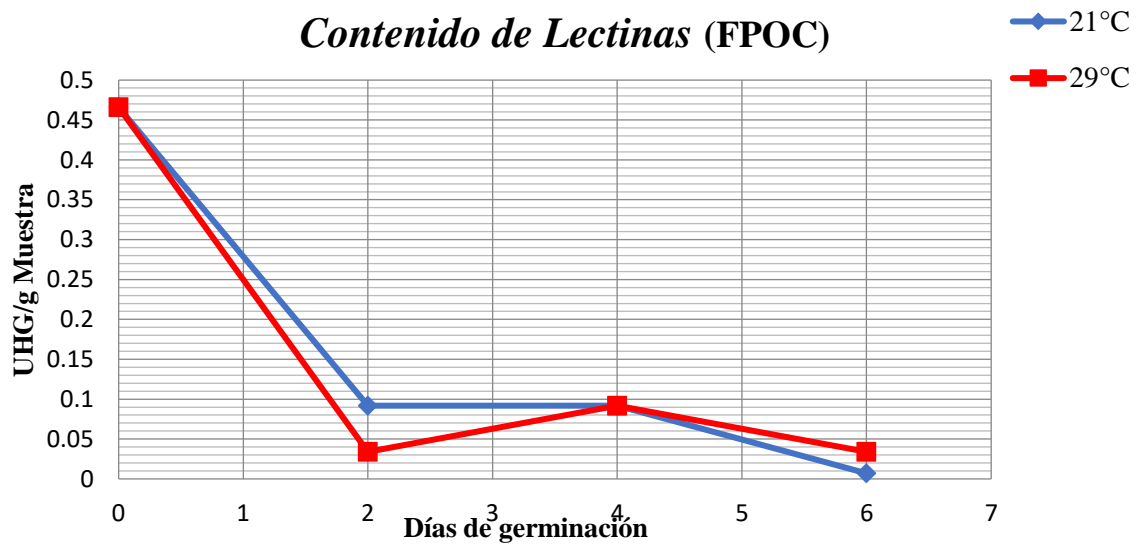


Figura 17. Efecto del tiempo de germinación en el contenido de lectinas en FPOC a 21 °C y 29 °C. Siendo el límite de detección el valor más bajo.

De acuerdo con González-Paredes (2001) el nivel de lectinas, en caso de frijol Mayocoba (*Phaseolus vulgaris*), que no produce daños clínicos debe ser menor de 1 UHG/g), del mismo modo describe como en ratas con una dieta con un nivel de lectinas de 8.015 UHG/g, al 11° día de dieta mostró una mortalidad de 88% y el resto arrojó una digestibilidad *in vivo* de 51 %, siendo que el control dio una digestibilidad de 95 %, además de manifestar daños hematológicos y efectos en la relación porcentual del hígado, riñones y pulmones.

6.3.2 Contenido de UHG en variedad FPCN

A continuación, en la **Tabla 10** se presentan los resultados de frijol pelón corazón negro, **FPCN**, para el contenido de fitohemaglutininas, a sus respectivos tiempos y temperaturas de germinación.

Tabla 10. Contenido de lectinas en FPCN, germinado a 21 °C y 29 °C^{ab}.

Muestra	UHG/g(21 °C) ^c	UHG/g(29 °C) ^d
FPOC S/G	0.549	0.549
FPOC 2 días	0.200	0.092
FPOC 4 días	0.034	- ^e
FPOC 6 días	- ^e	- ^e

^a Expresado en Unidades de Hemaglutinación entre gramo de muestra (UHG/g)

^b Se presentan los valores de la mediana (n≥5)

^c Contenido de UHG/g en muestras germinadas a 21 °C.

^d Contenido de UHG/g en muestras germinadas a 29 °C

^e Debajo del límite de detección (<0.007 UHG/g muestra)

El contenido de lectinas en esta variedad (FPCN) es ligeramente mayor a la variedad FPOC, con 0.549 UHG/g contra 0.466 UHG/g respectivamente, lo que pudiera tener un cierto riesgo según el trabajo previo realizado (González, 2001); sin embargo, se puede observar que a 21 °C hasta el día 6, se presenta la reducción en el contenido de lectinas hasta por debajo del límite de detección del método empleado; mientras que a 29 °C esta reducción del nivel de lectinas es más temprana, ya que desde el cuarto día ya no es detectable con el método aplicado.

A su vez, en la **Figura 18**, se presenta gráficamente el decremento del contenido de fitohemaglutininas en FPCN.

Se puede observar una reducción importante de este factor tóxico natural hasta por debajo del límite de detección para los 4 y 6 días de germinación para 29 y 21 °C, además de observar una dependencia en la velocidad de disminución del contenido de lectinas con la temperatura de germinación.

