

DEGRADACION RUMINAL DE LOS INHIBIDORES DE TRIPSINA DEL FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*)^a

Raúl Ricalde Velasco^b
Antonia de la Cruz Morales^b
José Antonio Martínez García^b
Germán D. Mendoza Martínez^c

RESUMEN

Ricalde VR, De la Cruz MA, Martínez GJA, Mendoza MGD. *Téc. Pec. Méx.* 1999;37(3)57-62. Se midió la digestibilidad ruminal *in situ* (DISMS) y la concentración de inhibidor de tripsina (IT) en 5 variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*): Bayo Río Grande, Bayo blanco, Azufrado, Ojo de cabra y Negro San Luis, a las 4, 8 y 12 horas, no existiendo correlación de la DISMS con la concentración inicial del IT ($P > 0.05$). No existieron diferencias en la DISMS de las variedades de frijol después de las 12 h de incubación. Los inhibidores de tripsina fueron degradados en un 80.5% a las 12 h de incubación. La variedad Bayo blanco tuvo la menor ($P < 0.05$) concentración de IT (3.78 mg/g) con relación al resto de las variedades. Hubo diferencias en el tiempo medio (h) de degradación de las variedades: 8.6 Bayo Río Grande; 10.3, Bayo blanco; 6.4 Azufrado; 8.8 Ojo de cabra; 5.0 Negro San Luis; sin existir correlación con la concentración inicial de IT ($P < 0.05$). El uso de autoclave redujo la concentración del IT en un 93%. La degradación ruminal *in situ* de la materia seca de las variedades de frijol, no está asociada a la concentración inicial de inhibidores de tripsina, los cuales son extensamente degradados en el rumen.

PALABRAS CLAVE: *Phaseolus vulgaris*, Factores antitripsicos, Rumen, Digestibilidad.

Se ha comprobado que cuando se prolonga el almacenamiento del frijol (*Phaseolus vulgaris*), se endurece, lo cual se traduce en tiempos prolongados de cocción, sabores indeseables y detrimento en el valor

nutricional (1). Se estima que un 10% del frijol total que se consume anualmente en México queda fuera de norma, "endurecido", representando alrededor de 81,000 toneladas (2), lo cual puede ser un recurso para la alimentación de rumiantes.

a Recibido el 24 de marzo de 1999 y aceptado para su publicación el 2 de febrero de 2000.

b Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

c Especialidad de Ganadería, Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco km. 36.5 Montecillo, Estado de México. CP 56230, México. Tel. 01(5)8-04-59-00 ext. 1716 Fax 01(5)8-04-59-79 E-mail: gmendoza@colpos.colpos.mx (correspondencia y solicitudes de separatas)

El frijol es una leguminosa con una concentración adecuada en proteína cruda (PC) con un rango de 20 a 30% (3,4), sin embargo tiene un gran número de factores antinutricionales, en su mayoría termolábiles (5), entre los que destacan los inhibidores de tripsina, saponinas, hemaglutininas, isoflavonas, glucósidos cianogénicos, taninos y factores de flatulencia (6,7,8).

Los inhibidores de tripsina (IT), afectan a la actividad de la enzima pancreática tripsina. Read y Hass citados por Aguirre, (9) fueron los primeros en reconocer la presencia de un inhibidor de tripsina en material vegetal, el cual es una proteína rica en cistina y baja en metionina, de una sola cadena polipeptídica, cuyo peso molecular es de alrededor de 25,000 daltons, por lo que es factible de degradarse por las enzimas proteolíticas del rumen. Presumiblemente los inhibidores de tripsina no tienen actividad en el rumen, dado que su pH óptimo es entre 4 y 5 (10,11,12) y sólo en condiciones de acidosis se presenta un pH de esta naturaleza en el rumen (13).

Dado que los inhibidores de tripsina, afectan la actividad proteolítica en el intestino delgado, es posible que afecten la actividad de los microorganismos ruminales y la digestibilidad *in situ* de la materia seca (DISMS). El presente trabajo tuvo el objetivo de determinar la cantidad de inhibidor de tripsina en 5 variedades de frijol, y conocer su degradación ruminal *in situ*.

