

**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**CAMBIOS BIOQUÍMICOS EN SEMILLAS DE *Lupinus montanus* y  
*Lupinus exaltatus* ASOCIADOS A TRATAMIENTOS FÍSICOS,  
QUÍMICOS Y GERMINATIVOS**

**BERENICE JUÁREZ FUENTES**

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2013

La presente tesis, titulada: **Cambios bioquímicos en semillas de *Lupinus montanus* y *Lupinus exaltatus* asociados a tratamientos físicos, químicos y germinativos**, realizada por la alumna: **Berenice Juárez Fuentes**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO**

**CONSEJO PARTICULAR**

**CONSEJERA:** \_\_\_\_\_



**DRA. LUZ DEL CARMEN LAGUNES ESPINOZA**

**ASESOR:** \_\_\_\_\_



**DR. ADOLFO BUCIO GALINDO**

**ASESOR:** \_\_\_\_\_



**DR. JULIÁN PÉREZ FLORES**

**ASESORA:** \_\_\_\_\_



**DRA. ADRIANA DELGADO ALVARADO**

H. Cárdenas, Tabasco, México, 22 de agosto de 2013

**CAMBIOS BIOQUÍMICOS EN SEMILLAS DE *Lupinus montanus* y *Lupinus exaltatus* ASOCIADOS A TRATAMIENTOS FÍSICOS, QUÍMICOS Y GERMINATIVOS**

Berenice Juárez Fuentes, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2013

Una alternativa para mejorar el valor nutricional de *Lupinus silvestres* es la aplicación de métodos tradicionales de procesado a las semillas. El presente estudio cuantificó los cambios bioquímicos en semillas de *Lupinus exaltatus* (*Le*) y *L. montanus* (*Lm*), especies silvestres mexicanas después de la aplicación de tratamientos físicos (hidrotérmico, remojo y descascarillado), químico (alcalino, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05%) y germinativo, para disminuir los compuestos anti-nutricionales (FAN's) y mantener los nutricionales (CN). Muestras masales de semillas por especie fueron colectadas en 2012, en Chalchicomula de Sesma y Tlachichuca, Puebla. Los CN analizados antes y después de los tratamientos fueron: proteína cruda (PC), fibra cruda (FC), extracto etéreo (EE), cenizas (Ce). Los FAN's fueron: alcaloides totales (AT's), polifenoles totales (PT), taninos totales (TT) y taninos condensados (TC). Sin tratamiento, las semillas de *Le* y *Lm* presentaron 43 y 45.9% de PC, 493.8 y 416.8 mg 100 g<sup>-1</sup> de PT y 2.18 y 3.33% de AT's, respectivamente. La eliminación de la testa incrementó los contenidos de PC, EE y AT's en los cotiledones de ambas especies. El tratamiento hidrotérmico durante 6 h a 95°C redujo 82 y 62.7% los AT's y 75.2 y 85% los PT en *Le* y *Lm*, respectivamente, e incrementaron PC y FC. Reducción de AT's también se observó en germinados de 6 días en *Le* y *Lm* (33.5 y 35.4%, respectivamente), y después de 9 h del tratamiento alcalino (TA) en *Le* (31.6%). El TA también redujo los CN. La germinación aumentó 54 y 84% PT en *Le* y *Lm*, respectivamente. El tratamiento de remojo no mostró variación en los CN y disminuyó los TT solo en *Le*. Se concluye que el tratamiento hidrotérmico por 6 h fue más eficiente en la eliminación de FAN's en las semillas de lupino evaluadas, pero esto no es suficiente para su consumo humano.

**Palabras claves:** *Lupinus*, alcaloides, proteína, tratamiento térmico y de germinación

## BIOCHEMICAL CHANGES IN SEEDS OF *Lupinus montanus* and *Lupinus exaltatus* ASSOCIATED WITH PHYSICAL, CHEMICAL AND GERMINATION TREATMENTS

Berenice Juarez Fuentes, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2013

An alternative to improve the nutritional value of wild *Lupinus* is the application of traditional methods of processing their seeds. The present study evaluated the biochemical changes of wild Mexican seeds of *Lupinus exaltatus* (*Le*) and *L. montanus* (*Lm*), after application of physical treatments (hydrothermal, dehulling and soak), chemical (alkaline, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05%) and germination, to reduce anti-nutritional compounds (FAN's) and maintain the nutritional (CN). Seed bulks samples were collected, by species, on 2012 at Chalchicomula de Sesma and Tlachichuca, Puebla, Mexico. The CN analyzed before and after treatments were: crude protein (CP), crude fiber (CF), ether extract (EE), ash (Ce). The FAN's were: total alkaloids (TA's), total polyphenols (TP), total tannins (TT) and condensed tannins (CT). Seeds of *Le* and *Lm* from control treatment, showed 43 and 45.9% CP, 493.8 and 416.8 mg 100 g<sup>-1</sup> of PT and 2.18 and 3.33% of AT's, respectively. The removal of the testa increased the contents of CP, EE and AT's in the cotyledons of both species. The hydrothermal treatment for 6 h at 95°C decreased 82 and 62.7% of AT's and 75.2 and 85% of PT in *Le* and *Lm*, respectively, and increased PC and FC. AT's reduction was also observed in the germination treatment at 6 days in *Le* and *Lm* (33.5 and 35.4%, respectively), and after 9 h of the alkaline treatment (TA) in *Le* (31.6%). The TA also reduced CN. Germination increased 54 and 84% PT in both species. The soaking treatment showed no variation in CN and TT decreased only in *Le*. It is concluded that the hydrothermal treatment for 6 h was more efficient at removing FAN's in lupine seeds evaluated, but this is not enough for human consumption.

**Key words:** *Lupinus*, alkaloid, heat and germination treatments, protein

## DEDICATORIA

*A Dios por guiarme, darme talento, salud y armonizar todo mi entorno para que esta meta fuera cumplida de manera exitosa y llevarme por el camino del mejoramiento continuo.*

*A mis padres, M.C Adalberto Juárez Paz y Sra. María del Carmen Fuentes de Juárez, colaboradores de mi existencia, obreros de mi formación y ejemplos de valentía, constancia e integridad, a ellos quiero hacerles saber que todo su esfuerzo ha valido la pena, infinitamente agradecida, los amo.*

*A mi esposo Ing. Iván de Miguel García Fernández, que con su amor, apoyo y comprensión durante cada proyecto me ha impulsado tantas veces a dar lo mejor de mi en todos los retos que emprendo. Mi compañero y cómplice de vida que vive mis logros y mis intentos, te amo.*

*A mis hermanos que me motivan a ser mejor cada día para ir de la mano por el camino del éxito, quienes han disfrutado junto a mí mis alegrías y tristezas tolerando mis defectos, con todo mi amor, para ustedes.*

*A todos mis amigos y compañeros quienes hicieron este andar más entusiasta y diverso e hicieron posible de alguna manera el cumplimiento de este reto.*

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincera gratitud a todas aquellas personas que han contribuido a la realización de esta tesis.

En primer lugar a la Dra. Luz del Carmen Lagunes Espinoza, Consejera Particular y Profesora Investigadora del Área de Ciencia Vegetal por aceptarme como su estudiante y confiar en mí, además de su invaluable amistad, apoyo y constante dedicación en el desarrollo de este proyecto, por su ejemplo de calidad profesional y humana que han sido de motivación para mí.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para mis estudios de maestría y por la beca mixta de estancia de movilidad nacional en el Centro de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional en Yautepec, Morelos.

Al Colegio de Postgraduados por abrir sus puertas por primera vez durante el periodo de otoño, su apoyo en investigación y asistencia a congresos.

Al Dr. Adolfo Bucio Galindo por su interés constante en el transcurso de la investigación, proporcionarme información y su ejemplo de sencillez.

Al Dr. Julián Pérez Flores por el impulso moral al inicio de esta tesis, además del tiempo dedicado y asesoría para este trabajo.

A la Dra. Adriana Delgado Alvarado por su orientación y disponibilidad para responder cualquier inquietud y aportaciones en el transcurso de esta tesis.

A la Dra. Kalina Bermúdez Torres, Investigadora del Centro de Productos Bióticos-Instituto Politécnico Nacional, por su ayuda en la extracción y determinación cromatográfica en placa fina de los alcaloides.

Al Dr. Javier López Upton, miembro del proyecto *Lupinus* de la LPI6 por su apoyo en la colecta de material vegetal para la realización de esta investigación.

Al M. C. Francisco Izquierdo Reyes por su apoyo en el análisis estadístico.

Al Dr. David Jesús Palma López por su interés y apoyo en mi formación profesional y personal.

Al Dr. Mepivoseh Castelán Estrada por su amistad, valiosos consejos y apoyo durante este proceso.

A la Línea de Investigación 6 Conservación y Mejoramiento de Recursos Genéticos del Colegio de Postgraduados por el apoyo económico para realizar la investigación y asistir a congresos.

Al Técnico José Luis Jiménez de Dios y al residente Ramón Isidro Pardo Cruz del Laboratorio de Ciencia Animal por su apoyo para la determinación de los análisis químicos proximales.

## CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. OBJETIVOS .....	2
2.1 Objetivo general .....	2
2.2 Objetivos particulares.....	2
3. HIPÓTESIS .....	2
4. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
4.1 Importancia de las leguminosas de grano en la alimentación.....	3
4.2. Composición química de semillas de leguminosas de grano .....	5
4.2.1 Factores anti-nutricionales .....	7
4.3 Métodos para disminuir factores anti-nutricionales (FAN's) .....	10
4.3.1 Remojo.....	10
4.3.2 Tratamiento térmico .....	11
4.3.3 Fermentación y germinación .....	13
4.3.4 Tratamientos alcalinos .....	14
4.3.5 Mejoramiento genético.....	15
4.4 El género <i>Lupinus</i> .....	16
4.4.1 Características generales.....	16
4.4.2. Distribución .....	17
4.4.3 Producción.....	19
4.4.4 Usos .....	20
4.5 Limitación de uso en alimentación .....	23
4.5.1 Alcaloides.....	25
4.5.2 Oligosacáridos.....	27
4.5.3 Taninos .....	28
4.6 Métodos utilizados para disminuir factores antinutricionales en el género <i>Lupinus</i> .....	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	31
5.1 Material biológico .....	31
5.2 Tratamientos físicos .....	33
5.2.1 Tratamiento hidrotérmico .....	33
5.2.2 Tratamiento de remojo.....	33
5.2.3 Tratamiento de descascarillado .....	33
5.3 Tratamiento químico.....	33
5.3.1 Tratamiento alcalino.....	33
5.4 Análisis químicos .....	34



5.4.1 Análisis químico proximal .....	34
5.4.2 Determinación de azúcares solubles totales (AST).....	35
5.4.3 Determinación de polifenoles totales (PFT).....	36
5.4.4 Determinación de fenoles no taninos .....	36
5.4.5 Determinación de taninos condensados (proantocianidinas).....	37
5.4.6 Determinación de alcaloides totales .....	38
<b>5.5 Tratamiento biológico.....</b>	<b>40</b>
5.5.1 Germinación de semillas .....	40
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>41</b>
6.1.1 Porcentaje de semillas sanas y dañadas .....	41
6.1.2 Peso seco de las harinas .....	41
<b>6.2 Efecto de tratamientos físicos sobre la bioquímica de las semillas de lupino</b>	<b>43</b>
6.2.1 Variación en la composición proximal y FAN's durante el tratamiento término.....	43
6.2.2 Variación en la composición proximal y FAN's durante el tratamiento de remojo.....	51
6.2.3 Variación en la composición proximal y FAN's por un tratamiento de descascarillado .....	53
<b>6.3 Efecto del tratamiento químico sobre las semillas de lupino .....</b>	<b>57</b>
6.3.1 Variación en la composición proximal y FAN's durante el tratamiento alcalino .....	57
<b>6.4 Efecto del tratamiento biológico sobre las semillas de lupino .....</b>	<b>62</b>
6.4.1 Variación en la composición proximal y FAN's durante el tratamiento de germinación.....	62
<b>6.5 Análisis de perfil de alcaloides por CCF.....</b>	<b>69</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>72</b>
<b>8. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>73</b>
<b>9. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>74</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>98</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición nutricional de leguminosas, cereales y carne de res magra. ....	6
Cuadro 2. Contenido de aminoácidos en las leguminosas más comunes (mg g <sup>-1</sup> ). ....	6
Cuadro 3. Principales vitaminas de algunas leguminosas más comunes (mg 100 g <sup>-1</sup> ). ....	7
Cuadro 4. Composición mineral de algunas leguminosas (mg 100 g <sup>-1</sup> ). ....	8
Cuadro 5. Presencia cualitativa de factores tóxicos en algunas leguminosas de importancia alimenticia. ....	9
Cuadro 6. Ubicación de algunas especies de <i>Lupinus</i> mexicanas. ....	18
Cuadro 7. Uso cosmetológico de semillas de lupino. ....	20
Cuadro 8. Usos farmacológicos de las semillas de lupino. ....	21
Cuadro 9. Usos en alimentación humana de la semilla de lupino. ....	22
Cuadro 10. El uso de los alcaloides de lupino en el control biológico. ....	22
Cuadro 11. Uso de las semillas de lupino como aditivo. ....	24
Cuadro 12. Uso de semillas de lupino en la alimentación animal. ....	24
Cuadro 13. Distribución porcentual de fracciones proteicas en leguminosas. ....	24
Cuadro 14. Principales alcaloides en especies de <i>Lupinus</i> (mg g <sup>-1</sup> de alcaloides totales). ....	27
Cuadro 15. Concentraciones de glucosa para preparar la curva de calibración de glucosa. ....	35
Cuadro 16. Curva de calibrado para polifenoles totales con ácido gálico. ....	37
Cuadro 17. Calidad de semillas en 100 g de muestra por especie. ....	42
Cuadro 18. Componentes de la vaina de las especies de <i>Lupinus</i> en estudio colectadas. ....	42
Cuadro 19. Variación en los pesos secos de harinas de semillas de <i>L. exaltatus</i> y <i>L. montanus</i> después de la aplicación de los tratamientos físicos y químicos. ....	43
Cuadro 20. Composición química de las semillas de <i>Lupinus</i> durante un tratamiento hidrotérmico a 95 °C. ....	45
Cuadro 21. Factores anti-nutricionales en semillas de dos especies de <i>Lupinus</i> durante un tratamiento térmico a 95° C. ....	48
Cuadro 22. Efecto de diferentes tiempos de remojo en la composición nutricional en semillas de <i>Lupinus</i> . ....	52
Cuadro 23. Factores anti-nutricionales en semillas de <i>L. exaltatus</i> y <i>L. montanus</i> tratadas con diferentes tiempos de remojo. ....	53