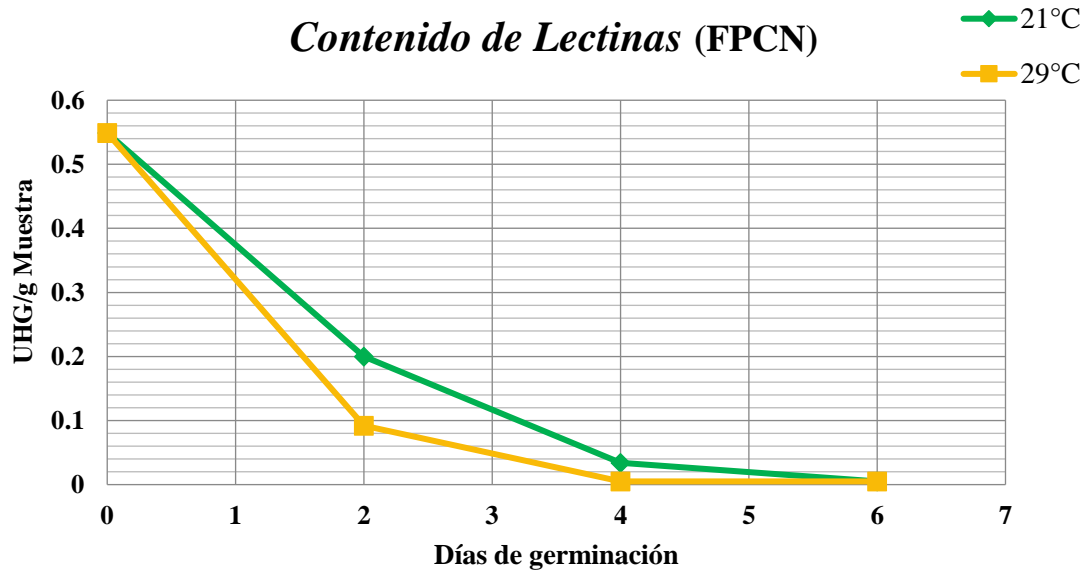


Figura 18. Efecto del tiempo de germinación en el contenido de lectinas en FPOC a 21 °C y 29 °C. Siendo el límite de detección el valor más bajo.

De acuerdo con González-León *et al.* (2011), en las plantas se ha detectado principalmente en los cotiledones y endospermos, que constituyen entre el 2 y 10 % del total de las proteínas de las semillas, y la concentración de estas decrece progresivamente durante el proceso de germinación, esta disminución de lectinas puede ser explicada a que la hidrólisis y el transporte de almidón, durante la germinación y crecimiento de las leguminosas, las lectinas vegetales podrían estar involucradas en el almacenamiento y transporte de los hidratos de carbono de las mismas (Vandenborre *et al.*, 2011).

En esta investigación se puede apreciar que, a diferencia de la mayoría de las legumbres, estas variedades de *Vigna unguiculata* (FPOC y FPCN), muestran un contenido lectinas relativamente bajo, por lo que no representan un problema a nivel tóxico, pero sí de absorción de nutrientes como la vitamina B₁₂.

7 Conclusiones

7.1.0 Generales

Se corroboró el contenido e incremento de PC, a través del desarrollo de germinación inducida, encontrados en trabajos previos; sin embargo el presente trabajo mostró que contenido de PV disminuyó de manera significativa, conforme avanzó el tiempo de germinación, inversamente proporcional a lo que se encontró de NNP.

No se obtuvo una mejora en la digestibilidad proteica *in vitro* a través del tiempo de germinación, observando un comportamiento similar a un trabajo previo en las mismas variedades de frijol. Para el caso de lectinas, se observó un descenso significativo de este factor tóxico natural hasta nivel trazas (ppm).

7.2.0 Particulares

- Con el proceso de germinación no se observó un aumento del contenido de proteína verdadera y muestra un incremento importante en la concentración del nitrógeno no proteico, llegando hasta ser el 30 % del nitrógeno total, para el caso de la germinación a 21 °C, y hasta el 50 % para el caso de la germinación a 29 °C, para ambas variedades; dicho porcentaje es común en los recursos vegetales que se suelen usar para fines alimenticios. Para concluir si este proceso mejora la disponibilidad de la proteína en animales monogástricos, sería conveniente verificar si parte del NNP corresponde a aminoácidos libres, a partir de pruebas biológicas *in vivo*.
- El aumento en el NNP, puede resultar importante para animales no monogástricos, como los son los rumiantes, por lo que conviene verificar a *posteriori* si dicho nitrógeno es conveniente para uso

forrajero, y por lo tanto, este proceso de germinación mejora la calidad nutrimental en esta matriz alimenticia.