Se utilizaron 5 variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*) endurecido: Bayo Río

Grande, Bayo blanco; Azufrado, Ojo de cabra y Negro San Luis. La concentración del inhibidor de tripsina se determinó en muestras desengrasadas con hexano, con la técnica modificada de Kakade *et al.* (14), usando un espectrofotómetro 1E Cary UUV-Visible, marca Varian con absorbancia de 410 nanómetros. Las muestras incubadas en el rumen no se trataron con hexano. Con el objeto de comprobar la naturaleza termolábil de los inhibidores, se procesaron muestras de frijol en autoclave a 16 libras de presión y a 125°C durante 30 minutos. Las determinaciones de materia seca y nitrógeno (Kjeldhal) se realizaron de acuerdo a los procedimientos de la AOAC (15). La desaparición *in situ* de la materia seca, se midió incubando 5 g de muestra de cada variedad, molida con una malla de 1 mm en bolsas de dacrón (10 x 20 cm; 40 micrones tamaño de poro). Las bolsas se incubaron en un bovino con cánula ruminal, por duplicado, a las 4, 8, 12 y 16 horas, obteniendo la tasa de degradación y el tiempo medio de acuerdo a una cinética de primer orden (16,17). Los resultados se analizaron de acuerdo a un diseño completamente al azar (18). La información medida a diferentes tiempos

Cuadro 1. Concentración inicial de inhibidor de tripsina (IT), y proteína cruda (PC) de variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*).

Variedad	IT, mg/g	PC, %
Bayo Río Grande		
Bayo blanco		
Azufrado		
Ojo de cabra		
Negro "San Luis"		
Error estándar		

^{a,b} Medias con distinta literal en la misma columna, son diferentes ($P < 0.05$)

Cuadro 2. Tasa (Kd) y tiempo medio (TM) de degradación ruminal de los inhibidores de tripsina en variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*).

Variedad	Kd, %/h	TM, h
Bayo Río Grande	11.59 ^b	8.58 ^a
Bayo blanco	93.59 ^b	10.31 ^a
Azufrado	15.59 ^{ab}	6.42 ^a
Ojo de cabra	11.32 ^b	8.82 ^a
Negro San Luis	20.28 ^a	5.00 ^b
Error estándar	2.43	1.84

^{a,b} Medias con distinta literal en la misma columna, son diferentes ($P < 0.05$)

de incubación se analizó con el procedimiento de mediciones repetidas (19). Las medias de tratamientos fueron comparadas con la prueba de Tukey, usando el procedimiento GLM del SAS (20).

La concentración inicial de inhibidores de tripsina se presenta en el Cuadro 1. No hubo correlación entre la proteína cruda y los IT ($r = -.51$ $P < .31$) a pesar de que se ha mencionado que alrededor del 73% del inhibidor se encuentra en las albúminas,

las cuales representan entre un 12 a 16% de la proteína total de la semilla de frijol (21).

A pesar de que todas las variedades utilizadas en este experimento fueron endurecidas, se puede apreciar que existen diferencias en la concentración de IT, siendo la menor para la variedad Bayo blanco, y la mayor para la Negro San Luis. La media de las variedades (4.70 mg/g) es similar a lo mencionado por

Cuadro 3. Digestibilidad ruminal *in situ* de la materia seca de variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*).

Variedad	Horas de incubación		
	4	8	12
	----- mg/g -----		
Bayo Río Grande	28.46 ^c	35.05 ^b	55.21 ^a
Bayo blanco	27.22 ^c	36.24 ^b	58.58 ^a
Azufrado	31.30 ^b	40.29 ^{ab}	54.01 ^a
Ojo de cabra	26.23 ^c	35.51 ^b	50.59 ^a
Negro San Luis	36.69 ^a	45.30 ^a	58.04 ^a
Error estándar	1.88	1.94	1.45

^{a,b,c} Medias con distinta literal en la misma columna, son diferentes ($P < 0.05$)

Cuadro 4. Concentración del inhibidor de tripsina en variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en el rumen.

Variedad	Horas de incubación		
	4	8	12
		mg/g	
Bayo Río Grande	3.69 ^a	1.70 ^c	1.24 ^a
Bayo blanco	3.12 ^b	2.69 ^b	1.09 ^a
Azufrado	2.99 ^b	1.88 ^c	0.69 ^{bc}
Ojo de cabra	3.35 ^{ab}	3.19 ^a	1.08 ^{ab}
Negro "San Luis"	3.26 ^{ab}	1.74 ^c	0.47 ^c
Error estándar	0.11	0.29	0.14

a,b,c Medias con distinta literal en la misma columna, son diferentes ($P < 0.05$)

Huisman *et al.* (22). Se observó una tendencia de relación negativa, entre la concentración de IT con el tiempo medio de degradación ($r = -.65$, $P < 0.18$).