Cuadro 24. Proporción de los componentes de las semillas de lupino. ....	55
Cuadro 25. Composición nutricional y de alcaloides en semillas de <i>Lupinus</i> y sus componentes (testa y cotiledones). .....	55
Cuadro 26. Composición nutricional de semillas de <i>L. exaltatus</i> y <i>L. montanus</i> después de un tratamiento alcalino durante diferentes tiempo de exposición.....	58
Cuadro 27. Factores anti-nutricionales en semillas de <i>Lupinus</i> durante un tratamiento alcalino.....	59
Cuadro 28. Porcentaje de germinación, longitud del eje embrionario (cm), y rendimiento en peso de germinados de <i>L. montanus</i> y <i>L. exaltatus</i> después de 3 y 6 días de la germinación. ....	62
Cuadro 29. Composición nutricional en semillas y germinados de <i>L. exaltatus</i> y <i>L. montanus</i> . ....	65
Cuadro 30. Composición de FAN's de semillas de <i>Lupinus</i> durante un proceso germinativo. ....	67
Cuadro 31. Valores obtenidos del Rf (Relación con respecto al frente) a partir de muestras de semillas de <i>Lupinus</i> . ....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del género <i>Lupinus</i> en América (modificada de Hughes y Eastwood, 2006). .....	17
Figura 2. Distribución del género <i>Lupinus</i> en México (Bermúdez-Torres <i>et al.</i> , 1999). .....	18
Figura 3. Estructura característica del anillo heterocíclico de quinolizidina (Evans y Murphy, 2011). .....	26
Figura 4. Localización de los sitios de colecta (municipio de Chalchicomula de Sesma) de material reproductivo de <i>L. exaltatus</i> y <i>L. montanus</i> en la región de los Valles de Serdán y Libres, Puebla, México. ....	32
Figura 5. Cambios en la composición de factores nutritivos de semillas de <i>L. exaltatus</i> y <i>L. montanus</i> durante un tratamiento térmico a 95°C. ....	46
Figura 6. Cambios en la composición de factores anti-nutricionales de semillas de <i>L. exaltatus</i> y <i>L. montanus</i> durante un tratamiento térmico por 6 h. ....	49
Figura 7. Cambios de pH en el agua durante el tratamiento térmico aplicado a las semillas de <i>Lupinus</i> . ....	50
Figura 8. Cambios en la composición de factores anti-nutricionales de semillas de <i>L. exaltatus</i> y <i>L. montanus</i> durante un tratamiento de remojo por 18 h. ....	54
Figura 9. Distribución de nutrientes (a, b, c) y alcaloides totales (d) en las semillas de <i>L. exaltatus</i> y <i>L. montanus</i> . ....	56
Figura 10. Cambios en la composición de factores nutritivos de semillas de <i>L. exaltatus</i> y <i>L. montanus</i> durante un tratamiento alcalino por 9 días. ....	59
Figura 11. Cambios de pH en la solución durante el tratamiento alcalino aplicado a las semillas de <i>Lupinus</i> . ....	60
Figura 12. Cambios en la composición de factores anti-nutricionales de semillas de <i>L. exaltatus</i> y <i>L. montanus</i> durante un tratamiento alcalino por 9 h. ....	61
Figura 13. Relación porcentaje de germinación-peso seco de germinados de <i>L. exaltatus</i> (a) y <i>L. montanus</i> (b) después de 3 y 6 días. ....	63
Figura 14. Cambios en la composición de factores nutritivos de semillas de <i>L. exaltatus</i> y <i>L. montanus</i> durante un tratamiento de germinación durante 6 días. ....	66
Figura 15. Variación de factores anti-nutricionales por efecto de la germinación durante 6 días en semillas de <i>Lupinus</i> . ....	68
Figura 16. Análisis cualitativo para determinar la presencia de alcaloides en semillas de <i>Lupinus</i> , 1=estándar (1mg esparteína/ml), 2= <i>L. montanus</i> GV, 3= <i>L. montanus</i> MH, 4= <i>L. montanus</i> Miguel Hidalgo térmico 6h, 5= <i>L. montanus</i> MH remojo 18 h, 6= <i>L. montanus</i> MH alcalino 9 h, 7= <i>L. montanus</i> MH, cotiledones, 8= <i>L. exaltatus</i> , 9= <i>L. exaltatus</i> térmico 6h,	

10=*L. exaltatus* remojo 18h, 11=*L. exaltatus* alcalino 9h, 12= *L. exaltatus*,  
cotiledones..... 71

## ANEXOS

Anexo 1. Análisis químico proximal aplicados a las semillas de acuerdo a la AOAC 1990. ....	98
Anexo 2. Preparación de reactivo de Dragendorff para revelado de CCF. ....	100
Anexo 3. Efecto de especie, tratamiento y tiempo de exposición al tratamiento. ....	101
Anexo 4. Interacción especie*tiempo de las variables por tratamiento aplicado. ....	103
Anexo 5. Materia seca y humedad de las semillas de <i>Lupinus</i> . ....	107

# 1. INTRODUCCIÓN

El género *Lupinus* está ampliamente distribuido a nivel mundial y en América se reportan alrededor de 260 especies (Eastwood y Hughes, 2008), que crecen en suelos ácidos e incluso se adaptan a diversas condiciones climáticas donde otras leguminosas no son capaces de crecer. Cinco especies son cultivadas en el mundo y usadas principalmente como alimento humano y animal: *Lupinus albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus*, *L. consentinii* y *L. mutabilis* Sweet (Clements *et al.*, 2005). *Lupinus polyphillus* ha sido mejorado para su uso ornamental (Welsh, 1974; Rapp, 2009).

Las semillas de éste género tienen un alto contenido de proteína y buen valor nutritivo (García-López *et al.*, 2001; Sujak *et al.*, 2006). La limitación de un uso más amplio de *Lupinus* se debe a su alto contenido de alcaloides quinolizidínicos (AQ) que son considerados tóxicos. Estos inhiben la absorción de compuestos nutricionales o producen el rechazo del alimento y se incluyen dentro de los factores anti-nutricionales; pero en concentraciones adecuadas son benéficos para la salud humana y animal. La aplicación de procesos como la cocción, germinación, fermentación y remojo en semillas reducen los factores anti-nutricionales e incrementan su potencial como alimento humano y nutritivo (Tharanathan y Mahadevamma, 2003; Prodanov *et al.*, 2004; Khattab *et al.*, 2009). El uso de la mutagenésis para la obtención de genotipos con bajo contenido de alcaloides ha sido aplicada en *L. albus*, *L. luteus* y *L. angustifolius* (Golovchenko, 1982; Gladstones, 1998).

En México, se han descrito al menos 65 especies del género *Lupinus*, de ellas alrededor del 60% son endémicas (Sousa y Delgado, 1998). Principalmente se distribuyen en la sierra Madre Occidental y el Eje Neovolcánico Transversal (Ruiz-Moreno *et al.*, 2000). Las semillas de especies silvestres mexicanas del estado de Hidalgo, Jalisco, Colima y Morelos presentan un buen valor nutricional por sus elevados contenidos proteicos (35-44%), y por lo tanto podrían ser considerados como alternativa al creciente consumo de proteína vegetal (Jiménez-Martínez *et al.*, 2001; Ruiz y Sotelo, 2001; Ruiz *et al.*, 2006; Güemes-Vera *et al.*, 2012). Estudios en

lupinos silvestres especialmente en semillas de *L. campestris* muestran un efecto reductor de tratamientos térmicos y alcalinos sobre la concentración de factores anti-nutricionales y la mejora de los nutricionales (Jiménez-Martínez *et al.*, 2001). Las especies silvestres identificadas en la Región de los Valles de Serdán y Libres de Puebla presentan un contenido elevado de proteínas y buen valor nutricional, pero altos contenidos de alcaloides (Lagunes-Espinoza *et al.*, 2012; Pablo-Pérez, 2013). En éstas especies el efecto de tratamientos para la reducción de compuestos anti-nutricionales no ha sido evaluado. Por lo anterior, se plantearon los siguientes objetivos:

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Cuantificar los cambios bioquímicos en semillas de *Lupinus* spp. asociados a tratamientos físicos, químicos y biológicos.

### **2.2 Objetivos particulares**

a) Evaluar el efecto de tratamientos hidrotérmicos, de remojo, alcalino y el descascarillado de la semilla sobre la composición química y la concentración de alcaloides, fenoles totales, taninos totales y taninos condensados en semillas de *L. montanus* y *L. exaltatus*.

b) Determinar la concentración de los factores nutricionales y anti-nutricionales en semillas de *L. montanus* y *L. exaltatus* antes y después de 3 y 6 días de un tratamiento germinativo.

## **3. HIPÓTESIS**

Al menos uno de los tratamientos evaluados disminuye en un 100% la concentración de los compuestos anti-nutricionales, y mantiene la de los factores nutricionales.



## 4. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Importancia de las leguminosas de grano en la alimentación

Las leguminosas pertenecen a la familia Fabaceae caracterizada por la presencia de semillas contenidas en una vaina que constituye el fruto o legumbre. Se cultivan desde hace 6000 a 8000 años y los sistemas agrícolas de las primeras dinastías egipcias y en la época romana ya las incluían (Aykroyd, 1977). Esta familia comprende alrededor de 650 géneros y 20000 especies (Doyle, 1994), no obstante menos del 20% de estas se aprovechan como fuente de alimento para el consumo humano o animal, además las leguminosas han sobresalido como recursos sustitutos de proteína animal eficaz y rentable (Famurewa y Raji, 2005). Representan un componente importante de la dieta de la población mundial y actualmente constituyen alrededor del 20% de la proteína consumida en el mundo (Kyle, 1995). En este sentido, gobiernos locales, especialistas en nutrición e investigadores han concentrado sus esfuerzos en aprovechar a las leguminosas silvestres y subutilizadas que han permanecido sin explorar, que son poco utilizadas o se localizan en una región en particular, para aliviar el hambre o combatir problemas de desnutrición en especial en países en desarrollo (Chel-Guerrero *et al.*, 2002; Arinathan *et al.*, 2003).

La mayoría de las leguminosas son principalmente cultivadas por sus semillas, que son fuente importante de carbohidratos, fibra, aceite y proteínas (Summerfield y Bunting, 1980); el contenido de éstas se encuentra en el rango de 17 a 40% y es superior al encontrado en los cereales (7-13%) y parecido al de la carne (18-25%) (de Almeida *et al.*, 2006).

En la alimentación humana, se aprovechan alrededor de 20 especies en forma importante y menos de 12 de manera generalizada. Las especies más conocidas son frijol (*Phaseolus vulgaris*), garbanzo (*Cicer arietinum*), lenteja (*Lens esculenta*), chícharo (*Pisum sativum*), haba (*Vicia faba*), cacahuete (*Arachys hypogaea*), ayocote (*Phaseolus coccineus*), alfalfa (*Medicago sativa*), soya (*Glycine max*), tamarindo (*Tamarindus indica*) y en ciertas regiones del continente americano y europeo las especies del género

*Lupinus* (*L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus*, *L. cosentinii*, *L. mutabilis*). De las leguminosas se utilizan sus vainas inmaduras (ejotes), las semillas maduras o inmaduras (haba) o las hojas (alfalfa) y las raíces (jícama: *Pachyrhizus erosus*) (Aykroyd, 1977).

En función de su contenido lipídico, las leguminosas se clasifican en dos grupos: oleaginosas con niveles de grasa elevados de 20-50% (soya y cacahuate), y; leguminosas secas o de grano con un nivel de grasa inferior al 7% ( frijol, haba, chícharo, garbanzo, lenteja, entre otras) (Torija y Díez, 1999). Por su composición son consideradas como elementos básicos de la dieta en ciertas regiones del mundo, tal es el caso del frijol común (*P. vulgaris*) en México y Centroamérica; el frijol lima (*P. lunatus*) en Sudamérica; lenteja, chícharo y garbanzo en Medio Oriente, regiones de África y en la India; haba alrededor del Mediterráneo y soya en el Lejano Oriente (Fraile *et al.*, 2007). Además, son una familia de gran importancia económica por los diversos usos que poseen. Muchas especies son comestibles, y usadas como forrajes, proveedoras de madera, productoras de colorantes (*Haematoxylum campechianum*), purgantes (*Cassia acutifolia* y *C. angustifolia*), gomas (*Acacia senegal*), curtientes (*Acacia decurrens*) u, ornamental (Tharanathan y Mahadevamma, 2003; Fernández-Orozco *et al.*, 2009). Además, la utilidad de las leguminosas se extiende al empleo como materia prima para laxantes, esteroides, etc. en la industria química y farmacéutica (López-Bellido, 1993).

La industrialización de sus semillas ha permitido su integración en diversos alimentos tradicionales y sus proteínas se emplean como ingredientes tecnofuncionales en la industria alimentaria (Lampart-Szczapa, 2001). Las más comunes, son las semillas de soya y cacahuate, estas representan el 69% y 2.8% respectivamente de la producción mundial de proteínas vegetales (Deshpande y Deshpande, 2001; Moure *et al.*, 2006). En México, la semilla de soya es la principal fuente de proteína vegetal. En el año 2012 la producción de soya fue de 234,200 t (5.42%) y el consumo industrial de 4,313,400 t (SIAP, 2012). Esto generó un déficit de 4,079,200 t, es decir, más del 90% de la semilla de soya requerida en el país es importada.

El consumo preferente de la población por la proteína animal ha creado una injustificada escasez de recursos vegetales, por lo que el estudio de las leguminosas silvestres y subutilizadas podría ser de gran importancia para la seguridad alimentaria, al integrar requerimientos nutricionales y desarrollo agrícola. Las leguminosas silvestres o poco utilizadas como *Mucuna* spp., *Canavalia* spp., *Sesbania* spp. y *Lupinus* spp. por mencionar algunas, poseen niveles de proteínas, aminoácidos esenciales, ácidos grasos poliinsaturados, fibra dietética, minerales esenciales y vitaminas comparables a las de otras leguminosas comunes. Además poseen compuestos bioactivos benéficos y se adaptan a condiciones ambientales adversas (Bhat y Karim, 2009). Esto conlleva a revalorar a la familia Fabaceae e incrementar el trabajo de bioprospección para su mejora y conservación.

#### 4.2. Composición química de semillas de leguminosas de grano

Comparadas con los cereales, las leguminosas contienen de dos a tres veces más proteína, pero la calidad de la proteína de estas depende en gran medida de su composición de aminoácidos. Las leguminosas son generalmente deficientes en aminoácidos azufrados y los cereales ricos en ellos. La complementaridad entre proteína de leguminosa y de cereales aporta un buen balance nutrimental similar al de la carne. Entre las especies de leguminosas los rangos de contenido proteico varían de 17 a 40%, siendo las especies de lupino y soya las que presentan el mayor contenido (Cuadro 1).

La proteína de las leguminosas es rica en aminoácidos esenciales como isoleucina, leucina, fenilalanina, treonina y valina (Cuadro 2). Sin embargo, las proteínas de las leguminosas son consideradas de baja calidad, debido a la baja concentración de aminoácidos azufrados, solo poseen la mitad de los que contiene el albumen del huevo (Kelly, 1975). La suplementación de metionina y cistina usualmente mejora la calidad nutricional de las leguminosas.

No obstante, el alto contenido de lisina que es un aminoácido deficiente en los cereales, hace que la proteína de las leguminosas constituya un buen complemento.

La mezcla de ambos mejora el balance de aminoácidos y la digestibilidad; por ejemplo: frijol y arroz, frijol y maíz, arroz y soya (Aykroyd, 1977).

**Cuadro 1. Composición nutricional de leguminosas, cereales y carne de res magra.**

Alimento	Proteína (%)	Grasa (%)	Carbohidratos (%)	Fibra cruda (%)	Ceniza (%)
Frijol*	21.4	1.2	64.1	5	3.6
Garbanzo	19.5	5.7	61.7	4	2.7
Cacahuete	22.7	44.5	25.5	2.9	3.7
Haba	24.8	1.4	60.4	7	3.3
Lenteja	24.7	1.1	60.1	4.1	2.6
Chícharo	23.9	1.3	62.4	3.4	2.5
Soya	31.4	17.7	33.5	4.1	2.5
Lupino blanco	35.7	7.8	-	17.3	3.2
Hojuelas de avena	14.2	7.4	68.2	-	-
Cereal trigo integral	13.5	2	72.3	-	-
Carne de res magra	20.2	12.3	0	-	-

Fuente: Batterham y Egan (1986); Agustin y Clein (1989); Charley (1999); Jiménez-Martínez *et al.* (2003); y Bhat y Karim (2009).

\*Variedad Pinto mexicano

**Cuadro 2. Contenido de aminoácidos en las leguminosas más comunes (mg g<sup>-1</sup>).**

Aminoácidos	<i>Lupinus mutabilis</i>	<i>Arachys hypogaea</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Glycine max</i>
Isoleucina	274	211	262	284
Leucina	449	400	476	486
Lisina	331	221	450	399
Metionina	47	72	66	79
Cistina	87	78	53	83
Fenilalanina	231	311	326	309
Tirosina	221	244	158	196
Treonina	228	163	248	241
Triptófano	110	65	-	80
Valina	252	261	287	300
Histidina	594	697	355	452

Fuente: Villacrés *et al.* (1998).

Cualquier disminución en la digestibilidad de las proteínas de las leguminosas, por lo general acentúa la deficiencia de los aminoácidos azufrados (Liener, 1976).

Las leguminosas también son una fuente importante de diversas vitaminas del

complejo B. En el Cuadro 3, se observan las principales vitaminas y su concentración en algunas leguminosas, siendo las de mayor concentración la niacina y el ácido pantoténico. En las leguminosas oleaginosas como el cacahuate y la soya, la tiamina se encuentra en alta proporción, no contienen ácido ascórbico y prácticamente carecen de vitamina A (Augustin y Klein, 1989).