- Se observa una tendencia descendente en los resultados de digestibilidad proteica *in vitro*, en ambas variedades, observando que para el caso de FPOC la digestibilidad no depende directamente de la temperatura, mientras que para FPCN, se observa un descenso más rápido a 29 °C. Esta tendencia puede ser en parte justificable debido al incremento en el contenido de inhibidores de tripsina; no obstante, en la mayoría de los casos, estos se encontraban en el límite permisivo o debajo de éste (10 UTI/mg de muestra); sin embargo el método utilizado para dicha cuantificación (multi-enzimático *in vitro*) es muy sensible a cualquier agente externo.
- Las variedades de frijol presentan bajo contenido de lectinas (< 1 UHG/g de muestra), lo que no constituye en un peligro tóxico, pero si una probable disminución en la de absorción de nutrientes, por lo que el presente estudio mostró como el proceso de germinación disminuye notablemente este factor tóxico natural.
- Para la variedad de FPOC la disminución de lectinas, mediante el proceso de germinación, no depende de la temperatura, pues en ambos casos del proceso los niveles de lectinas se disminuye con la misma rapidez; mientras que, para la variedad de FPCN se observa una dependencia por temperatura de germinación con la disminución de lectinas, ya que se disminuye a mayor rapidez a 29 °C de temperatura de germinación, al ya no detectar dicho factor tóxico natural a partir del día 4.

8 Referencias

- 1 American Chemical Society Symposium Series. (1997). Antinutrients and phytochemicals in food. Memorial University of Newfoundland. Washington. *American Chemical Society*.
- 2 Agostoni, C., Carratu, B., Boniglia, C., Riva, E. & Sanzini, E. (2000). Free Amino Acid Content in Standard Infant Formulas: Comparison with Human Milk. *Journal of the American College of Nutrition*. 19(4). Pp. 34-38.
- 3 Alizadeh H. L. & Edwards, Y. (2012). Changes in trypsin inhibitory activity of developing seed parts and pod of red kidney bean. *Agronomy New Zealand*. 42. Pp. 171-180
- 4 Alonso-del-Rivero, M., González, Y., Pascual, I., García, R., Delfín, J., Díaz, J., & Chávez, M. A. (2013). Multifunctional proteases inhibitors of proteic nature. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*. 2(1). Pp.14-21.
- 5 Association of Official Agricultural Chemist (AOAC) (2006). Authors Official Methods of Analysis Proximate Analysis and Calculations *Crude Protein meat and meat Products, Including Pets Foods of Analytical communities*. (17th edition) Gaithersburg.
- 6 Araneda, M. (2018, mayo 10). Obtenido el 12 de noviembre 2018. *Legumbres, composición y propiedades*. Recuperado de: <http://www.edualimentaria.com/legumbres-composicion-y-propiedades>
- 7 Araméndiz-Tatis, H., Cardona-Ayala, C. E. & Combatt-Caballero, E. M. (2016). Contenido Nutricional de Líneas de Fríjol Caupí (***Vigna unguiculata L. Walp.***) Seleccionadas de una Población Criolla. *Información tecnológica*. 27(2). Pp. 53-60.
- 8 Azcon-Bieto, J. & Talon, M. (1996). *Fisiología y Bioquímica Vegetal*, Madrid. Interamericana MCGraw-Hill.
- 9 Belmar, R. (2001). Memorias del X congreso de veterinaria. *Importancia de los factores antinutricionales en la alimentación de animales no rumiantes*. Congreso de veterinaria. Yucatán. Universidad Autónoma de Yucatán. Pp. 34-54.
- 10 Berhaut, J. (1976) *Flore illustrée du Sénégal, Dicotylédones*. 5. Legumineuses Papilionacées. Direction de Eaux et Forêts. Dakar. Senegal.
- 11 Bewley, J. D. (1997). Breaking down the walls -a role for endo-b-mannanase in release from seed dormancy?. *Trends in Plant Science*. 2(12). Pp. 464-469.

- 12 Bewley, J. D. & Black, M. (1994). *Seeds: physiology of development and germination*. (2th edition). New York. Plenum Press.
- 13 Birk, Y. & Gertler, A. (1961). Effect of Mild Chemical and Enzymatic Treatments of Soybean Meal and Soybean Trypsin Inhibitors on Their Nutritive and Biochemical Properties. *The Journal Nutrition*. 75(4).Pp. 379-387.
- 14 Biswas, S., & Kayastha, A. M. (2004). Spectroscopic characterization of ***Phaseolus vulgaris*** leucoagglutinin. *Protein & Peptide Letters*. 11(1). Pp. 1-7.
- 15 Blanco-Labra, A. & Aguirre-Mancilla, C. (2002). Proteínas Involucradas en los Mecanismos de Defensa de las Plantas. *Acta Universitaria*. 12(3). P. 3-28.
- 16 Bonner, F. T., Vozzo, J. A., Elam, W. W. & Land, S. B. (1994). Tree Seed Technology Training Course. *Southern Forest Experimental Station*. Instructor´s Manual. New Orleans.
- 17 Bowman, D. E. (1944). Fractions derived from soybeans and navy beans which retard the trypsin digestion of casein. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 57. Pp. 139-140.
- 18 Boyd, W. & Shapleigh, E. (1954). Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*. 119. Pp. 419.
- 19 Brewer, C. F., Brown III, R. D. & Koenig, S. H. (1983). Stoichiometry of magnesium and calcium ion binding to concanavalin A. *Biochemistry*. 22(15). Pp. 691-702.
- 20 Bouquet, A. & Debray, M. (1974). Plantes médicinales de la Côte d'Ivoire. Travaux et Documents, *Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer*. 32(1). Pp. 229-247.
- 21 Busson, F., Jaeger, P., Lunven, P. & Pinta, M. (1965). Plantes alimentaires de l'Ouest africain : étude botanique, biologique et chimique. Marsella. Leconte. Pp. 579.
- 22 Chaparro-Rojas, D. C., Pismag-Portilla, R. Y., Elizalde-Correa, A., Vivas-Quila, N. J. & Erazo-Caicedo, C. A. (2010). Efecto de la germinación sobre el contenido y digestibilidad de proteína en semillas de amaranto, quinua, soya y guandul. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 8(1). P. 35-42.
- 23 Chen, L. & Thacker, R. (1978). Germination and nitrogenous constituents of pea seeds (***Pisium sativum***). *Journal of Food Science*. 43(6). Pp. 1884 -1886.