Los resultados de la cinética de degradación ruminal *in situ* de los IT se presentan en el Cuadro 2, mostrando que existen diferencias entre variedades. La degradación de la materia seca a las diferentes horas de incubación, no estuvo correlacionada con la concentración inicial del IT.

La digestibilidad *in situ* de las variedades de frijol se presentan en el Cuadro 3, y la concentración del IT en el Cuadro 4. Se puede observar que a las 4 horas de incubación se había degradado alrededor del 30%, cerca del 50% a las 8 horas, desapareciendo el 80% del IT a las 12 horas, indicando que este inhibidor puede ser degradado extensamente por los microorganismos del rumen. Sería importante conocer los posibles efectos de la cantidad del inhibidor que llega al intestino, dado que se ha demostrado que por cada molécula de inhibidor, se

bloquean dos de tripsina (18,23,24) y se podría alterar la digestión en intestino delgado en rumiantes.

Cuando se trató el frijol en autoclave, se redujo la concentración del IT a 0.317 mg/g comparado con el testigo (4.703 mg/g), confirmando la naturaleza termolábil de estos compuestos tal y como ya ha sido mencionado (22). Bliss y Hall (23) encontraron con un tratamiento similar al aplicado en este ensayo, que se redujo la actividad del inhibidor de tripsina sin alterar la metionina. El grado de destrucción de los inhibidores de tripsina por calentamiento, estará en función de las condiciones del proceso, como la temperatura, tiempo de calentamiento, tamaño de partícula y condiciones de humedad (1,9,12). Si se usan tiempos de calentamiento mayores a los 29 min se puede afectar negativamente el valor nutritivo de la proteína (25). Los cambios en la degradación ruminal de la proteína del frijol tratado, así como en la disponibilidad de la proteína en intestino delgado, deberán ser tomados en cuenta si se decide procesar el frijol endurecido para alimentar rumiantes.

La información de especies no rumiantes, muestra que el uso de leguminosas con inhibidores de tripsina tienen efectos detrimentales en ratas, ratones y pollos, donde los efectos negativos se presentan en períodos de 2 a 3 semanas, resultando en hiperplasia e hipersecreción pancreática, alterando la digestión y absorción de la proteína (26,27,28).

Los resultados de este trabajo muestran que los inhibidores de tripsina se pueden degradar extensamente en el rumen, y que posiblemente se pueda aprovechar el frijol endurecido para la alimentación de rumiantes, sin embargo, es necesario que se realicen estudios *in vivo* para conocer si existen niveles limitantes de su uso en raciones.

AGRADECIMIENTOS

Se extienden agradecimientos al M.V.Z. José Luis Cordero Mora, al Técnico Andrés Lee Hernández y a la M. en C. Magdalena Crosby Galván, por su apoyo en la preparación de los animales canulados y en los análisis de laboratorio para la realización de este trabajo.

RUMINAL DEGRADATION OF TRYPSIN INHIBITORS OF BEAN *Phaseolous Vulgaris*

ABSTRACT

Ricalde VR, De la Cruz MA, Martínez GJA, Mendoza MGD. *Téc. Pecu. Méx.* 1999;37(3):57-62. Ruminant degradation of dry matter *in situ* (DISDM)

and trypsin inhibitor concentrations (IT) were measured in 5 bean varieties (*Phaseolus vulgaris*): Bayo Río Grande, Bayo Blanco, Azufrado, Ojo de Cabra y Negro San Luis. Samples were, incubated *in situ* for 4, 8, and 12 h. There was no correlation between the initial concentration of IT ($P > 0.05$) and DISDM. After 12 h incubation, DISDM of the bean varieties did not differ ($P > 0.05$). Trypsin inhibitors were extensively degraded (80.5%) by 12 h incubation. The variety Bayo Blanco had the lowest ($P < 0.05$) initial IT concentration (3.78 mg/g). The half time degradation (h) of IT was: 8.6 Bayo Río Grande; 10.3 Bayo Blanco; 6.4 Azufrado; 8.8 Ojo de Cabra; 5.0 Negro San Luis ($P > 0.05$). Treatment by autoclaving (125°C, 16psi) reduced IT concentration by 93%. *In situ* ruminant degradation of dry matter of the five bean varieties was not associated with the initial trypsin inhibitor concentrations which were themselves degraded in the rumen.

KEY WORDS: *Phaseolus vulgaris*, Trypsin inhibitors, Rumen, Digestibility.