**Cuadro 3. Principales vitaminas de algunas leguminosas más comunes (mg 100 g<sup>-1</sup>).**

Leguminosa	Tiamina	Riboflavina	Niacina	Vit. B6	Ácido fólico	Ácido pantoténico
Cacahuate	0.90	0.183	15.44	0.582	0.401	2.92
Garbanzo	0.51	0.228	1.72	0.56	0.481	1.42
Soya	0.87	0.330	2.35	0.627	0.250	1.73
Lenteja	0.54	0.238	2.30	0.549	0.432	1.78
Chícharo	0.79	0.254	2.94	0.153	0.322	1.91
Haba	0.52	0.286	2.52	0.374	0.431	1.00
Lupino blanco	0.36	0.610	-	-	-	-
Lupino amarillo	1.49	0.850	-	-	-	-
Tarwi*	0.51	0.420	4.10	-	-	-

Fuente: Gross (1982); Augustin y Klein (1989); Martínez-Villaluenga *et al.* (2006). \**Lupinus mutabilis*

El contenido de minerales en las leguminosas es del 2.5-4.2%. El elemento mineral mayoritario es el potasio, seguido del fósforo. El calcio y el magnesio están presentes en una concentración de 49-302 mg 100 g<sup>-1</sup> y el hierro en 4.0-8.6 mg 100 g<sup>-1</sup> (Cuadro 4). Este último se compara favorablemente con el aportado por una carne magra cuya composición promedio es de 3 mg 100 g<sup>-1</sup> (Kadam *et al.*, 1989; Torija y Díez, 1999). También son ricas en Hierro y Zinc (4.0-5.1) (Von Baer, 1990).

#### 4.2.1 Factores anti-nutricionales

Las leguminosas son un alimento importante por su contenido nutricional. Sin embargo, contienen compuestos no nutritivos que pueden interferir en su asimilación, aprovechamiento y digestibilidad. Se les denomina “factores anti-nutritivos” o “factores no nutritivos”. Incluyen inhibidores de proteasas y tripsina, antivitaminas, alérgenos, ácido fítico, saponinas, lectinas, compuestos polifenólicos,

entre otros (Liener, 1989; Bartholomai *et al.*, 2000; Janardhanan *et al.*, 2003; Serrano y Goñi, 2004).

**Cuadro 4. Composición mineral de algunas leguminosas (mg 100 g<sup>-1</sup>).**

Leguminosas	Fósforo	Potasio	Calcio	Magnesio	Hierro
Cacahuete	460.4	786.6	66	268.3	5.92
Garbanzo	365.7	1044.2	165	202.7	6.23
Soya	477	1820	223.1	284.5	8.66
Lenteja	408.5	970	59.3	180.7	8.07
Chícharo	332.9	1049.5	49.1	157.2	5.02
Haba	373.3	1503.1	97.8	214.7	6.66
Lupino	440-880	1106-1356	107-153	200-302	4.6-7.3

Fuente: August y Klein (1989); Von Baer (1990); Pablo-Pérez (2013).

Estos compuestos producen efectos secundarios en humanos y animales (inhibición del crecimiento, daño en algunos tejidos del cuerpo o respuestas adversas en el funcionamiento del organismo) cuando son consumidos en grandes cantidades; en ocasiones son tóxicos y en casos extremos letales. En pequeñas concentraciones pueden ser benéficos para la salud como antioxidantes, prebióticos, protectores del sistema circulatorio, reductores de la presión sanguínea, reguladores de la glucemia y la colesterolemia, anticancerígenos, antimicrobianos, mejoradores de la respuesta inmune, entre otros; y por ello, actualmente se les denomina “factores nutricionalmente activos” o “compuestos bioactivos” y se les valora por su uso farmacéutico (Cardador-Martínez *et al.*, 2002; Muzquiz *et al.*, 2004; Bhat y Karim, 2009).

Los factores anti-nutritivos intervienen también en el metabolismo secundario de las leguminosas como compuestos de reserva (inositoles fosfato,  $\alpha$ -galactósidos) que se sintetizan y acumulan durante la maduración de la semilla para el proceso germinativo o como mecanismo de defensa de la planta (inhibidores de tripsina, lectinas, taninos, L- DOPA, vicina, convicina) que actúan contra bacterias, virus, hongos, insectos y animales, incluido el hombre (Chung *et al.*, 1998). Son compuestos de naturaleza muy variada: proteínas (inhibidores de proteasas, inhibidores de  $\alpha$ -

amilasas, lectinas), glúcidos ( $\alpha$ -galactósidos, vicina, convicina, saponinas), aminoácidos no proteicos (L-DOPA,  $\beta$ -ODAP), polifenoles (taninos condensados), oligosacáridos causantes de flatulencias, alcaloides (Udensi *et al.*, 2007). La concentración de estos compuestos difiere en todas las leguminosas (Cuadro 5), depende de la época de cosecha, etapa de desarrollo de la planta, y el tipo de suelo (Bhardwaj *et al.*, 1998) y por ello varían sus efectos fisiológicos en el hombre y animales (Grela *et al.*, 2001; Bhat y Karim, 2009).

**Cuadro 5. Presencia cualitativa de factores tóxicos en algunas leguminosas de importancia alimenticia.**

<b>Factores anti-nutricionales</b>	<b>Haba</b>	<b>Chícharo</b>	<b>Frijol</b>	<b>Lupino</b>	<b>Soya</b>
Taninos	Alto	Bajo	Bajo-medio	Bajo	Bajo
Inhibidores de tripsina	Bajo-medio	Bajo-medio	Bajo	Bajo	Alto
Lectinas	Bajo	Medio	Alto	Bajo	Alto
Fitatos	Bajo	Bajo	?	?	?
Glucósidos tóxicos	Alto	Ausente	Ausente	Ausente	*
Alcaloides	Ausente	Ausente	Ausente	Alto	Ausente
Oligosacáridos	Medio	Bajo	Medio	Medio	Bajo

Fuente: Huisman *et al.* (1989).

?- no hay datos concluyentes

\*La soya contiene saponinas, pero en estos glucósidos no está bien definido su efecto dañino.

Durante el procesamiento de alimentos, diferentes metodologías modernas (extrusión/cocción, microondas, altas presiones y campos eléctricos) y tradicionales (cocción, tostado, remojo, germinación y fermentación) se han aplicado y estandarizado, para reducir o eliminar factores anti-nutricionales en leguminosas cultivadas, subutilizadas y silvestres. Estas metodologías son efectivas en la mayoría de los casos. Incluso la aplicación de métodos biotecnológicos modernos han sido exitosos (Seena *et al.*, 2006; Azeke *et al.*, 2007; Gurumoorthi *et al.*, 2008). La reducción de antinutrientes ha resultado sencilla pero, el mantener las cualidades nutritivas ha sido un desafío. Por lo tanto, dependiendo de las preferencias de los consumidores de retención o eliminación de estos compuestos, el uso de metodología específica puede ser requerido.

### 4.3 Métodos para disminuir factores anti-nutricionales (FAN's)

Los factores anti-nutricionales pueden ser divididos en: termolábiles y estables al calor. Los termolábiles, incluyen a los inhibidores de proteasas presentes en todas las leguminosas y a las lectinas o fitohemaglutininas, goitrógenos, antivitaminas D, E y B<sub>12</sub> y los inhibidores de  $\alpha$ -amilasas. Los compuestos anti-nutritivos parcialmente termoestables incluyen saponinas, estrógenos, cianógenos, fitatos, alcaloides, oligosacáridos, taninos, glucósidos pirimidínicos como vicina y convicina. En el caso de los taninos existe controversia en su clasificación, ya que en algunos estudios se han observado reducciones con tratamientos térmicos y no térmicos (Chau y Cheung, 1997; Pastuszewska *et al.*, 2004; Mubarak, 2005; Khattab y Arntfield, 2009).

Entre los métodos utilizados para reducción de FAN's está el mejoramiento genético y diferentes tratamientos aplicados en el procesamiento tales como descascarillado, remojo, cocción, fermentación y germinación. Algunos incluso también mejoran la calidad nutricional de las leguminosas en diversos grados (Chi-Fai *et al.*, 1997; Mubarak, 2005; Muzquiz *et al.*, 2006; Sangronis *et al.*, 2006). Otro método que se ha aplicado a las semillas para reducción de FAN's, es el calentamiento por infrarrojos, llamado micronización que se aplica a los granos de cereales para mejorar su digestibilidad, reducir los inhibidores de la tripsina y mejorar su palatabilidad para la alimentación animal (Hutton y Foxcroft, 1975). También para preparar cereales cocidos, en copos y productos tostados para alimentación humana (Murray, 1987). Arntfield *et al.* (2001) indican que la micronización de lentejas (138°C y 33 g 100 g<sup>-1</sup> de humedad durante 16 h) aumentó el almidón gelatinizado y sustancias pépticas, pero disminuyó los niveles de ácido fítico en comparación con las lentejas sin procesar.

#### 4.3.1 Remojo

El remojo es parte integral de varios tratamientos (cocción, enlatado, germinación y fermentación) y consiste en la hidratación de las semillas, usualmente hasta alcanzar su peso máximo. Es un método de reducción de ciertos componentes solubles en



agua como oligosacáridos de rafinosa, glucósidos pirimidínicos, saponinas, inosítoles fosfato, minerales, inhibidores de proteasas, lectinas o taninos, que pasan al agua de remojo (Prodanov *et al.*, 2004). En ocasiones, la testa gruesa y dura de algunas leguminosas, evita la difusión de estos compuestos. Por ejemplo, el remojo de las semillas de *Phaseolus calcaratus* y *P. angularis*, generalmente produce una reducción significativa de fitatos, taninos, inhibidores de tripsina e inhibidores de amilasa (Chau y Cheung, 1997). El grado de eliminación de factores anti-nutritivos depende de la temperatura de remojo, del pH del medio, del tipo de leguminosa y de las propiedades de solubilidad de los componentes. Alaa *et al.* (1982) reportaron que la actividad inhibitoria de tripsina (AIT) en semillas de frijol y lenteja fue disminuida mediante el remojo en agua a temperatura ambiente durante 24 h y el remojo hidrotérmico de las mismas semillas a 121 °C durante 30 min inactivaron completamente la AIT.

En semillas de caupí, chícharo y frijol, el remojo durante 18 a 22 h redujo taninos (50-90%), oligosacáridos (44%), ácido fólico (42-48%) e inhibidores de tripsina (10-19%) (Khattab y Arntfield, 2009). El remojo en agua de semillas de lenteja durante 9 h a temperatura ambiente redujo en 11% el ácido fólico (Vidal-Valverde *et al.*, 1994).

#### 4.3.2 Tratamiento térmico

El procesamiento comercial de alimentos, mediante la aplicación de calor a los productos de semillas, contribuye a mejorar la calidad de la proteína, composición de aminoácidos y la digestibilidad mediante la destrucción de ciertos compuestos anti-nutricionales (Aguilera *et al.*, 1983; Khattab *et al.*, 2009). La cocción es probablemente el tratamiento más antiguo para hacer comestibles las leguminosas (Aykroyd, 1977). En general, la cocción produce la desnaturalización de las proteínas y su difusión en la fase líquida, inactiva los factores anti-nutricionales sensibles al calor, disminuyen el ácido fólico y los contenidos de  $\alpha$ -galactósidos (Prodanov *et al.*, 2004; Khattab *et al.*, 2009). Usualmente se lleva a cabo un cocimiento con agua que requiere generalmente

de 3 a 4 h de hervido, después del remojo y lavado; este tratamiento se puede realizar a presión atmosférica, o bien a alta presión y temperatura.

Otras formas de procesado, son tostado, fritura y la extrusión. Con estos procedimientos se hidrolizan, o desnaturalizan muchas de las sustancias tóxicas presentes en las semillas (Duffus y Slaughter, 1992; Alonso *et al.*, 2000).

Por otro lado, los oligosacáridos, el ácido fítico, saponinas y L-dopamina son compuestos estables a altas temperaturas (Siddhuraju *et al.*, 1996), pero son solubles bajo las condiciones de cocimiento tradicional dependiendo de la solubilidad de cada compuesto en el agua y/o los cambios de pH en el medio de cocción. Tratamientos hidrotérmico (ebullición), autoclave y cocción por microondas redujeron significativamente la concentración de taninos, ácido fítico, inhibidores de tripsinas y oligosacáridos de frijol mungo (Mubarak, 2005), caupí (Udensi *et al.*, 2007), frijol negro, rojo y blancos. El tratamiento hidrotérmico ha mostrado ser el más efectivo (Rehman y Shah, 2005; Khattab y Arntfield, 2009).

La reducción en el contenido de taninos condensados (de 8.46 a 5.51 g kg<sup>-1</sup> MS) por la cocción en agua desionizada durante 1 h (después de la inmersión durante 18 h) fue observada en chícharo (Pastuszewska *et al.*, 2004). En semillas de soya, Armour *et al.* (1998) mostraron la inactivación completa de la lectina de soya y la actividad inhibidora de la proteasa por el tratamiento térmico acuoso a 100 °C durante 10 min.

El tostado es un proceso de calentamiento común aplicado a las leguminosas, que generalmente conduce a una reducción significativa de fibra dietética insoluble y fibra dietética total, pero ocasiona un aumento de fibra dietética soluble (Azizah y Zainon, 1997; Mahadevamma y Tharanathan, 2004).

Por lo tanto, el tostado es un método eficaz, sencillo y económico que se puede utilizar en los países en desarrollo a fin de lograr el máximo aprovechamiento de nutrientes de las leguminosas. Es importante mencionar que se ha observado que la aplicación de temperaturas muy elevadas, modifican las características organolépticas y reducen el valor nutritivo de las semillas, por lo que es más eficiente aplicar tratamientos húmedos que faciliten la desnaturalización de los

compuestos no deseados (Kadlec *et al.*, 2004).

Un método adicional para reducir el contenido de los FAN's es la extrusión, donde los alimentos son tratados en diversas condiciones de alta temperatura y alta presión. La extrusión de semillas de haba a 152-156 °C redujo alrededor de 54% el nivel de taninos condensados, y de 53% el de inhibidores de tripsina (IT) (Alonso *et al.*, 2000). La reducción del contenido de taninos condensados e inhibidores de tripsina pueden contribuir a la protección y por tanto, a la mejora en la absorción de la proteína y la digestibilidad de aminoácidos en los chícharos extruidos (Mariscal-Landin *et al.*, 2002).

#### 4.3.3 Fermentación y germinación

La fermentación y la germinación son procedimientos igualmente conocidos para disminuir la concentración de compuestos que generen efectos adversos en la salud. En la germinación, durante la imbibición el alto contenido de humedad de las semillas en leguminosas hace más fácil la desnaturalización de los inhibidores de tripsina. Por ejemplo, en frijol común, la fermentación de semillas previamente remojadas durante 48 h, sin la adición de un cultivo iniciador, redujo en 68% el ácido fítico (Gustafsson y Sandberg, 1995). También en frijol la fermentación disminuyó fitatos (66-68%), oligosacáridos (72%) e inhibidores de tripsina, (47%) (Khattab y Arntfield, 2009). La mayor reducción se atribuyó a la reducción en el pH por debajo de 4.5, que mejora la hidrólisis de anti-nutrientes (Conn, 1973; Viana *et al.*, 2007). Barampama y Simard (1994) encontraron que la fermentación de frijoles secos con *Lactobacillus fermentum* a 37 °C por 72 h tuvo una reducción de 38.7% en el contenido de inhibidores de tripsina.

La germinación se ha documentado como un tratamiento eficaz para eliminar algunos de los factores anti-nutricionales en leguminosas mediante la movilización de compuestos del metabolismo secundario que se considera funcionan como nutrientes de reserva. El proceso de germinación no requiere la producción de energía intensiva; la síntesis de proteínas y la actividad respiratoria inicialmente

implican componentes almacenados dentro de la semilla madura seca (Nonogaki *et al.*, 2010). Las proteínas de almacenamiento son hidrolizadas y los aminoácidos son transportados en el eje embrionario de las plántulas en crecimiento (Esonu *et al.* 1998). El ácido fítico sirve como una importante reserva de fosfato generado por la acción de la fitasa durante este proceso, que lo hidroliza e incrementa el P inorgánico disponible (Reddy *et al.*, 1978). Así, la germinación puede disminuir el contenido de fitato en las semillas de leguminosas, dependiendo del tipo de grano y condiciones de germinación.