- 24 Chen, L., Wells, C. & Fordham, J. (1975). Germinated seeds for human consumption. *Journal of Science Food Agricultural*. 40(6). Pp. 1290-1294.
- 25 Colmenares-Samaoya, A. S. (1984). *Efecto de la germinación sobre la composición química y nutricional de la semilla de amaranto*. (Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias) Universidad de San Carlos. Ciudad de Guatemala.
- 26 Corbineau, F., Bagniol, S., & Côme, D. (1990). Sunflower (***Helianthus annuus*** L.) seed dormancy and its regulation by ethylene. *Israel Journal of Botany*. 39. Pp. 313-315.
- 27 Dávila, M., Sangronis, E. & Granito, M. (2003). Leguminosas germinadas o fermentadas: alimentos o ingredientes de alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 53. Pp. 348-350.
- 28 DairyCo. (2013, enero 10) The effect of reducing dietary crude protein on nitrogen utilisation, milk production, health and fertility in dairy cows. *University of Nottingham & Harper Adams University on behalf of DairyCo*. Pp. 1-41. https://dairy.ahdb.org.uk/media/864752/411098_fs2_protein_review_branded
- 29 De Dios, E. A., Porrilla, P. Y. & Chaparro, D. C. (2009). Factores antinutricionales en semillas. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 7(1). 168-174.
- 30 De Freitas, S. M., de Mello, L. V., Da Silva, M. C., Vriend, G., Neshich, G. & Ventura, M. M. (1997) Analysis of the black-eyed pea trypsin and chymotrypsin inhibitor- α -chymotrypsin complex. *Federation of the European Biochemical Societies Lettres*. 409(2). Pp. 121-128.
- 31 Du Silva, G. O., Aponso, M. M. W. & Abeyundara, A. T. (2017) Effect of germination time duration and processing method (cooking, pressure cooking and microwave cooking) on crude protein content of Mung bean (***Vigna radiate***). *International Journal of Biology Research*. 2(3). Pp. 68-70.
- 32 Elizalde, A., Porrilla, Y. & Chaparro, D. C. (2009). Factores antinutricionales en semillas. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 7(1). P. 45-54.
- 33 Espinosa-Moreno, J., Centurión-Hidalgo, D., Solano, M. & García-Gordillo, G. (2005). Leguminosas de Grano de Consumo Tradicional en Tabasco: Determinación de Contenido Nutricional. *VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Ciudad de Guanajuato. P. 312-316.

- 34 Estrada, G., Guillén, G., Olívares, J., Díaz, C., Alvarado, X. & Sánchez, F. (2007). La transformación genética y genómica del frijol. *Biotecnología*. 14. P. 280-290.
- 35 Espino-Solis, G. P. (2015) Lectins: A brief review. *Vitae, Revista de la facultad de ciencias farmacéuticas y alimentarias*. 22(1). P. 9-11.
- 36 Food and Agriculture Organization. (2015, octubre 15). ¿Qué son las legumbres?. Obtenido el 18 septiembre de 2018. Recuperado de: <http://www.fao.org/pulses-2016/news/news-detail/es/c/337279/>
- 37 Food and Agriculture Organization. (2016). *Legumbres: Semillas nutritivas para un futuro sostenible*. 2016 Año de las legumbres. ISBN 978-92-5-309463-9
- 38 Felsted, R. L., Leavitt, R. D., Chen, C., Bachur, N. R. & Dale, R. M. (1981). Phytohemagglutinin isolectin subunit composition. *Biochemical and Biophysical Acta*. 668. Pp. 132-140.
- 39 Flores-Vindas, E. (2013). Germinación y plántula En: Flores-Vindas, E. (2ª edición). *La Planta*. (P. 773-803). Cartago. Tecnológica de Costa Rica.
- 40 Frattali, V. & Steiner, R. F. (1969). Interaction of trypsin and chymotrypsin with a soybean proteinase inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 34(4). Pp.480-487.
- 41 Frederiq, L. (1878). Sur la digestion des albuminoids ches quelque invertebres. *Bulletins de l'Académie royale des sciences, des lettres et des beaux-arts de Belgique*. 46. Pp. 213-234.
- 42 García-Esteban, C. (2014). *Inhibidores de proteasas en leguminosas*. (Trabajo fin de grado, Nutrición Humana y Dietética. Área de Nutrición y Bromatología). Facultad de Medicina Universidad de Valladolid, Valladolid.
- 43 García-Mateos, R., Lucas, B., Zendejas, M., Soto, M., Martínez, M. & Sotelo, A. (1996). Variation of total nitrogen, non-protein nittrogen content, types of alkaloids at different stages of development in ***Erythrina*** americana seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44(29). Pp. 87-91.
- 44 Garriz, M. & López, A. (2002). Suplementación con nitrógeno no proteico en rumiantes. Obtenido el 20 de febrero de 2019. Recuperado de: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/suplementacion_proteica_y_con_nitrogeno_no_proteico/07-suplementacion_con_nitrogeno.pdf