REFERENCIAS CITADAS

1. Vázquez CMG. Obtención de harina y concentrado proteínico de frijol azufrado endurecido [tesis de maestría]. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México; 1987.
2. CODAI. El sistema agroindustrial y los sistemas alimenticios básicos. Frijol 3. SARH. México. 1994:14.
3. Bressani R. Significado nutricional y alimenticio del endurecimiento del frijol En: Seminario sobre el endurecimiento del frijol común. PCCMCA, SEA. Rep. Dominicana SEF-1; 1983:25.
4. Van der Poel AFB. Effect of processing on antinutritional value of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) A review. *Anim Feed Sci Technol* 1990;29:179.
5. Uvalle BA. Evaluación nutricional de siete frijoles comestibles del estado de Chiapas [tesis licenciatura]. México. UNAM; 1977.
6. Liener IE, Kakade ML. Protease inhibitors. In: Toxic constituents of plant foods stuffs. USA: Academic Press; 1980:7-71.
7. Reyes MC. Determinación de glucósidos cianogénicos en diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*) [tesis licenciatura]. México. UNAM; 1980.

8. Valle P. Toxicología de alimentos. Organización Panamericana de Salud (OPS) Centro de Ecología Humana y de Salud. Metepec, Edo. de México. 1986:128.
9. Aguirre MMG. Determinación de inhibidores de tripsina en 13 semillas de leguminosas por el método microelectroforético [tesis licenciatura]. México. UNAM; 1980.
10. Brown JW, Osborn TC, Bliss FA, Hall TA. Genetic variation in the subunits of globulin-2 and albumin seed proteins of French beans. *Theory Appl Genet* 1981;(60):245.
11. Nieto VZ. Toxicología en leguminosas. Departamento de Alimentos. División de Estudios de Posgrado Facultad de Química. UNAM. México. 1985:96.
12. Donald B, Rayas DP, Nielsen SS. Screening of heat-stable trypsin inhibitor in dry beans and their partial purification from great northern beans (*Phaseolus vulgaris*). Using anhydro trypsin-Sepharose affinity chromatography. *J Agric Food Chem Soc* 1992;40:32.
13. Britton RA, Stock RA. Acidosis, rate of starch digestion and intake. In: *Agric Exp Stat Oklahoma State University editor. Symposium Proceedings: Feed intake by beef cattle.* 1986:45.
14. Hamerstrand GE, Black LT, Glover D. Trypsin inhibitors in soy products: Modification of the standard analytical procedure. *Cereal Chemistry* 1981;58(1):42.
15. AOAC Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis.* 14th ed. Washington, DC; 1984.
16. Mehrez AZ, Orskov ER. A study of artificial bag technique for determining the digestibility of feed in the rumen. *J Agri Sci Camb* 1977;(88):645.
17. Smith LW, Goering HK, Waldo DR, Gordon CH. *In vitro* digestion rate of forage cell wall components. *J Dairy Sci* 1972;(54):71.
18. Steel RGD, Torrie JH. *Principles and procedures of statistics: A biometrical approach.* 2nd ed. New York, USA: McGraw-Hill Book Co; 1980.
19. Wilcox CJ, Thatcher WW, Martin FG. Statistical analysis of repeated measurements in physiology experiments. *Journal Series No. 9552 Florida Agric Exp Stat* 141. 1990:35.
20. *SAS User's Guide: Statistics (Version 5 Ed).* SAS Inst Inc., Cary, NC. 1985.
21. Marquez VM, Lajolo FM. Composition and digestibility of albumin, globulin and glutelins from (*Phaseolus vulgaris*) *J Agr Food Chem* 1989;(29):1068.
22. Huisman BJ, Van der Peol AFB, Leeuwen PV, Versteegen MWA. Comparison of growth, metabolism and organ weights in piglets and rats fed on diets containing (*Phaseolus vulgaris*) beans. *Br J Nutr* 1990;(64):745.
23. Bliss FA, Hall TC. Food legumes compositional and nutritional changes induced by breeding. *Cereal Food World* 1977;(22):105.
24. Wu C, Witaker JR. Purification and partial characterization of four trypsin chymotrypsin inhibitors from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) var. Linden. *Amer Chem Soc* 1990;(38):1523.
25. Arora SK. *Chemistry and biochemistry of legumes.* Edward Arnold, New Dehli, India. 1983:572.
26. Kunitz M. Crystallization of a trypsin inhibitor from soybeans. *Science* 1945;(101):668.
27. Kakade M, Foffa D, Liener EI. Contribution of trypsin inhibitor to the deterior effect of unheated soybean fed to rats. *J Nutri* 1973;(103):1772.
28. Liener IE. Antitryptic and other antinutritional factors in legumes. In: *Nutritional improvement of food legumes by breeding.* New York, US: Academic Press. 1972.