En el caso de taninos la germinación a 25 °C durante períodos de 24, 48 y 72 h disminuyó en 56, 58 y 60%, respectivamente los niveles de taninos condensados en semillas de habas, además, redujo inhibidores de tripsina 11 y 12% (Alonso *et al.*, 2000). Semillas de habas remojadas por 12 h y germinadas durante siete días entre 16 y 17 °C, redujeron hasta en 100% su concentración de vicina y convicina (Jamalian, 1999). En colza, la germinación ocho días después de siembra redujo el contenido de glucosinolatos de 4.4 a 1.8 mg g<sup>-1</sup> (Mahajan y Dua, 1997). En semillas de *Mucuna* sumergidas en agua hirviendo y germinadas por 5 y 7 días se redujo L-DOPA hasta un 24.9 y 38.5%, respectivamente (Wanjekeche *et al.*, 2003).

#### 4.3.4 Tratamientos alcalinos

La solubilidad alcalina seguida de una precipitación isoelectrica aplicadas para *P. lunatus* y *Canavalia ensiformis* han sido muy utilizadas (Boye *et al.*, 2010). Esta técnica es probablemente efectiva debido a la diferencia de solubilidad entre las proteínas y ciertos FAN's a un pH específico, además de que en ese medio las semillas de las leguminosas presentan la tendencia de hidratarse con mayor rapidez que en medio acuoso (Fredrikson *et al.*, 2001; Jiménez-Martínez *et al.*, 2001). D'Mello y Walker (1991) lograron un éxito considerable con el álcali, bicarbonato de potasio, para destoxificar *Canavalia*. La relativa facilidad con la que la canavanina fue extraída de los granos enteros indica su solubilización completa en el álcali. En la misma especie la extracción de la harina con diferentes disolventes (ácido, éter y alcohol) produjo

fracciones de toxicidades diferentes, en base a la solubilidad de los principios tóxicos en el medio de extracción (Ologhobo *et al.*, 1993). Una concentración más alta de FAN's en la fracción de base soluble fue observada, reafirmando el efecto positivo del tratamiento alcalino.

En frijol común (*P. vulgaris*) se ha observado que una cantidad sustancial de inhibidores de la tripsina fue removida por inmersión en soluciones ácidas o alcalinas (Eicher y Satterlee, 1988). Fernández *et al.* (1993) observaron que el remojo de semillas de haba en solución de bicarbonato de sodio al 0.07% fue más eficaz en la disminución de la actividad del inhibidor de tripsina que el remojo en solución de ácido cítrico al 0.1%, probablemente debido a la estabilidad del inhibidor en pH ácido. En semillas de *Mucuna pruriens*, el hervido en solución alcalina de carbonato de sodio hidratado, conocido como "sosa Magadi", redujo L-DOPA 59.3% (Wanjekeche *et al.*, 2003). Nyirenda *et al.* (2003) estudiaron los efectos de diferentes métodos de procesamiento para la reducción de L-DOPA, que fueron adecuados para la preparación de semillas de *Mucuna* para el consumo humano. Las semillas en remojo por 48 h (1.5 L) + 6 h hirviendo (1.5 L) seguida de una inmersión en 1.5 L durante 24 horas en presencia de bicarbonato de sodio (0.25%) extrajo aproximadamente 90% de L-DOPA. Bressani *et al.* (2003) han concluido que, a pesar de que las combinaciones de ebullición, tratamiento con bicarbonato de sodio y remojo reducen la concentración de L-DOPA, la ebullición sola es el mejor método para la eliminación de este FAN de las semillas de *Mucuna*.

#### 4.3.5 Mejoramiento genético

El mejoramiento genético de plantas es una alternativa para reducir el contenido de factores no deseados en diversas especies. Actualmente existen varios métodos y técnicas de mejoramiento genético de los cultivos (selección, cruza, cultivo *in vitro*, mutagénesis, o selección asistida por marcadores moleculares) que además de reducir compuestos anti-nutricionales han mejorado la producción de los cultivos y la calidad de sus productos (Casey *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2003).

En el caso de las leguminosas, estos métodos se han enfocado principalmente en el incremento y mejora de la calidad de la proteína, la eliminación de factores anti-nutricionales, la eliminación de posibles alérgenos, y un mejor comportamiento funcional para su procesamiento. Aunque los avances genéticos no han sido suficientes para alterar la composición de aminoácidos de las globulinas utilizando la variación natural, o la manipulación genética para modificar directamente la secuencia de aminoácidos exógenos o para expresar las proteínas ricas en azufre (Krishnan, 2000). En el caso de *L. albus* el mejoramiento genético ha sido muy utilizado para disminuir los alcaloides de las semillas (Huyghe, 1997). En *L. angustifolius*, científicos australianos durante la década de 1960, "domesticaron" a esta especie con la introducción de precocidad a floración, reducción del contenido de alcaloides en las semillas, indehiscencia de vainas, y testa permeable. A esta variedad le nombraron Lupino australiano dulce (LAD) (Sipsa, 2003).

Sin embargo, puesto que estos compuestos tienen diferentes roles benéficos en la planta (Wink, 1988; Obendorf, 1997; Scalbert, 1991; Wang *et al.*, 2003), la modificación de sus tipos y cantidades a través de modificación genética podría no ser lo más apropiado. La cuestión se debe, a que son vistos en todo su contexto como "factores no deseados" despreciando que estos también tienen un gran número de roles positivos en las plantas (Norton, 1991). Por lo tanto, se puede suponer que el uso de algunas tecnologías adecuadas y económicas de tratamiento de leguminosas destinadas a reducir o eliminar los FAN's antes de su uso en la alimentación humana y animal es una mejor forma de manejar el problema (Khattab, 2009).

#### 4.4 El género *Lupinus*

##### 4.4.1 Características generales

*Lupinus* es una leguminosa herbácea, anual, bianual o perenne, leñosa, con flores multicolores y vainas (Duranti *et al.*, 2008). Crece en suelos ácidos y es tolerante al frío, tanto en zonas desérticas como húmedas, por lo que se desarrolla en diversos

ambientes (Ruíz-López *et al.*, 2000). El género presenta una gran plasticidad fenotípica por lo que existe una variación considerable entre y dentro de las especies (Wolko *et al.*, 2011).

#### 4.4.2. Distribución

El género *Lupinus* está ampliamente distribuido tanto en el Viejo Mundo (Mediterráneo y África del Norte-Este) como en el Nuevo Mundo desde América de Norte al Sur (Figura 1) (Eastwood y Hughes, 2008). Del género *Lupinus* se conocen alrededor de 400 especies en todo el mundo. En la actualidad, han sido domesticadas cinco: *L. albus* y *L. luteus* en Europa; *L. angustifolius* y *L. consentinii* en Australia y *L. mutabilis* en Sudamérica (Gladstones, 1998; Martínez-Villaluenga *et al.*, 2006).



Figura 1. Distribución del género *Lupinus* en América (modificado de Hughes y Eastwood, 2006).

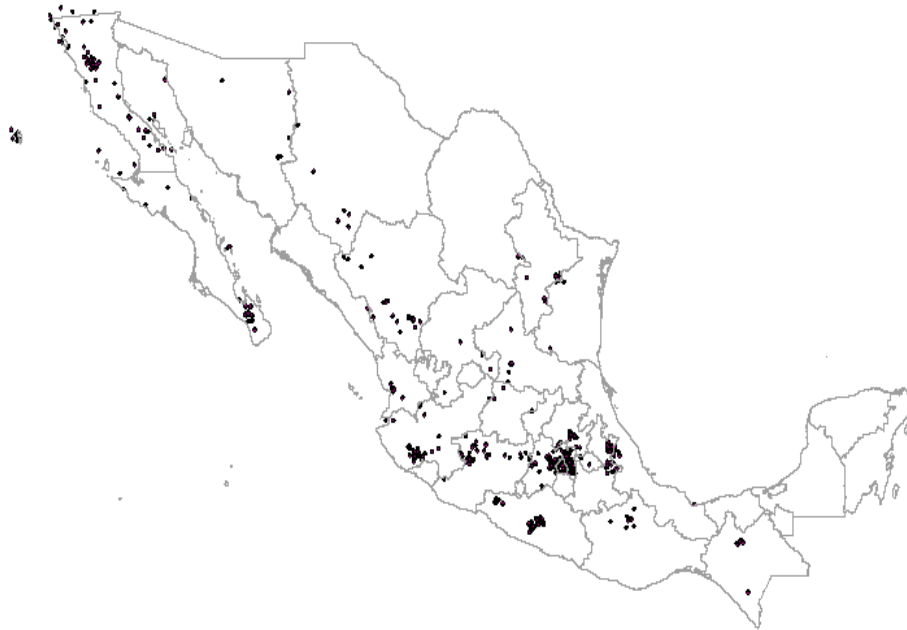


Figura 2. Distribución del género *Lupinus* en México (Bermúdez-Torres *et al.*, 1999).

En México, Bermúdez-Torres *et al.* (1999), indicaron la presencia de 111 especies de *Lupinus* en el Herbario Mexus distribuidas desde Baja California a Chiapas. La mayor diversidad de especies se localizó en la región Sierra Madre Occidental (35 especies), y en la Faja Volcánica Mexicana (44 especies) (Figura 2).

A pesar de la gran biodiversidad de especies del género en México (Cuadro 6), se tienen pocos estudios de las especies nativas de *Lupinus* para su utilización como fuente de alimento (Ruíz-López, 2006).

#### 4.4.3 Producción

En la actualidad, Australia es el mayor productor y exportador mundial de este cultivo, exportando 15 millones de t de granos en los últimos 20 años a países como España, Países Bajos, Indonesia, Japón, Corea del Sur, Tailandia y Taiwán.

El lupino Australiano dulce se utiliza para consumo humano desde el año 1987 de acuerdo a la Food Standards Australia New Zealand (Sipsa, 2003).

Australia mantiene el equipo más grande del mundo en investigación para el mejoramiento de *L. angustifolius* y la obtención de variedades dulces cuyo



rendimiento se ha incrementado de 0.7 t ha<sup>-1</sup> en 1970 a alrededor de 1.5 t ha<sup>-1</sup> en el presente.

**Cuadro 6. Ubicación de algunas especies de *Lupinus* mexicanas.**

Ubicación	Especie	Referencia
Jalisco	<i>L. exaltatus</i> Zucc., <i>L. reflexus</i> Rose y L. <i>mexicanus</i> Cerv. Ex Lag.	Ruiz-López <i>et al.</i> (2000)
	<i>L. rotundiflorus</i> M.E. Jones, <i>L. elegans</i> L., <i>L. simulans</i> Rose y <i>L. madrensis</i> Seem	Ruiz y Sotelo (2001)
Morelos	<i>L. campestris</i>	Jiménez-Martínez <i>et al.</i> (2001); Rodríguez-Ambríz <i>et al.</i> (2005)
Popocatepetl-Iztaccihuatl	<i>L. montanus</i> H.B.K, <i>L. stipulatus</i> J. Agardh. y <i>L. aschenbornii</i> Schauer	Bermúdez-Torres <i>et al.</i> (2009)
Hidalgo	<i>L. barkeri</i> , <i>L. ehrenbergii</i> , <i>L. elegans</i> , <i>L. exaltatus</i> , <i>L. filicaulis</i> , <i>L. glabratus</i> , <i>L. leptophyllus</i> , <i>L. marshallianus</i> , <i>L. mexicanus</i> , <i>L. montanus</i> , <i>L. persistens</i> , <i>L. simulans</i> , <i>L. stipulatus</i> , <i>L. uncinatus</i> y <i>L. versicolor</i> Sweet	Villavicencio y Pérez-Escandón (1998)
Puebla	<i>L. campestris</i> , <i>L. exaltatus</i> , <i>L. montanus</i> y <i>L. hintonii</i>	Lagunes-Espinoza <i>et al.</i> (2012)

En Europa *L. albus* ha sido un ingrediente alimentario en Europa durante muchos años. El consumo de *L. angustifolius* dulce fue aprobado en 1999 en Europa. Actualmente, unas 500.000 t de productos alimenticios contienen *L. albus* o *L. angustifolius* como ingrediente para reemplazar en alimentos la harina o pasta de soya. Francia, Alemania, Gran Bretaña, Bélgica, Holanda, Dinamarca, Suecia, Portugal e Italia, así como los países de Chile y Perú los han incluido como un sustituto de soya (Sipsa, 2003).

A finales de la década de 1990, la Compañía Europea Frank, primera en procesar soya para la industria alimentaria, inició investigaciones para encontrar alternativas a la soya, debido a la reducción de márgenes de ganancia y a la incorporación de Organismos Genéticamente Modificados. Desde entonces, el uso de *Lupinus* en alimentos se ha incrementado rápidamente (Dijkink *et al.*, 2008).

#### 4.4.4 Usos

El uso de especies de *Lupinus* en la industria es múltiple. Se utilizan en la industria alimentaria, farmacología, alimentación animal, control biológico y cosmetología. En cosmetología por sus propiedades emolientes (Cuadro 7).

En la industria farmacológica se ha observado su utilidad para la reducción del síndrome metabólico, índice glucémico e hipertensión, entre otros (Cuadro 8). En la industria alimentaria las especies mejoradas de *Lupinus* se utilizan para la producción de productos lácteos, panificación, pastas, confitería, cárnicos y germinados (Cuadro 9).

**Cuadro 7. Uso cosmetológico de semillas de lupino.**

<b>Especie</b>	<b>Uso</b>	<b>Referencia</b>
<i>Lupinus</i> spp.	Propiedades emolientes para la industria cosmética por su perfil de ácidos grasos.	Blade <i>et al.</i> (2003)
<i>L. angustifolius</i>	Lupeol, un alcohol triterpénico que mejora la reconstitución del tejido epidérmico e induce diferenciación e inhibición del crecimiento celular de células de melanoma.	Nikiema <i>et al.</i> (2001); Hata <i>et al.</i> (2003); Hamama y Bhardwaj (2004); Msika <i>et al.</i> (2006); Saleem <i>et al.</i> (2004)
	Alfa-lupaline y Collageneer (Laboratorios Expanscience en <a href="http://www.expanscience.fr">www.expanscience.fr</a> ) para eliminación de radicales libres y actividad antioxidante, así como actividad anti-elastasa.	Msika <i>et al.</i> (2000); Msika <i>et al.</i> (2006)
	Extractos peptídicos de lupino han demostrado que tienen actividad inhibidora de metaloproteasa, en particular, la colagenasa y la gelatinasa.	Msika <i>et al.</i> (2006); Watson (2008)

En agronomía, como agente de control biológico (Cuadro 10). Como aditivo en la preparación de alimentos (Cuadro 11). Y finalmente, en la alimentación animal, como suplemento o prebiótico (Cuadro 12).

#### 4.4.1 Compuestos nutricionales

Las semillas de *Lupinus* muestran elevadas concentraciones de proteínas (30-40%) (Khattab *et al.*, 2009), mayor a otras leguminosas: chícharo (*Pisum sativum*) (21.6%), haba (*Vicia faba*) (25%), frijol (*P. limensis* Macf) (19.1%), y semejante al de soya (*Glycine max*) (36.8%) (Lampart-Sczapa, 2001).

**Cuadro 8. Usos farmacológicos de las semillas de lupino**

Especie	Uso	Referencia
<i>L. albus</i>	Proteínas extraídas a pH neutro como agentes reductores de colesterol e inhibición de la actividad enzimática para la conversión de angiotensina I (ACE, dipeptidylcarboxypeptidase), enzima relacionada con las alteraciones en la presión sanguínea.	Yoshie-Stark y Wäsche (2004); Yoshie-Stark <i>et al.</i> (2006); Pilvi <i>et al.</i> (2006)
	Síndrome metabólico al influir en la saciedad (supresión del apetito) y balance de energía.	Arnoldi (2005); Archer <i>et al.</i> (2004); Lee <i>et al.</i> (2006)
	Reducen el índice glicémico.	Magni <i>et al.</i> (2004); Hall <i>et al.</i> (2005b)
	Mejora el nivel de lípidos sanguíneos.	Martins <i>et al.</i> (2005); Hall <i>et al.</i> (2005a); Nowicka <i>et al.</i> (2006); Spielmann <i>et al.</i> (2007)
<i>L. albus</i> y <i>L. angustifolius</i>	Mejoran la salud intestinal.	Johnson <i>et al.</i> (2006); Smith <i>et al.</i> (2006)
<i>L. angustifolius</i>	Fuente de carotenoides: beta caroteno, luteína y zeaxantina, de tocoferoles y otros componentes bioactivos.	Ghezlou (2000); Lampart-Szczapa <i>et al.</i> (2003); Duranti <i>et al.</i> (2008)
<i>Lupinus</i> spp.	Esparteína: tratamiento de las arritmias cardíacas y para inducir contracciones uterinas y deprime el sistema nervioso central y de tener actividades hipotensor, diurético y antiinflamatorio.	Szczawinska <i>et al.</i> (1994); Schmeller y Wink (1998)
<i>L. mexicanus</i> y <i>L. montanus</i>	Anticonvulsivo, antipiréticas e hipoglucémico: Lupanina, 13-hidroxlupanina y multiflorina.	Hatzold <i>et al.</i> (1983); Kubo <i>et al.</i> (2006); García-López <i>et al.</i> (2004).