- 45 Gaucín, D. (2016). Producción y consumo de legumbres (II). Obtenido el 18 de septiembre 2018. *El Economista*. Recuperado de: <https://www.economista.com.mx/opinion/Produccion-y-consumo-de-legumbres-II-20160616-0006>
- 46 Gennis, L. S. & Cantor, C. R. (1976). Double-headed protease inhibitors from black-eyed peas. I. Purification of two new protease inhibitors and the endogenous protease by affinity chromatography. *Journal of Biological Chemistry*. 251. Pp. 734-740.
- 47 González- León, S., Caso de Armas, D. & González-Chávez, A. (2011). Lectin: a biomolecule that promises in biomedical sciences. *Revista Ciencias Médicas*. 15(2). Pp. 3-12.
- 48 González-Paredes, P. (2001). *Efecto del procedimiento con calor sobre la cuantificación de lectinas de frijol y su toxicidad remanente*. (Tesis para obtener el grado de Química de Alimentos) Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- 49 Hamelryck, T. W., Dao-Thi, M. H., Poormars, F., Chrispeels, M. J., Wyns, L. & Loris, R. (1996). The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. *Journal of Biological Chemistry*. 271(34). Pp. 20479-20485.
- 50 Harmuth-Hoene, A. E (1988). Effect of germination on protein quality of wheat and mung beans -studies of nitrogen balance in growing rats. *Z, Ernährungswiss*. 27(1). 40-47.
- 51 Haverd-Duclos, B. (1969). *Las plantas forrajeras tropicales*. Instituto del libro. La Habana. P. 322.
- 52 Hernández-Cruz, P., Pérez-Campos, E., Martínez-Martínez, L., Ortiz, B. & Martínez, G. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones Proteína-Carbohidrato. *Revista de educación bioquímica*. 24(1). P. 21-27.
- 53 Higueldo-López, V. J. (2014). *Evaluación del efecto de la germinación en el contenido de proteína, su disponibilidad y factores tóxicos naturales en dos leguminosas consumidas en Villahermosa, Tabasco: **Phaseolus vulgaris** y **Vigna unguiculata*** (Tesis para obtener el grado de Química de Alimentos). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- 54 Hilhorst, H. W. (1998). The regulation of secondary dormancy. The membrane hypothesis revisited. *Seed Science Research*. 8. Pp. 77-90.
- 55 Howirtz, W. & Latimer, G. (2005). *Official Methods of Analysis of the Association Official Analytical Chemists*. (17 ed.). Association of Official Analytical Chemists international, Gaithersburg.

- 56 Jacobson, J. V. (1984). The seed: germination In Johri, B. M. (Ed.). *Embryology of angiosperms.*(Pp. 113-122) Berlin/New York. Springer-Verlag.
- 57 Jaffé, W. G. (1973). Nutritional Aspects of Common Beans and Other Legume Seeds as Animal and Human Food. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* 5. Pp.199.
- 58 Jaffé, W. & Brücher, O. (1972). Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemaglutininas de frijoles. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* 22. 267-281.
- 59 Jara, T. V. & Vankataraman, C. V. (1981). Changes in the carbohydrate constituents of chickpea and greengram during germination. *Food Chemistry.* 7(2). Pp. 95-104
- 60 Jin, D., Zhao, S., Nan kZheng, Beckers, Y. & Wang, J. (2018) Urea metabolism and regulation by rumen bacterial urease in ruminants – a review. *Annals of Animal Science.* 18(2). Pp. 303–318. DOI: 10.1515/aoas-2017-0028.
- 61 Kakade, M., Rackis, J. & Puski, G. (1974). Determinación de la actividad inhibidora de tripsina de los productos de soja: un análisis colaborativo de un procedimiento mejorado. *American Association of Cereal Chemists Incorporated.* 51(3). P.376.
- 62 Karssen, C. M. (1995). Hormonal regulation of seed development, dormancy, and germination studied by genetic control. In Kigel J. & Galili,G. *Seed development anda germination.* (Pp. 333-350). New York. Marcel Dekker.
- 63 Karuppanapandian, T., Karuppudurai, T., Sinha, P., Haniya, A. M. & Manoharan, K. (2006). Phylogenetic diversity and relationships among cowpea (***Vigna unguiculata*** L. Walp) landraces using random amplified polymorphic DNA markers. *General and Applied Plant Physiology.* 32(3). 141-152.
- 64 Kay, D. E. (1985). *Legumbres alimenticias.* Zaragoza. Editorial Acribia.
- 65 Kerharo, J. & Adams, J. G. (1964). Plantes médicinales et toxiques des Peuls et des Toucouleurs du Sénégal. *Journal d'Agriculture Tropicale et de Botanique Appliquée.* 11(1). Pp.585.
- 66 Koide, T. & Ikenaka, T. (1973). Studies on soybean trypsin inhibitors. 3. Amino-acid sequences of the carboxyl-terminal region and the complete amino-acid sequence of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). *European Journal Biochemistry.* 32(3). Pp. 401-431.

- 67 Kunit, M. (1945). Crystallization of a trypsin inhibitors from soybean. *Science*. 101(2635). Pp. 668-669.
- 68 Lagunes-Espinoza, L. del C., Gallardo-López, F., Becerril-Hernández, H. & Bolaños-Aguilar. E. D. (2008). Diversidad cultivada y sistema de manejo de ***Phaseolus vulgaris*** y ***Vigna unguiculata***, en la región de La Chontalpa, Tabasco. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 14(1). Pp.13-21.
- 69 Leavitt, R. D., Felsted, R. L. & Bachur, N. R. (1977). Biological and biochemical properties of ***Phaseolus vulgaris*** isolectins. *Journal of Biological Chemistry*. 252(9). Pp. 2961-2966.
- 70 Liener, I. E. (1997). Plants Lectins: Properties, Nutritional Significance and Function. In *American Chemical Society Symposium Series*. (Pp. 31-42) Washington. American Chemical Society.
- 71 Liener, I. E. & Kakade, M. L. (1980). Protease Inhibitors. In Liener I. (2th edition) *Toxic Constituents of Plant Foodstuff* (Pp. 7-27) New York. Academic Press.
- 72 López, G. C. & Bressani, R. (2008). Uso de cowpea (***Vigna unguiculata***) en mezclas con frijol común (***Phaseolus vulgaris***) en el desarrollo de nuevos productos alimenticios. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 58(1). P. 71-80.
- 73 Lucas, B. & Sotelo, A. (1993). A useful modification of the hemagglutination method for screening of lectins in legume seeds. 2th International Workshop on ANFs. In *Legume seeds*. 70. Pp. 71-74.
- 74 Lucas, B., Guerrero, L., Sigales, L. & Sotelo, A. (1988). True protein content and non-protein aminoacids present in legumes seeds, *Nutrition Reports International*. 37(3). Pp. 545-553.
- 75 Martínez, D., Ibañez, G. & Rincón, L. (2002). Ácido fítico, aspectos nutricionales e implicaciones analíticas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 52(3). Pp. 219-231.
- 76 Mateo-Box, J. M. (1961). *Leguminosas de grano* (1ª edición). Barcelona. Salvat Editores, S.A.
- 77 Mateo-Box, J. M. (2005). *Prontuario de agricultura*. Madrid. Mundi-Prensa.
- 78 Matilla, A. J. (2008). *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (2ª edición). Editores J. Azcón-Bieto & M. Talón. Madrid. McGraw Hill. P. 537-550.
- 79 Mauseth, J. D. (2014). *Botany : an introduction to plant biology*, (5th edition). Texas. Burlington, M. A. Jones & Bartlett Learning. Pp. 244.