Presentan de 4-15% de lípidos que incluye 50-60% de ácido oleico, 16-23% ácido linoleico (Boschin *et al.*, 2008). Además son una fuente potencial de fibra para la producción de alimentos dietéticos (Sujak *et al.*, 2006), tiene niveles bajos de almidón,

inhibidores de tripsina y otros compuestos con efecto anti-nutricional (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2006).

**Cuadro 9. Usos en alimentación humana de la semilla de lupino.**

<b>Especie</b>	<b>Uso</b>	<b>Referencia</b>
<i>L. campestris</i>	Leche análoga y yogurt.	Jiménez-Martínez <i>et al.</i> (2003)
<i>L. angustifolius</i>	Helado exclusivamente a partir de proteínas. La proteína de altramuz que está presente en el helado es fácil de procesar y tiene excelentes propiedades sensoriales.	Eisner <i>et al.</i> (2008)
	Crema helada de Lupino por Eiscremewerke Demin se encuentra disponible en las tiendas alemanas desde 2006.	Fraunhofer Magazine (2006)
<i>L. mutabilis</i>	1 al 2% de aislado proteico incrementa volumen y vida de anaquel en pan blanco y dulce.	Güemes-Vera <i>et al.</i> (2008)
<i>L. albus</i> y <i>L. angustifolius</i>	Pan alto en fibra similar al de Kellogs All-Bran. La fibra de la testa de lupino puede cumplir con este "nicho" de mercado para consumidores celíacos.	Tucek (2006); Sipsa (2003)
	Aumento en la capacidad de retención de agua y el color de la textura, el sabor y el color amarillo de la harina de lupino-trigo (15%:75%, v/v) es atractivo para muchos consumidores.	Lucisano y Pompeya (1981); Petterson y Crosbie (1990)
	Mayonesa de semilla de <i>Lupinus</i> hecha por Sacksmania empresa portuguesa.	www.tradekey.com (Sipsa, 2003)
<i>L. albus</i>	Espagueti fortificado con 5% de aislados proteicos de lupino.	Doxastakis <i>et al.</i> (2007)
	Estabilizar partículas grasas en sistemas cárnicos y adicionalmente tienen la habilidad para formar geles (jamón, salchichas).	Drakos <i>et al.</i> (2007)
<i>L. mutabilis</i>	Botana preparada con mezclas de proteínas de cereales (trigo) y leguminosas.	Jiménez-Martínez y Dávila-Ortíz (2006)
<i>L. angustifolius</i>	Germinados crujientes de lupino tienen una calificación de alta aceptabilidad en comparación con brotes de soya.	Yu (1988)
<i>L. albus</i>	Preparar la bebida alcohólica local "katikala 'o' gibto Areke' en la parte norte-occidental de Etiopía.	Ambaye <i>et al.</i> (2002); Tizazu y Emire (2010)

Las propiedades químicas y tecno-funcionalidad de las proteínas en las leguminosas es determinada por la presencia de globulinas y albuminas (Varasundharosoth y

Varnes, 1985; Lampart-Sczapa, 2001; Duranti *et al.*, 2008).

En el Cuadro 13 se presenta la distribución porcentual de las fracciones proteicas de la semilla de diferentes leguminosas. Las albuminas son un grupo heterogéneo en las especies vegetales. Presentan de diez a 20 fracciones con diferentes pesos moleculares, forman complejos con carbohidratos y ácidos nucleicos; son más ricas que las globulinas en aminoácidos azufrados especialmente metionina (Lampart-Sczapa, 2001).

#### 4.5 Limitación de uso en alimentación

El uso de *Lupinus* en la alimentación exige una reducción del contenido de ingredientes anti-nutricionales, tales como alcaloides, oligosacáridos y taninos (Ballester *et al.*, 1988; Jimenez *et al.*, 2001).

**Cuadro 10. El uso de los alcaloides de lupino en el control biológico.**

<b>Especie</b>	<b>Uso</b>	<b>Referencia</b>
<i>L. albus</i> y <i>L. angustifolius</i>	Gramina y esparteína, en concentración de 40 mM sobre los hongos <i>Phytium aphanidermatum</i> y <i>Botrytis cinerea</i>	Wink (1994); De la Cuadra (1994)
<i>L. exaltatus</i>	Actividad fúngica de los extractos sobre <i>Sclerotium rolfsii</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> ; 92% con 2,500 ppm y 84% con 20,000 ppm. Lupanina sobre <i>Fusarium avenaceum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	Muzquiz <i>et al.</i> (1994); Bernal <i>et al.</i> (2005); Zamora-Natera <i>et al.</i> (2005); Zamora-Natera <i>et al.</i> (2008)
<i>L. albus</i> y <i>L. luteus</i>	Actividad bactericida de lupanina y lupinina, y extractos crudos sobre <i>Erwinia carotovora</i> var. <i>carotovora</i> Jones, <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> (Burkholder) Young, Dye y Wilkie; <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> Okabe y <i>Pseudomonas putida</i> (Trevisan) Migula.	De la Vega <i>et al.</i> (1996)
<i>L. montanus</i> y <i>L. aschenbornii</i> <i>L. stipulatus</i>	Actividad insecticida sobre larvas del gusano cogollero del maíz, <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith). efectos de disuasión en el ácaro de tierra de patas rojas <i>Halotydeus destructor</i>	Wang <i>et al.</i> (2000) Bermudez-Torres <i>et al.</i> (2009);
<i>L. angustifolius</i>	Actividad antimicrobiana en cepas de <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Edermoglu <i>et al.</i> (2007)

**Cuadro 11. Uso de las semillas de lupino como aditivo.**

<b>Especie</b>	<b>Uso</b>	<b>Referencia</b>
<i>Lupinus</i> spp.	Hidrocoloide de la fibra de lupino como sustitutos de la grasa en una amplia gama de productos alimenticios, imitando la textura cremosa y sensación en la boca sin añadir calorías al producto; y disminuye la velocidad de cristalización del hielo, en los postres. Como portadores de sabores a baja concentración en alimentos concentrados	George Weston Foods (2005) www.danisco.com
<i>Lupinus</i> spp.	Harina de semillas de <i>Lupinus</i> se utiliza cada vez más en alimentos a base de cereales.	Clark y Johnson (2003); Güemes-Vera <i>et al.</i> (2008)

**Cuadro 12. Uso de semillas de lupino en la alimentación animal.**

<b>Especie</b>	<b>Uso</b>	<b>Referencia</b>
<i>L. angustifolius</i>	Suplemento alimenticio en tiempos de escasez de pastos para ovejas, cerdos y aves de corral ricos en energía disponible, calidad constante y bajo contenido de factores anti-nutricionales.	Petterson (2000)
<i>L. exaltatus</i>	Los oligosacáridos, estimulan significativamente el desarrollo de bifidobacterias, y podrían ser utilizados como prebióticos para reducir la incidencia a la infección de <i>Salmonella</i> en animales.	Ruiz <i>et al.</i> (2007)
<i>Lupinus</i> spp.	ingrediente alimenticio en las dietas de peces comerciales como el salmón del Atlántico y trucha arcoíris, y para peces de aguas templadas y cálidas, como lubina europea ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ).	Burel <i>et al.</i> (2000); Gouveia y Davies (2000); Farhangi y Carter (2001); Glencross y Hawkins (2004).
<i>L. angustifolius</i>	La industria acuícola utiliza semillas de lupino y la harina de almendra como alimento para reemplazar la harina de pescado de alta proteína en dietas de Salmónidos y camarones. Hasta 40% de cotiledones de lupino puede ser incluido en la harina de pescado para la trucha arco iris sin palatabilidad y problemas de crecimiento.	Glencross (2008)

Algunos que se han encontrado en la semilla de lupinos en cantidades mínimas son inhibidores de la tripsina, saponinas, hemoaglutininas, vicinas, convicinas y taninos (Tapia, 1982).

**Cuadro 13. Distribución porcentual de fracciones proteicas en leguminosas**

<b>Leguminosa</b>	<b>Albuminas</b>	<b>Globulinas</b>
Chícharo ( <i>Pisum sativum</i> )	21.3	56.7
Haba ( <i>Vicia faba</i> )	20.0	60.0
Soya ( <i>Glycine max</i> )	10.0	90.0
<i>Lupinus albus</i>	12.8	79.2
<i>Lupinus luteus</i>	20.8	10.8
<i>Lupinus angustifolius</i>	13.8	21.4

Fuente: Varasundharosoth y Varnes (1985); Lampart-Szczapa (2001); Duranti *et al.* (2008).

Nota: Valores de acuerdo al porcentaje total de proteína.

#### 4.5.1 Alcaloides

Los alcaloides son compuestos nitrogenados no proteicos, de variada complejidad, producidas por las plantas principalmente como mecanismo de defensa para protegerse de los herbívoros (Wink, 1988; Kim *et al.*, 2007). Confieren el sabor amargo a la semilla, según la cantidad presente (Hill, 1986; von Baer *et al.*, 1997). Su concentración depende de la especie, suelo, región y temporada de colecta (Erdemoglu *et al.*, 2007; Zamora-Natera *et al.*, 2008; Bellaloui *et al.*, 2009). Constituyen un grupo importante de compuestos naturales en la familia Fabaceae, especialmente en los géneros: *Lupinus*, *Baptista*, *Thermopsis*, *Genista*, *Cytisus*, *Chamaecytisus*, *Laburnum* y *Calia* (Wink, 2003). Dentro de las leguminosas de grano, el género *Lupinus* contiene alcaloides en cantidades considerables (Wink *et al.*, 1995), mientras que las habas y los chícharos no los presentan (Huisman y Tolman, 2001). Estos metabolitos han limitado la incorporación de lupino en la alimentación humana y animal (FAO/WHO, 1985; Kakade *et al.*, 1974).

Los alcaloides quinolizidínicos (AQ) son compuestos naturales del género *Lupinus*, son comúnmente bicíclicos (lupinina), tricíclicos (angustifoline) o tetracíclicos (esparteína, lupanina) derivados de quinolizidina. Una importante excepción es el alcaloide indol gramina, que se encuentra en algunos cultivares de *L. luteus* (Wink *et al.*, 1995). Se caracterizan por presentar un núcleo base quinolizidínico (Figura 3).

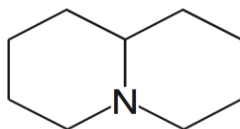


Figura 3. Estructura característica del anillo heterocíclico de quinolizidina (Evans y Murphy, 2011).

Estos compuestos se sintetizan en los cloroplastos y son transportados vía floema a otros órganos de la planta para su almacenamiento en tejido epidérmico y subepidérmico de hojas, tallos y principalmente semillas (Wink y Witte, 1984) y se encuentran en mayor proporción en frutos y semillas maduras. En la planta pueden ser importantes para el metabolismo primario o el desarrollo como regulador u hormona de crecimiento, transportadores de N, o reserva de N, ya que se pueden transformar en aminoácidos. En ensayos realizados con purificados de esparteína y lupanina, se ha concluido que la esparteína inhibe la multiplicación del virus X de la papa (Potexvirus) (Wink, 1987), el crecimiento de bacterias Gram (+) y Gram (-) y algunos hongos fitopatógenos, así también lupanina inhibe la formación de esporas (Wink y Witte, 1984).

La esparteína junto a la lupanina, son considerados como los alcaloides más tóxicos presentes en las semillas de lupino (Jurado, 1989) para los vertebrados por ser antagonistas de los receptores de acetilcolina, inhibidores de los canales de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, lo que bloquea la señal de transducción neuronal, probablemente también alteran la síntesis de proteínas (Wink, 1991).

Los principales efectos tóxicos producidos por el consumo de éstos metabolitos son los trastornos del sistema nervioso central, los procesos digestivos, la reproducción y el sistema inmune (Lallès y Jansman, 1998). El gusto desagradable es mediado en parte a través de efectos neurológicos (Cheeke y Kelly, 1989). Wink *et al.* (1995) determinaron la composición de alcaloides en diferentes especies de lupino (Cuadro 14).



**Cuadro 14. Principales alcaloides en especies de *Lupinus* (mg g<sup>-1</sup> de alcaloides totales).**

Alcaloide Quinolizidínico	<i>L. albus</i>	<i>L. angustifolius</i>	<i>L. luteus</i>
Lupanina	700	70	600
Albina	150	-	-
13-hidroxilupanina	80	120	-
Angustifolina	-	100	-
Esparteína	-	-	300

El contenido promedio de alcaloides en cultivares mejorados (lupinos dulces) es inferior a 0.28 g kg<sup>-1</sup> de *L. angustifolius* y *L. albus* (Van Barneveld, 1999; Jezierny, 2009) y por debajo de 0.26 g kg<sup>-1</sup> MS de *L. luteus* (Roth-Maier y Paulicks, 2004; Jezierny, 2009). El contenido total de AQ en semillas de las especies de lupinos se encuentra en rangos de 1.5 a 4.0% (Hatzold *et al.*, 1983; Ruiz y Sotelo, 2001). La especie *L. albus*, según el porcentaje de alcaloides en la semilla, se clasifica en 4 tipos: dulce hasta 0.05%, semi-dulce 0.051% a 0.15%, semi-amargo 0.151 a 0.30% y amargo más de 0.30% (von Baer *et al.*, 1992).

Debido a la solubilidad en agua de estos compuestos y a su localización en la semilla, es posible su eliminación a través de tratamientos rápidos o tradicionales como el tratamiento hidrotérmico-alcalino de las semillas (Jiménez-Martínez *et al.*, 2001).

#### 4.5.2 Oligosacáridos

Los oligosacáridos pertenecientes a la familia de la rafinosa, también llamados  $\alpha$ -galactosidos, contienen de una a tres unidades de galactosa unidas a la sacarosa por el enlace  $\alpha$ -1,6. Este no es hidrolizado en el tracto gastrointestinal, debido a la ausencia de la enzima  $\alpha$ -galactosidasa. Estos azúcares son fermentados por la microflora del colón y causan la producción de gases (H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y pequeñas cantidades de CH<sub>4</sub>), dolores abdominales y diarrea; sin embargo en estudios recientes se ha demostrado que el consumo de estos compuestos reduce el riesgo de padecer cáncer de colon (Aguilera *et al.*, 2009). Los  $\alpha$ -galactosidos son estables al calor y no son removidos. Aguilera *et al.* (2009) reportaron que a través de la cocción y

deshidratación se reducen los niveles de oligosacáridos.

#### 4.5.3 Taninos

De la palabra inglesa “tanning” (curtido), el término tanino fue originalmente usado para describir la sustancia de los extractos vegetales que curtía cueros de animales. Se definen como compuestos naturales polifenólicos, hidrosolubles, con alto peso molecular, que forman complejos con proteínas, carbohidratos y otros polímeros del alimento. Son capaces de precipitar alcaloides, gelatinas y otras proteínas en soluciones acuosas (Huisman y Tolman, 1992).

Por su estructura y reactividad hacia los agentes hidrolíticos se clasifican en dos grupos: taninos hidrolizables y taninos condensados. Los primeros son fácilmente hidrolizables por ácidos o por enzimas. Los taninos condensados (proantocianidinas) son polímeros flavonoides, no son susceptibles a hidrólisis pero pueden ser degradados oxidativamente en ácidos fuertes para producir antocianidinas. Existen reportes sobre su degradación en los procesos de fermentación anaeróbica (Butler y Bos 1993; Kumar y D’Mello, 1995).