- 80 Medina, F., Chang, W., Bracho, J., Mann, M. & Esparza, D. (1996). Efecto de la edad y el genotipo sobre el crecimiento del área foliar en el frijol (***Vigna unguiculata*** (L) Walp). *Revista Facultad de Agronomía*. 13. P. 61-72.
- 81 Mitjavila, S. (1990). Sustancias naturales nocivas en los alimentos. En Derache, R. *Toxicología y seguridad de los alimentos*. (Pp. 109-132) Barcelona. Omega,
- 82 Monsigny, M., Jeune-Chung, K. H. & Perrodon, Y. (1978). Separation and biological properties of ***Phaseolus vulgaris*** isolectins. *Biochimie*. 60(12). Pp. 1315-1322.
- 83 Morse, W. J. (1947). Cowpeas: Culture and varieties, Editorial U. S. Agriculture, *Farmer's Bull.* 11(48). Pp. 18.
- 84 Muzquiz, M., Pedrosa, M., Varela. A. J., Guillamón, E., Goyoaga, C., Cuadrado, C. & Burbano, C. (2006) Factores no-nutritivos en fuentes proteicas de origen vegetal : Su implicación en nutrición y salud. *Brazilian Journal of Food Technology*. 15. Pp. 87-98.
- 85 Norris, Ungewickell, E., & Majerus, P. W. (1995). Inositol hexakisphosphate binds to clathrin assembly protein and inhibits clathrin cage assembly ***in vitro***. *Journal of Biological Chemistry*. 270. Pp. 214-217.
- 86 Nwokolo, E. & Smart, J. (1996). *Food and feed from legumes and oilseeds*. London. Chapman & Hall.
- 87 Odani, S. & Ikenak, T. (1977). Studies on Soybean Trypsin Inhibitors. XI. Complete Amino Acid Sequence of a Soybean Trypsin-Chymotrypsin-Elastase Inhibitor C-II. *The Journal of Biochemistry*. 82. Pp. 1523-1531.
- 88 Ogunkanmi, L. A., Taiwo, A., Mogaji, O. L., Awobodede, A., Eziashi, E. E. & Ogundipe, O. T. (2006). Assessment of genetic diversity among cultivated cowpea (***Vigna unguiculata*** L. Walp.) cultivars from a range of localities across West Africa using agronomic traits. *Journal Scientific Research and Development*. 10. Pp. 111-118.
- 89 Pérez-Conesa, D., Periago, M.J., Ros, G. & López, G. (2005) Non-protein nitrogen in infant cereals affected by industrial processing. *Food Chemistry*. 90. Pp. 513-521.
- 90 Peters, M., Franco, L. H., Schmindt, A. & Hincapié, B. (2003). *Especies forrajeras multipropósito: Opciones para productores de Centroamérica*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Ciudad de Colombia.

- 91 Peumans, W. J. & van Damme, E. J. (1995). The role of lectins in plant defence. *The Histochemical Journal*. 27(4). Pp. 253-257.
- 92 Price, N., Hames, B. & Rikckwood, D. (1996). Proteins LabFax. 1st edition. Massachusetts. Academic Press
- 93 Pusztai, A., Grant, G., Stewart, J. C., Bardocz, S., Ewen, S. B. & Gatehouse, A. M. (1993). Nutritional evaluation of RAZ-2, a new ***Phaseolus vulgaris*** bean cultivar containing high levels of the natural insecticidal protein arcelin 1. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 41(3). Pp. 436-440.
- 94 Read, J. W. (1938). Studies on the baking quality of flour as affected by certain enzyme actions. V Further studies concerning potassium bromate enzyme activity. *Cereal Chemistry Journal*. 15. Pp. 59-68.
- 95 Reddy, N.R., Sathe S.K. & Salunkhe, D.K (1982). Phytates in legumes and cereals. *Advances in Food Research*. 28. Pp. 1-92.
- 96 Rodríguez, M. V., Riquelme, B., Valverde, J. & Gattuso, S. (2004). Caracterización del efecto aglutinante de lectinas de la familia de las fabáceas sobre los eritrocitos humanos mediante análisis de imágenes. *Anales Asociación Física Argentina*. 16. P. 247-248.
- 97 Rodríguez-Blanco, L., Lucas-Florentino, B., Miranda-Cruz, E. & Guerrero-Olazarán, M. (2018). Contenido de Ácido Fólico Inorgánico en ***Vigna unguiculata*** y ***Phaseolus vulgaris*** germinadas a diferentes temperaturas. *Información Tecnológica*. 29(3). P. 39-46. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642018000300039>
- 98 Rosabal-Ayan, L., González-Martínez, L., ReyesGuerrero, Y., Dell'Amico-Rodríguez, J. & Núñez-Vázquez, M. (2014). Aspectos fisiológicos, biológicos y expresión de genes en concidiones de déficit hídrico. Influencia en el proceso de germinación. *Cultivos Tropicales*. 35(3). P. 24-35.
- 99 Royer, A. (1975). Activites proteolytiques et anti-trypsine des graines de ***Vigna unguiculata***: Repartition et interaction. *Phytochemistry*. 14(4). Pp. 915-919.
- 100 Rudiger, H. (1998). Plant lectins- more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure and possible functions of plant lectins. *Acta Anatomic (Basel)*. 161. Pp. 130-52.
- 101 Rumiya, J. A. P. & Jayasena, V. (2012) Effect of germination on the nutritional and protein profile of Australian Sweet Lupin ***Lupinus angustifolius*** L. *Food and Nutrition Sciences*. 3. Pp. 621-626.
- 102 Ruíz-Álvarez, V. & Hernández-Triana, M. (2004, enero 14). ResearchGate. Obtenido 11 Noviembre 2018, *Aspectos bioquímicos*

de la fitohemaglutinina. Aplicaciones en terapéutica. Recuperado de:
https://www.researchgate.net/profile/Manuel_HernandezTriana/publication/259384359_Aspectos_bioquimicos_de_la_fitohemaglutinina_Aplicaciones_en_terapeutica_medica/links/0deec52b4c3a74c40c000000/Aspectos-bioquimicos-de-la-fitohemaglutinina-Aplicaciones-en-

- 103 SAGARPA. (2016, mayo 20). *Legumbre o leguminosa*. Obtenido 6 de noviembre 2018 Recuperado de: <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/legumbre-o-leguminosa>
- 104 Salgado, J. D. & Valdez, M. (2006) *Purificación y caracterización de lectinas de semillas amaranto cultivado en el estado de Hidalgo*. (Tesis para la obtención de título de Ingeniero Bioquímico). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias de la Salud. Hidalgo.
- 105 Sathie, S. K., Deshpande, S. S., Reddy, N. R., Goll, D. E. & Salunkhe, D. K. (1983). Effects of germination on proteins, raffinose, oligosaccharides and antinutritional factor in great Northern Beans. *Journal Food Science*. 48(6). Pp. 1796-1800.
- 106 Seidel, D. S. & Liener, I. E. (1972). *Biochimica et Biophysica Acta*. 258. Pp. 83-93.
- 107 Shah, S.A., Zeb, A., Masood, T., Noreen, N., Abbas, S.J. & Samiullah M.(2011) Effects of sprouting time on biochemical and nutritional qualities of Mungbean varieties. *African Journal of Agricultural Research*. 6(22). Pp. 5091-5098.
- 108 Skerman, P., Cameron, D. & Riveros, F. (1991). *Leguminosas forrajeras tropicales*. Roma. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- 109 Sosulski, F. W. & Imafidon, G. I. (1990). Amino Acid Composition and Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Animal and Plant Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38(13). Pp. 51-56.
- 110 Staswick, P. & Chrispeels, M. J. (1984). Expression of lectin genes during seed development in normal and phytohemagglutinin-cyclosporine effect. *Journal of Molecular and Applied Genetic*. 2. Pp. 525-535.
- 111 Valdés-Paneca, G. R., Maroto-Martín, L. O., Cruz-Muñoz, E., de la Fe-Rodríguez, P. & Hernández-Beltrán, Y. (2012). Unión de las lectinas al borde en cepillo de vellosidades intestinales: herramienta para la evaluación de la glicosilación intestinal. *Revista Cubana de Química*. 24. P. 27-31.
- 112 Valencia, G. F. E. & Román, M. M. O. (2004). La fibra dietaria como alimento funcional. *Vitae*. 11(2). P. 12-17.

- 113 Valle-Vega, P. & Lucas, B. (2000). *Toxicología de alimentos*. Instituto de Salud Pública/Centro Nacional de Salud Ambiental. Ciudad de México.
- 114 Van-Den-Broeck, W., Cox, E. & Godderis, B. M. (1999) Receptor-Dependent Immune Responses in Pigs After Oral Immunization with F4 Fimbriae. *Infection and Immunity*. 67(2). Pp. 520-526.
- 115 Vandendorre, G., Smagghe, G. & Van Damme, E.J. (2011) Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. *Phytochemistry*. 72(13). Pp. 1538-1550.
- 116 Ventura, M. M. & Filho, J. X. (1967). Atrypsin and chymotrypsin inhibitor from black-eyed pea (***Vigna sinensis***). I. purification and partial characterization. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 38. Pp. 553-566.
- 117 Ventura, M. M., Aragão, J. B. & Ikenoto, H. (1972). Conformation of Transferrin : Infrared and Circular Dichroism Studies. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 44(4). Pp. 581-582.
- 118 Ventura, M. M., Filho, J. X., Moreira, R. A., Aquino, A. D. & Pinhero, P. A. (1971). A Trypsin and Chymotrypsin Inhibitor from Black-Eyed Pea (***Vigna sinensis***). III. Phenolic Hydroxyl Ionization. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 43(1). Pp. 233-242.
- 119 Vitale, A., Cerott, A., Bollini, R. & Chrispeels, M. J. (1984). Biosynthesis and processing of phytohemagglutinin in developing bean cotyledons. *European Journal of Biochemistry*. 141(1). Pp. 97-104.
- 120 Walpers, W. G. (1843). ***Vigna unguiculata*** (L.) Walp. *Repertorium Botanices Systematicae*. 1(5). Pp. 779.
- 121 Wheeler, B. (2006, agosto 7). Recuperado de: Lechería. Recomendaciones para la alimentación de las vacas lecheras. Obtenido el 9 de marzo de 2019. <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/recomendaciones-alimentacion-vacas-lecheras-t25877.htm>
- 122 Wongsiri, S., Ohshima, T. & Duangmal, K. (2015) Chemical composition, amino acid Profile And Antioxidant Activities Of Germinated Mung Beans (***Vigna Radiata***). *Journal of Food Processing and Preservation*. 39(6). Pp 1-9. Doi:10.1111/jfpp.12434



*‘La mejor tierra, para legumbres
y cereales, la mediana, para viña
y olivares.’*

-Anónimo