Los taninos tienen efectos nutricionales dañinos, resultando en deterioro de la conversión de nutrientes en animales monogástricos, y en parte por la disminución de la palatabilidad debido a sus propiedades astringentes, que son causadas por la formación de complejos entre taninos y glucoproteínas salivares. Pueden inhibir la acción de las enzimas digestivas. Reducen la digestibilidad aparente de los compuestos proteicos o nutrientes nitrogenados (nitrógeno  $\times$  6.25), aminoácidos y, en menor medida, de la energía (Reddy *et al.*, 1985; Van der Poel *et al.*, 1992; Grosjean *et al.*, 1998). Aunado a esto, limitan la biodisponibilidad de minerales como el hierro y zinc. Los taninos hidrolizables podrían causar efectos tóxicos a nivel sistémico. Particularmente importantes son sus efectos en el hígado (Butler y Bos, 1993). Jimenez-Martínez *et al.* (2001) reportaron un contenido de taninos de 0.31% en semillas silvestres de *L. campestris*, mientras que para la alimentación el límite aceptable es de 0.1% (Price *et al.*, 1980). La cantidad y estructura de los taninos

presentes en un alimento determinan sus efectos nutricionales.

#### 4.6 Métodos utilizados para disminuir factores antinutricionales en el género *Lupinus*

La aplicación de procesos convencionales como la cocción, germinación, fermentación y remojo en semillas, reducen los factores anti-nutricionales e incrementan su potencial como alimento humano y nutritivo. El mejoramiento genético es una herramienta ampliamente utilizada para la reducción de FAN's pero es costosa y de largo plazo.

De acuerdo con estudios de Ruiz y Sotelo (2001), la reducción de alcaloides en *L. elegans* con la extracción de agua hirviendo aumentó el contenido de proteína (45 g 100 g<sup>-1</sup> de muestra), sobre todo porque el agua extrajo los carbohidratos solubles y la concentración de alcaloides disminuyó un 95%.

Inclusive el uso integrado de diversos tratamientos físicos ha sido eficaz en la disminución de factores no deseados y en la estabilidad de las propiedades nutritivas de las semillas de *Lupinus*. En semillas de *L. mutabilis* destoxificadas con calor por 5 min y remojo con agua corriente por 15 h disminuyeron los compuestos no nutricionales y tóxicos respecto al de las semillas control, manteniendo los factores nutritivos (Güemes-Vera *et al.*, 2008). Al igual Aguilera *et al.* (2009) mostraron que a través de lavado, cocción y deshidratación se reducen los niveles de oligosacáridos en las semillas de *Lupinus*.

Para reducir alcaloides, en Ecuador, Bolivia y Perú las semillas de *L. mutabilis* se preparan para consumo humano siguiendo tratamiento alcalino (Gross, 1982; Hinojosa y Torrico, 1990). En Chile se utilizan variedades dulces de *L. albus* (España *et al.*, 1992). La utilización de tratamiento hidrotérmico de las semillas permite la eliminación de los alcaloides debido a su desnaturalización a temperaturas por encima de los 50 °C. Otro método empleado es la cocción en medio alcalino, tratamiento químico reportado como efectivo en semillas de algunas especies de *Lupinus*. La hidratación y calentamiento a temperatura de ebullición durante 6 h en agua y en una solución de bicarbonato sódico 0.5% reduce el contenido de alcaloides

en semillas de *L. campestris* (especie silvestre) de 27 a 0.3 g kg<sup>-1</sup> y 0.02 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Además, debido a estos tratamientos el contenido de mono, di y oligosacáridos, incluidos los  $\alpha$ -galactósidos, estaquiosa, rafinosa y verbascosa se redujo entre 70 (tratamiento en agua) y 90% (tratamiento alcalino) (Jiménez-Martínez *et al.*, 2001). Resultados similares reportaron Torres *et al.* (1980) donde la aplicación de un tratamiento térmico alcalino (utilizando un álcali sin especificar) redujo los AQ 98.6% en semillas de *L. mutabilis*. Otros autores informan que el uso de los medios alcalinos resulta en una reducción de 70  $\pm$  80% en el contenido de AQ (Ortiz y Murkerjel, 1982).

El descascarillado de las semillas de lupino, se utiliza principalmente para incrementar las características y aceptabilidad del producto final, reduce los compuestos anti-nutricionales y los tiempos de cocción (Tharanathan y Mahadevamma, 2003; Sreerama *et al.*, 2009).

La germinación reduce el contenido de factores anti-nutricionales tales como alcaloides, oligosacáridos y fitatos mientras que las isoflavonas y fitoesteroles y algunas vitaminas se incrementan en semillas de lupino (Dagnia *et al.*, 1992; Trugo, 1993; Lee, 1986; Katagiri *et al.*, 2000).

Trugo (1993) y Cunha-Queda y Beirao da Costa (1994) observaron que la germinación controlada redujo el contenido de AQ en las semillas de *Lupinus*. Esta degradación es debida a la movilización del nitrógeno alcaloide. Aunque estudios previos sugieren que los AQ pueden formar ésteres durante la germinación, lo que resulta en la producción de compuestos potencialmente tóxicos para los animales (Wink y Twardowski, 1992). Durante la germinación de semillas amargas de *L. angustifolius*, *L. albus* y *L. campestris* los alcaloides disminuyeron en *L. angustifolius* (29%) y en *L. albus* (3%) con la germinación a los 3 días, mientras que *L. campestris* mostró un aumento (36%) (Cortes *et al.*, 2005). Además sugieren una germinación de 3 días máximo, para evitar la formación de los ésteres de AQ. El contenido de oligosacáridos de los lupinos también se puede reducir debido a la germinación. De la Cuadra *et al.* (1994) encontraron una reducción del 100% de alfa-galactósidos (rafinosa, estaquiosa y

verbascosa) en las semillas de *L. albus* y *L. luteus* después de 48 h de germinación, mientras que el contenido de sacarosa se incrementó.

La fermentación es un proceso digestivo que modifica la estructura química del alimento, potencializando y haciendo disponible sus características nutritivas, además de disminuir los FAN's. Mediante la preparación de "tempeh" (alimento elaborado a base de semillas de soya fermentadas con cepas de *Rhizopus oligosporus*) con semillas de *L. campestris* y *L. mutabilis*. En la combinación de los procesos de remojo y de cocción, seguidas de 48 h de fermentación de las semillas de estas especies disminuyeron el contenido de AQ's en un 50%; y los oligosacáridos en más del 90% en total. Estos resultados sugieren que la fermentación de *L. mutabilis*, *L. campestris* y soya con *R. oligosporus* es un método eficaz para la disminución de los FAN's y para la obtención de un producto con valor nutricional óptimo (Jimenez-Martínez *et al.*, 2007).

El mejoramiento genético ha permitido la reducción de FAN's. En Europa y el Mediterráneo han sido mejoradas, para reducción de AQ, tres especies del género *Lupinus* de las 12 nativas: el lupino de hoja angosta (*L. angustifolius*), el lupino blanco (*L. albus*) y el lupino amarillo (*L. luteus*). En estas especies además se logró la mejora del rendimiento de grano y su estabilidad (Huyghe, 1997; DAF, 2007).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Material biológico

Vainas maduras y secas de *L. montanus* y *L. exaltatus* se colectaron en la región de los Valles de Libres y de Serdán, Puebla (18°52'23.0'' y 19°54'43.9'' LN y 97°18'49.7'' y 97°56'04.0'' LO) del 24 al 26 de agosto 2012 (Figura 4).

Las vainas fueron colocadas en bolsas de papel estraza, identificadas, y transportadas al Laboratorio de Fisiología vegetal del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, donde se separaron en pericarpio y semilla y secaron a 55°C durante 72 h. En 30 vainas por especie y por triplicado se determinó la calidad de las

semillas: porcentajes de semillas sanas y dañadas, número de semillas por vaina, peso de vaina, peso de semilla, proporción del pericarpio y peso de 100 semillas. Para los ensayos se formaron dos grupos de semillas por especie, uno para las pruebas de germinación y el otro para los tratamientos físicos y químicos.



Figura 4. Localización de los sitios de colecta del material reproductivo de *L. exaltatus* y *L. montanus* en los municipios de Chalchicomula de Sesma y Tlalachichuca en la

Región de los Valles Libres y de Serdán, Puebla, México. ○ Ubicación de sitios de colecta.

## 5.2 Tratamientos físicos

### 5.2.1 Tratamiento hidrotérmico

Por triplicado, a 9 g de semillas de *L. montanus* y *L. exaltatus* se les adicionaron 200 mL de agua destilada (relación semilla:agua de 1:22) y se llevaron a temperatura de ebullición (95°C) durante 2, 3 y 6 h. Cada hora y media se realizaron cambios de líquido y se tomó el pH de la solución con un potenciómetro Conductronic PC 18.

### 5.2.2 Tratamiento de remojo

9 g de semillas de *L. montanus* y *L. exaltatus* fueron pesados por triplicado y colocados en remojo durante 3, 6, 9 y 18 horas en agua destilada a temperatura ambiente (26 °C aproximadamente). La relación semilla:agua fue de 1:22. Se realizaron cambios del líquido cada 3 h y se tomó el pH de la solución.

### 5.2.3 Tratamiento de descascarillado

4 g de semillas de *L. montanus* y *L. exaltatus* fueron pesados por triplicado, escarificados manualmente y puestos en agua destilada durante 15 min para permitir el reblandecimiento de la testa y su fácil separación. En cada muestra se separaron la testa y cotiledón.

## 5.3 Tratamiento químico

### 5.3.1 Tratamiento alcalino

9 g de semillas de *L. montanus* y *L. exaltatus* fueron pesados por triplicado y colocadas a temperatura ambiente (26 °C) durante 3, 6 y 9 horas en una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 0.5 %. Se realizaron cambios de líquido cada 3 h y se tomó el pH de la solución.

Al término de cada tratamiento, las muestras fueron secadas a 55°C por 24 h, pulverizadas en un procesador Moulinex y pesadas. El rendimiento de las harinas fue cuantificado después de cada tiempo de exposición. Las harinas obtenidas e identificadas se almacenaron a 4°C hasta su uso.

## 5.4 Análisis químicos

### 5.4.1 Análisis químico proximal

El contenido de proteína (N x 6.25; método 955.04), lípidos (método 920.39), fibra cruda (método 962.09) y ceniza (método 923.03) fueron determinados de acuerdo con los métodos propuestos por la AOAC (1990) descritos en el Anexo 1.

#### Desgrasado de muestras

Previo a la determinación de los análisis bioquímicos, las harinas fueron desgrasadas según Muzquiz *et al.* (1994). 0.5 g de muestra, previamente secos en estufa de aire forzado a 37 °C, fueron pesados por duplicado y depositados en tubos de nalgene de 45 mL de capacidad con tapa roscada. A cada tubo se le añadieron 10 mL de éter de petróleo y se agitaron en vórtex por 1 min. Inmediatamente después, los tubos con tapa, se incubaron en baño María a 40°C por 30 min. Posteriormente, se centrifugaron a 4500xg ó 6651 rpm a 25°C por 5 min en una centrífuga marca Sigma 3-16k. La fase líquida o el sobrenadante se decantó en un matraz Erlenmeyer de 50 mL (previamente secado a 70 °C por 2 h y pesado en vacío). Se añadieron nuevamente 10 mL de éter de petróleo, se agitaron en vortex y se volvió a centrifugar (repetiendo la operación hasta completar tres lavados con éter de petróleo). Finalmente el residuo que permanece en los tubos se colocó en una campana de extracción por 24 h hasta evaporación completa del éter de petróleo. Las harinas desgrasadas se conservaron a 4 °C hasta antes de su uso.



#### 5.4.2 Determinación de azúcares solubles totales (AST)

Los azúcares solubles totales fueron determinados por el método de antrona (Yem y Willis, 1954), usando glucosa como estándar. Para la extracción se pesaron por triplicado 200 mg de muestra previamente desgrasada y seca, de cada especie y por tratamiento, en tubos de ensaye de 20 mL de capacidad. A cada muestra se agregaron 3 mL de etanol absoluto y se colocaron a baño María a 70 °C por 5 min. Al término el sobrenadante (extracto) fue recuperado en un matraz Erlenmeyer de 50 mL. Este proceso se repitió cuatro veces más. El extracto fue secado en una estufa de aire forzado a 80 °C hasta evaporación total; y entonces resuspendido en 1 mL de agua destilada. El extracto fue congelado a -20 °C hasta su uso.

La solución stock de glucosa fue preparada a una concentración de 2.5 mg mL<sup>-1</sup>, realizando a partir de ella las soluciones estándar para la curva de calibración con diferentes concentraciones de glucosa.

Para la cuantificación de azúcares totales, a 300 µL de cada solución estándar o muestra se le agregaron 300 µL de agua destilada y 3 mL del reactivo antrona (100 mg de antrona en 2.5 mL de etanol y 47.5 mL de ácido sulfúrico). Se mezclaron en vortex y se dejaron enfriar en hielo durante 5 min. Posteriormente los tubos se transfirieron a baño María a 100 °C y se dejaron incubar durante 10 min. Luego los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 625 nm en un espectrómetro (Thermo electron, Genesys 10 UV).

**Cuadro 15. Concentraciones de glucosa para preparar la curva de calibración de glucosa.**

No. de tubo	Estándar (µL)	Agua (µL)	Concentración (µg/mL)
1	0	1000	0
3	20	980	50
5	40	960	100
7	60	940	150
9	80	920	200
11	100	900	250

Para la determinación de la concentración de azúcares se interpolaron los resultados de las absorbancias en la curva de calibración y se multiplicaron por el factor de dilución ( $Y=0.004x$ ,  $r^2 = 0.998$ ).

#### 5.4.3 Determinación de polifenoles totales (PFT)

Para la extracción se pesaron, por duplicado, 250 mg de cada muestra desengrasada y por tratamiento en un tubo Eppendorf de 1.5 mL; se extrajeron por agitación (1 min en vortex) con 1 mL de metanol al 80%. Seguidamente la muestra se colocó en baño María por 15 min a 50 °C. La mezcla fue centrifugada a 10 000 rpm o 10956 xg durante 15 min, recuperando el sobrenadante en otro micro tubo. El residuo fue nuevamente lavado con 500 µL de metanol al 100% y nuevamente agitado y centrifugado. El extracto total recuperado se ajustó a un volumen de 1.5 mL, se almacenó protegiéndose de la luz a -20 °C hasta su uso.

Para la cuantificación, a 200 µL del extracto obtenido se le agregaron 1500 µL de agua destilada. La reacción se llevó a cabo, agregando a las soluciones estándar y muestras 100 µL de reactivo fenol-Folin-Ciocalteau y 200 µL de carbonato de sodio anhidro al 15%. Las muestras y estándares se mezclaron en vortex y se dejaron reposar por 30 min en oscuridad. La absorbancia fue medida a 765 nm en un espectrómetro (Thermo electron, Genesys 10 UV). El ácido gálico fue utilizado como estándar. La reacción se realizó por triplicado.

Se preparó una solución stock de 0.5 mg de ácido gálico mL<sup>-1</sup> para crear la curva de calibración (Cuadro 16) y determinar CFT como equivalentes de ácido gálico (mg g<sup>-1</sup>) con el reactivo de fenol-Folin-Ciocalteau ( $Y=1.068x$ ,  $r^2 = 0.998$ ) (Makkar *et al.*, 1993).

#### 5.4.4 Determinación de fenoles no taninos

Para la preparación del extracto con PVPP (Polyvinylpolypyrrolidona): En un tubo de Eppendorf protegido de la luz se colocaron, por triplicado, 25 mg de PVPP, 250 µL de extracto obtenido como se describe en la determinación de fenoles totales y 250 µL de agua destilada. La mezcla se agitó en vortex y se incubó durante 15 min en

oscuridad a 4 °C. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se agitó nuevamente y se centrifugó a 10 000 rpm o 10956 xg a 25 °C por 10 min. El sobrenadante se decantó y se tomó una alícuota de 37.5 µL, se colocó en un tubo Eppendorf y se le adicionó 250 µL de agua destilada.

**Cuadro 16. Curva de calibrado para polifenoles totales con ácido gálico.**

No.	Concent. Ácido gálico (mg/mL)	Ácido gálico (µL)	Agua destilada (µL)
Blanco	0	0	200
1	0.02	40	160
2	0.04	80	120
3	0.06	120	80
4	0.08	160	40
5	1	200	0

Para la cuantificación, se colocaron por triplicado en un tubo de ensaye 50 µL del extracto de PVPP aforando a 500 µL con agua destilada, enseguida se añadieron 250 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu, se mezcló y se dejó reposar durante 8 min. Luego se agregaron 1.25 mL de carbonato de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) al 5%, se mezcló y se incubó durante 30 min en oscuridad. Se midió la absorbancia a 725 nm en un espectrómetro (Thermo electron, Genesys 10V).

Los estándares fueron preparados a partir de una solución stock de ácido gálico de 0.5 mg ml<sup>-1</sup> (Cuadro 16).

#### 5.4.5 Determinación de taninos condensados (proantocianidinas)

Se utilizó la técnica de Butanol en medio ácido (Porter *et al.*, 1986). Por triplicado, en un tubo de ensayo se mezclaron 250 µL del extracto metanólico obtenido como se describe en la determinación de fenoles totales, 1500 µL de butanol:HCl (95:5, v/v) y 50 µL de reactivo férrico (Sulfato de amonio férrico al 2% en HCL 2N) luego, se cubrió el tubo con una canica, se evaporó en baño María durante 1 h y se dejó enfriar a temperatura ambiente. El blanco se preparó de igual forma y sin calentar (Shangkhom *et al.*, 2011). Se midió la absorbancia a 550 nm por espectrometría

(Espectrómetro Thermo electron, Genesys 10 UV). La concentración de Taninos condensados como leucocianidina equivalente fue calculada de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Taninos condensados} = \frac{(A_{550 \text{ nm}} \times 78.26 \times \text{Factor de dilución})}{\% \text{MS}}$$

En esta fórmula 78.26 es un Factor de corrección establecido. Se asume que el coeficiente de extinción molar (E1%, 1 cm, 550nm) de leucocianidinas es 460.

#### 5.4.6 Determinación de alcaloides totales

Para la extracción, las muestras desgrasadas y secas fueron homogeneizadas, en vortex, con 5 mL de una solución de ácido tricloroacético 0.3 M, centrifugadas a 4500 xg o 6651 rpm durante 15 min y el sobrenadante colectado en un tubo de ensaye con tapa roscada. Este proceso se repitió dos veces más para extraer los alcaloides de la fase sólida. Los sobrenadantes colectados se alcalinizaron con 1 mL de NaOH 10 M, seguido de una agitación suave y dejando reposar la solución 1 min a temperatura ambiente. Los alcaloides se extrajeron del sobrenadante alcalinizado con 5 mL de diclorometano (paso que se repite 4 veces) utilizando un embudo de separación. El extracto combinado de 20 ml de diclorometano se dejó evaporar a sequedad en un tubo de ensaye a 40 °C (Muzquiz *et al.*, 1993). El contenido de alcaloides totales se obtuvo por espectrometría (Sreevidya y Mehrotra, 2003).

Para la cuantificación por espectrometría, los extractos obtenidos, se diluyeron con 5 mL de metanol concentrado para su análisis. De esta solución se tomaron 500 µL (el pH se mantuvo a 2-2.5 con HCl diluido), al que se le agregaron 200 µL del reactivo de Drangendorff (mezcla de 0.8 g de nitrato de bismuto pentahidratado, 40 mL de agua destilada, 10 mL de ácido acético glacial y 8 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua destilada). El precipitado formado se centrifugó a 6000 rpm ó 3944 xg por 5 min. Seguidamente, el sobrenadante se decantó completa y cuidadosamente. Se agregaron

a cada tubo 100  $\mu$ L de reactivo de Dragendorff para comprobar la precipitación total de alcaloides. El precipitado se lavó adicionalmente con 100  $\mu$ L de alcohol etílico. El sobrenadante se desechó y el residuo se trató con 200  $\mu$ L de una solución de disulfito de sodio al 1%; nuevamente se centrifugó y el sobrenadante se descartó. El residuo se disolvió en 200  $\mu$ L de ácido nítrico concentrado, agitando en vortex hasta la dilución completa. Esta solución se diluyó con 800  $\mu$ L de agua destilada obteniendo así un volumen final de 1 mL. Para el desarrollo de color se tomó 1 mL de la solución, y se adicionaron 5 mL de solución de tiourea al 3%. La absorbancia se midió a 435 nm.

El método se basa en la formación del complejo amarillo  $\{\text{Bi}[\text{CS}(\text{NH}_2)_3]\}(\text{NO}_3)_3$  en presencia de un medio ácido con el ácido nítrico y la solución de tiourea al 3% (Sreevidya y Mehrotra, 2003), por ello la curva de calibración fue obtenida a partir de una solución stock de nitrato de bismuto pentahidratado (10 mg de  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en 5 mL de ácido nítrico concentrado y diluido en 100 mL con agua destilada). De esta solución se tomaron alícuotas de 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 9 mL y se llevaron a un volumen de 10 mL con agua destilada. De éstas se tomó 1 mL y se añadieron 5 mL de solución de tiourea al 3%. El valor de la absorbancia de la solución de color amarillo se midió a 435 nm.

#### Cromatografía en capa fina (CCF)

Los AQ se obtuvieron mediante el protocolo desarrollo por Wink *et al.* (1995). 0.5 g de muestra pulverizada en un molino Tekmar A-10, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, y se adicionaron 20 mL de HCl 1N, se dejaron reposar 24 h en oscuridad a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 3000 rpm o 986  $\times$ g por 15 min para recuperar el sobrenadante, el cual se alcalinizó a pH 12 con  $\text{NH}_4\text{OH}$  0.3 M. Por otro lado, se prepararon las columnas con 13 g de isolute y se colocaron en los soportes. La muestra alcalinizada fue colocada en la superficie de la columna hasta que ésta fue absorbida y se eluyó tres veces con 20 mL de diclorometano. La muestra se recuperó en un matraz de bola con la finalidad de rotoevaporarla para recuperar el

solvente. El extracto se recuperó con 1 mL de metanol en viales de 1.5 mL de capacidad, protegidos de la luz, etiquetados y almacenados a 4 °C hasta su uso.

CCF: Las placas de sílica con soporte de aluminio se cortaron a 10 x 10 cm, se marcaron para 11 muestras (estándar y muestras). Se colocaron 10 µL de esparteína y 10 µL de cada extracto de AQ. Una vez cargada la placa, se llevó a 15 mL de la fase móvil (cloroformo, metanol e hidróxido de amonio 85:15:1) dentro de la cámara de CCF. Se dejó correr hasta que el frente llegó a una distancia de 1 cm del extremo superior de la placa (aprox. 45 min). Una vez húmeda la placa se retiró de la cámara con pinzas y se secó en una parrilla a 50 °C (cubierta de papel aluminio para evitar quemar la placa). La placa seca se reveló con el reactivo de Dragendorff (Anexo 2), humedeciendo la cara de la placa que contiene las muestras, expuesto en una caja Petri de 25 cm de diámetro, y tomando la placa con pinzas fue retirada inmediatamente y puesta a secar para evitar que la placa fuera corroída por el reactivo Dragendorff. Se ubicaron los compuestos en la placa conforme al estándar. Para determinar el factor de retención Rf se utilizó la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida desde el origen por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida desde el origen por el frente del eluyente}} = \frac{X}{Y}$$

## 5.5 Tratamiento biológico

### 5.5.1 Germinación de semillas

Por especie, cuatro lotes de 50 semillas previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1% seguido de tres lavados de agua destilada para evitar la proliferación de hongos, fueron escarificadas manualmente. Enseguida fueron puestos a germinar en cajas Petri entre papel filtro estéril, en una cámara bioclimática (Lumistell, ICP-19) con un fotoperiodo de 14 h luz 10 h oscuridad (aproximadamente 40 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y régimen de temperatura de 20 °C/15 °C, durante 3 y 6 días. Al término de cada tiempo, se tomó la longitud de la radícula de las semillas germinadas; se secaron a 55

°C en estufa de aire forzado durante 72 h y se pulverizaron en un mortero. Se conservaron a 4 °C en frascos ámbar para las determinaciones químicas.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1.1 Porcentaje de semillas sanas y dañadas

En el Cuadro 17 se muestra la calidad de las semillas de las dos especies en estudio. El conocimiento de la calidad de las semillas permite planificar la cantidad de muestra requerida para pruebas químicas ó biológicas.

En 100 g de semillas, *L. montanus* presentó el mayor porcentaje de semillas dañadas (daños por insectos y semillas inmaduras) respecto a *L. exaltatus*. Las semillas de *L. exaltatus* presentaron mayor peso individual y peso de 100 semillas (Cuadro 18). Además se observó que las vainas de *L. exaltatus* presentan pericarpios delgados semejantes a las de las especies mejoradas de lupino (Lagunes-Espinoza *et al.*, 1999), en contraste con lo observado en *L. montanus*, cuya alta proporción de pericarpio puede ser indicativo que una gran cantidad de asimilados se están utilizando para el desarrollo de éste tejido en detrimento del crecimiento del grano.

### 6.1.2 Peso seco de las harinas

Los pesos secos de las harinas obtenidos de 9 g de semillas de las especies de *L. exaltatus* y *L. montanus* sin tratamiento (control) y después de la aplicación de los tratamientos hidrotérmicos, remojo y alcalino a diferentes tiempos se muestran en el Cuadro 19. Los pesos fueron registrados para el análisis comparativo de rendimientos en referencia a las especies y tratamientos aplicados, tomando como base el control.

El peso seco de harina de *L. montanus* fue 0.87% mayor que el de *L. exaltatus* sin aplicación de tratamientos (Cuadro 19). Después de aplicados los tratamientos hidrotérmico (6 h), remojo (18 h) y alcalino (9 h), las pérdidas de peso en las harinas

fueron 23.9, 6.07 y 6.18%, respectivamente para *L. exaltatus*. Para *L. montanus* la pérdida fue menor (22.6, 1.97 y 2.31%, respectivamente).

**Cuadro 17. Calidad de semillas en 100 g de muestra por especie.**

Especie	Número total de semillas	Semillas sanas, %	Semillas dañadas, %
<i>L. montanus</i>	9113.7	72.8	27.2
<i>L. exaltatus</i>	8972.8	91.3	8.6

**Cuadro 18. Componentes de la vaina de las especies de *Lupinus* en estudio colectadas.**

Especie	Peso vaina, mg	Peso semilla, mg	Proporción de pericarpio	Núm. de semillas por vaina	Peso de 100 semillas, g
<i>L. exaltatus</i>	0.09±0.007	0.013±0.001	0.29±0.02	5.26±0.60	1.33±0.05
<i>L. montanus</i>	0.12±0.05	0.009±0.001	0.74±0.04	3.60±1.59	0.93±0.07

La mayor disminución en el peso seco de harina (18.4%, 2.04 g) se observó en *L. exaltatus* después de aplicar el tratamiento hidrotérmico (95 °C) de las 3 a las 6 h. Para *L. montanus* la mayor pérdida fue en el transcurso de 0 a 2 h con 13.64% (1.18 g).

El peso de las harinas durante el tratamiento de remojo se mantuvo por encima del 93% en ambas especies de lupino, y *L. montanus* registró la menor pérdida. Un aumento en peso de las harinas se observó después del remojo en medio alcalino (carbonato de sodio al 0.05%) para ambas especies. *Lupinus exaltatus* fue la especie que mostró el mayor aumento (6.2%) a las 9 h. Esto puede deberse a residuos del álcali solidificados al secar las semillas.



**Cuadro 19. Variación en los pesos secos de harinas de semillas de *L. exaltatus* y *L. montanus* después de la aplicación de los tratamientos físicos y químicos.**

Peso seco de las harinas (g PS)				
Tratamiento (h)	<i>L. exaltatus</i>	% pérdida o ganancia	<i>L. montanus</i>	% pérdida o ganancia
Control	8.57± 0.22	0	8.65 ± 0.22	0
Hidrotérmico				
2	8.22 ± 0.07	-4.31	7.47 ± 0.2	-13.6
3	8.11 ± 0.21	-5.40	7.40 ± 0.26	-14.4
6	6.53 ± 0.3	-23.9	6.69 ± 0.26	-22.6
Remojo				
3	8.47 ± 0.12	-1.17	8.70 ± 0.44	0.57
6	8.40 ± 0.25	-1.99	8.56 ± 0.51	-1.05
9	8.42 ± 0.23	-1.76	8.63 ± 0.49	-0.24
18	8.05 ± 0.09	-6.07	8.48 ± 0.25	-1.97
Alcalino				
3	9.00 ± 0.12	5.01	8.88 ± 0.08	2.65
6	9.00 ± 0.10	5.01	8.92 ± 0.59	3.12
9	9.10 ± 0.35	6.18	8.85 ± 0.61	2.31

Los valores de humedad y materia seca para *L. exaltatus* y *L. montanus* fueron entre 6.3-5.8% y 93.6-94.1%, respectivamente (Anexo 5).

## 6.2 Efecto de tratamientos físicos sobre la bioquímica de las semillas de lupino

En este apartado se incluyen los cambios en componentes nutricionales y anti-nutricionales (FAN's) en las semillas de *Lupinus* por efecto de tratamientos hidrotérmicos, remojo y descascarillado.

### 6.2.1 Variación en la composición proximal y FAN's durante el tratamiento térmico

En el Cuadro 20 se muestran los valores medios de cada uno de los compuestos nutritivos de las semillas de *L. exaltatus* y *L. montanus* sin procesar (control) y los cambios de los mismos durante el tratamiento hidrotérmico expresados en porcentaje. Para éste tratamiento se observó efecto de interacción especie\*tiempo de exposición para todas las variables evaluadas a excepción de las cenizas, polifenoles totales y alcaloides totales (Cuadro (a) del anexo 3 y 4).

Las semillas de *L. exaltatus* (43.04%) y *L. montanus* (45.94%) mostraron elevado contenido proteico sin tratamiento, tal como lo mencionan otros autores (Güemes-Vera *et al.*, 2012; Pablo-Pérez, 2013) en las mismas especies silvestres mexicanas, cuyos valores indicados oscilan entre 35.2 y 43.4%, lo que demuestra su potencial como fuente proteica. Las semillas de *Lupinus* son también fuente de minerales, ácidos grasos, fibra y carbohidratos (Cuadro 20). Las semillas de las especies silvestres evaluadas mostraron valores similares a las de especies domesticadas (Sujak *et al.*, 2006.)

Un aumento importante sobre el contenido de proteína y de fibra fue observado después de 6 h de la aplicación del tratamiento hidrotérmico (Figura 5a y 5b). La proteína se incrementó 13.6% en *L. exaltatus* y 3% en *L. montanus*. Los incrementos en proteína fueron observados desde las primeras 2 h de exposición al calor. Este incremento en la proteína por el tratamiento hidrotérmico puede deberse a la pérdida de compuestos tóxicos nitrogenados como los alcaloides, pérdida de carbohidratos solubles y, a la desnaturalización de la proteína la cual en su estado nativo no es fácilmente atacada por las enzimas digestivas (Walker *et al.*, 1982; Ruiz y Sotelo, 2001).

La desnaturalización de la proteína por procesos térmicos, mejora la accesibilidad de los sitios susceptibles de la proteólisis y de ese modo mejora la digestibilidad de las proteínas (Carbonaro *et al.*, 1997). Jood *et al.* (1998) estudiaron la digestibilidad de la proteína de las globulinas de leguminosas y las encontraron resistentes a la proteólisis en su estado nativo, pero como una buena fuente de la nutrición cuando se han desnaturalizado.

En el caso de la fibra, el incremento después 6 h de la aplicación del tratamiento fue de 74% para *L. exaltatus* y 103.1% para *L. montanus*. Cambios semejantes, pero en el contenido de fibra dietética han sido observados en chícharo después de un tratamiento a alta temperatura (132°C por 45 min). El tratamiento de alta temperatura incrementó la fracción soluble de las fibras debido tal vez a una ruptura de los enlaces ligno-celulósicos de la pared celular, lo cual conduce a una disminución de la

fracción insoluble de los polisacáridos no amiláceos, es decir un cambio en la relación fracción insoluble:soluble (Giczewska y Borowska, 2003).

**Cuadro 20. Composición química de las semillas de *Lupinus* durante un tratamiento hidrotérmico a 95 °C.**

Parámetro	<i>L. exaltatus</i>			
	Control	2 h	3 h	6 h
Proteína cruda, %	43.00±0.61	43.30±2.44	44.10±1.72	48.90±0.55
Fibra cruda, %	27.00±3.26	27.00±1.88	35.90±0.33	47.10±0.38
Grasa cruda, %	5.80±0.80	7.80±0.54	7.50±0.17	5.70±0.46
Cenizas, %	4.20±0.12	4.20±0.28	3.60±0.22	3.00±0.30
Azúcares solubles totales, %	0.48±0.02	0.23±0.03	0.15±0.001	0.08±0.01
Carbohidratos <sup>a</sup> , %	19.70±3.96	17.40±3.22	8.70±1.28	0.00±0.00
Ácidos grasos <sup>b</sup> , %	4.6	6.2	6.0	4.5
Energía <sup>c</sup> , Kcal 100g <sup>-1</sup>	306.8	316.3	281.2	229.9
<i>L. montanus</i>				
Proteína cruda, %	45.90±0.83	48.70±1.08	50.20±0.51	47.30±1.80
Fibra cruda, %	26.50±0.82	42.60±0.71	48.70±0.74	53.80±0.20
Grasa cruda, %	10.00±0.84	9.90±0.24	8.30±0.19	8.60±0.12
Cenizas, %	3.80±0.12	3.20±0.28	2.70±0.004	2.30±0.10
Azúcares solubles totales, %	0.19±0.004	0.13±0.01	0.07±0.01	0.03±0.0004
Carbohidratos <sup>a</sup> , %	13.60±1.25	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00± 0.00
Ácidos grasos <sup>b</sup> , %	8.0	7.9	6.6	6.9
Energía <sup>c</sup> , Kcal 100g <sup>-1</sup>	330.7	267.5	236.8	219.3

Cada valor representa la media ± desviación estándar de 3 repeticiones de cada determinación.

<sup>a</sup>Carbohidratos calculados como (100-total de PC, FDN, grasa y cenizas).

<sup>b</sup>Ácidos grasos calculados (0.8 x grasa cruda).

<sup>c</sup>Cálculo de energía metabolizable (Kcal 100 g<sup>-1</sup>) (proteína x 17 + grasa x 37 + carbohidratos x 1)/4.184

Aunque los autores también indican que el incremento en el contenido de fibra, podría deberse a la interacción de la proteína con los compuestos fenólicos, que conduciría a una disminución de la digestibilidad.

Al finalizar el tratamiento, el contenido de cenizas se redujo 29.6% en *L. exaltatus* y 39.5% en *L. montanus* (Figura 5c). En *L. montanus* el descenso se observó desde las 2 h respecto al control.

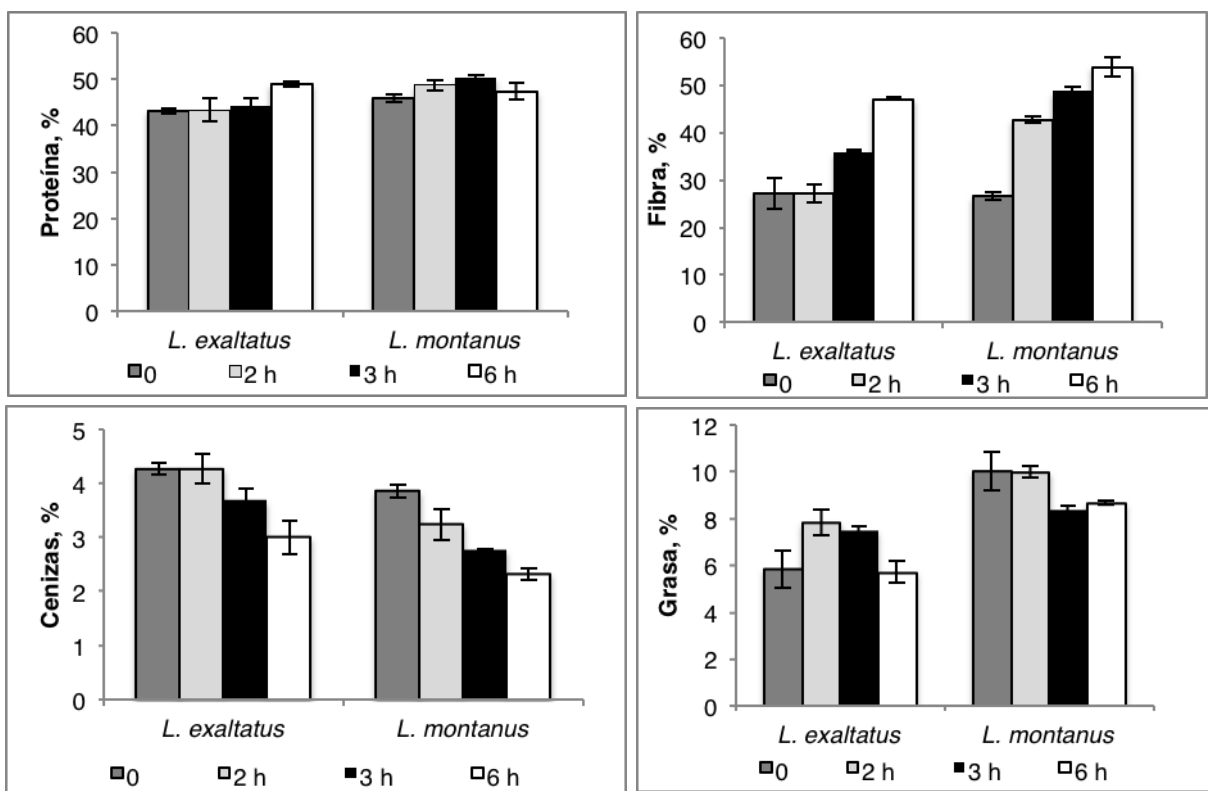


Figura 5. Cambios en la composición de factores nutritivos de semillas de *L. exaltatus* y *L. montanus* durante un tratamiento térmico a 95°C.

El contenido de grasa cruda de las semillas control fue inferior en *L. exaltatus* respecto a *L. montanus*. Valores similares son indicados para *L. montanus* ( $9.97 \pm 0.23$ ) por Guemes-Vera *et al.* (2012). En el caso de *L. exaltatus*, los valores son inferiores a lo determinado por Ruiz-López *et al.* (2006) en la misma especie en el estado de Jalisco, México ( $7.1\% \pm 0.27$ ). La aplicación del tratamiento térmico produjo cambios diferenciales en los contenidos de grasa entre especies (Figura 5d). En *L. exaltatus* se observó un incremento de 34.3% a las 2 h, regresando al valor inicial a las 6 h. En contraste en *L. montanus* se observó una reducción desde las 2 h de tratamiento alcanzando 15.1% al final.

En la harina de la semilla sin procesar, se observó un contenido total de azúcares solubles de  $0.48 \text{ mg g}^{-1}$  para *L. exaltatus* y de  $0.19 \text{ mg g}^{-1}$  en *L. montanus*, los cuales disminuyeron gradualmente conforme se hidrató la harina por efecto del tratamiento

térmico. La disminución fue de 83.3% en *L. exaltatus* y de 84.2% en *L. montanus* después de 6 h de exposición.

Por otro lado, el contenido de carbohidratos calculado fue inferior al cuantificado en semillas de *L. exaltatus* del estado de Jalisco ( $32.1\% \pm 0.4$ ) (Ruiz-López *et al.*, 2006). De igual manera que en este estudio, en soya, el tratamiento térmico disminuyó el contenido de carbohidratos con la aplicación de un tratamiento de cocción en agua (Ramadan, 2012).

El valor energético se refiere a un valor de energía metabolizable, obtenido por cálculo a partir de los componentes productores de energía utilizando los factores de conversión de energía (Cuadro 20). La determinación directa de los valores de energía bruta (es decir, los calores de combustión) es útil para los materiales combustibles, y no para la asimilación de energía en organismos vivos que se da mediante el metabolismo. Los valores obtenidos de energía metabolizable de las semillas de *Lupinus* (control) fueron similares entre especies, pero inferiores a los reportados por la INIAP para *L. mutabilis* ( $584 \text{ Kcal } 100 \text{ g}^{-1}$ ), pero dentro del rango de aporte de energía promedio en las leguminosas que oscila entre 280 y  $400 \text{ Kcal } 100 \text{ g}^{-1}$  (Martínez y Zulet, 2000).

La variación media de los factores anti-nutricionales por efecto de un tratamiento térmico a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 6 h en semillas de *Lupinus* se presenta en el Cuadro 21.

Los alcaloides quinolizidínicos (AQ) son los principales factores anti-nutricionales en las semillas de lupino. En *L. montanus* la esparteína es el principal tipo y en *L. exaltatus* la lupanina. La esparteína presenta alta toxicidad para el aprovechamiento de la semilla en monogástricos (Wink *et al.*, 1995; Ruiz y Sotelo, 2001). Las semillas control de *L. exaltatus* mostraron una alta concentración de alcaloides (Cuadro 21) (2.18%), con valores similares a los reportados por Zamora-Natera *et al.* (2009) en semillas maduras de *L. exaltatus* silvestre del estado de Jalisco (2.1%). Mientras que para las muestras evaluadas de *L. montanus* la concentración de AQ fue mayor a la reportada para esta especie colectada en el estado de Hidalgo (2.6%) (Güemes-Vera *et al.*, 2012). Estas diferencias en concentración pueden atribuirse a factores edáficos

relacionados con el sitio, época de colecta o edad fisiológica (Martínez-Villaluenga *et al* 2006).

Por efecto del tratamiento térmico, el contenido de alcaloides totales descendió de manera importante respecto al control hasta las 6 h de exposición (Cuadro 21). La disminución fue de 82.1% en las semillas de *L. exaltatus* y de 62.7% en las de *L. montanus*.

**Cuadro 21. Factores anti-nutricionales en semillas de dos especies de *Lupinus* durante un tratamiento térmico a 95° C.**

<i>L. exaltatus</i>					
Tiempo (h)	Polifenoles totales, mg 100 g <sup>-1</sup>	Fenoles no taninos, mg g <sup>-1</sup>	Taninos condensados, %	Alcaloides, %	*Taninos totales, mg g <sup>-1</sup>
0	493.8 ± 19.5	0.32 ± 0.001	0.007 ± 0.00006	2.18 ± 0.06	4.61 ± 0.19
2	333.9 ± 9.6	0.23 ± 0.009	0.004 ± 0.0006	2.02 ± 0.06	3.10 ± 0.10
3	278.5 ± 5.0	0.11 ± 0.004	0.003 ± 0.0008	1.54 ± 0.03	2.66 ± 0.04
6	122.5 ± 17.5	0.12 ± 0.008	0.0002 ± 0.0001	0.39 ± 0.02	1.09 ± 0.18
<i>L. montanus</i>					
0	416.7 ± 24.6	0.45 ± 0.002	0.005 ± 0.0	3.33 ± 0.08	3.71 ± 0.25
2	245.0 ± 13.6	0.23 ± 0.002	0.003 ± 0.0001	2.78 ± 0.12	2.22 ± 0.13
3	218.2 ± 53.9	0.19 ± 0.002	0.003 ± 0.0005	2.36 ± 0.12	1.98 ± 0.54
6	83.5 ± 12.1	0.08 ± 0.001	0.002 ± 0.0003	1.24 ± 0.33	0.75 ± 0.12

\*= Calculado por diferencia (polifenoles totales-fenoles no taninos).

La principal disminución de este metabolito se logró de las 3 a 6 h de exposición (74 a 47%), mientras que dentro de las primeras 2 h la disminución fue significativa pero mucho menor en *L. exaltatus* y *L. montanus*, (7.3 y 16.5%, respectivamente) (Figura 6b). Mayor reducción de alcaloides (95%) fue obtenida en semillas de *L. elegans* después de la aplicación de un tratamiento térmico (agua hirviendo) (Ruiz y Sotelo, 2001). Ésta fue también acompañada de reducción de azúcares solubles totales.

Las semillas de estas especies poseen alcaloides que se encuentran de forma natural como sales de alcaloide, que son solubles en solventes polares como el agua. En este caso el tratamiento térmico permite el reblandecimiento de la testa para la hidratación completa de la semilla, ya que la mayor cantidad de AQ se encuentra en

el cotiledón (Cuadro 25). Esto permite dejar el alcaloide de forma libre en el solvente y su desnaturalización por acción de la temperatura (>51 °C) (Remington, 2000).

El contenido inicial de polifenoles totales fue de 493.8 mg ácido gálico equivalente (AGE) 100 g<sup>-1</sup> para *L. exaltatus* y 416.8 mg AGE 100 g<sup>-1</sup> en *L. montanus*.

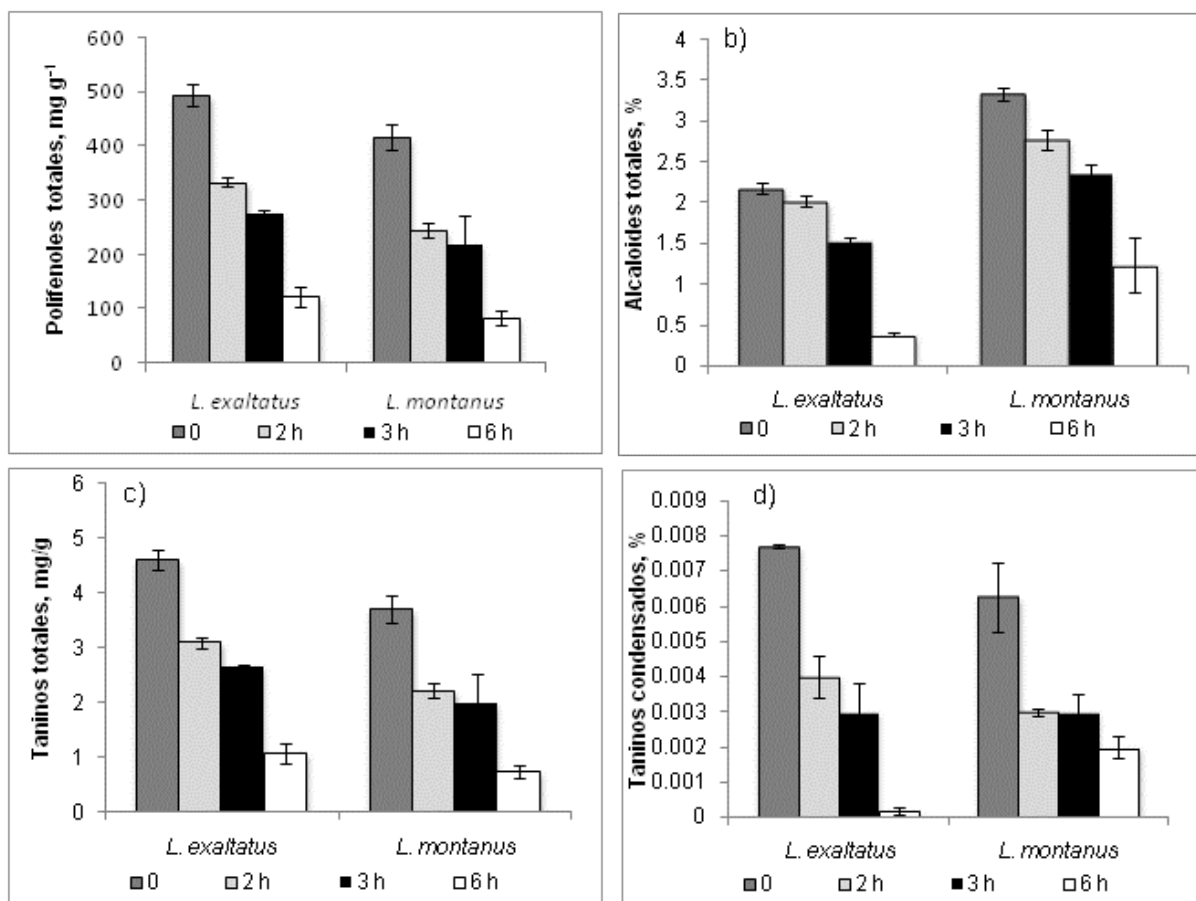


Figura 6. Cambios en la composición de factores anti-nutricionales de semillas de *L. exaltatus* y *L. montanus* durante un tratamiento térmico por 6 h.

Los contenidos observados fueron similares a los mostrados por Siger *et al.* (2012) en *L. albus* (491.5 mg 100 g<sup>-1</sup> AGE) y Wang y Clements (2008) en semillas de 11 especies de lupino (*L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus*, *L. cosentinii*, *L. atlanticus*, *L. digitatus*, *L. hispanicus*, *L. micranthus*, *L. palaestinus*, *L. pilosus* y *L. mutabilis*), quienes reportaron este compuesto en un rango de 444.4-1661.2 mg 100 g<sup>-1</sup> AGE. Tal como se muestra en

la Figura 6a los polifenoles totales disminuyeron significativamente ( $\alpha \leq 0.05$ ) a las 6 h de tratamiento térmico en las semillas de *L. exaltatus* (75.2%) y *L. montanus* (80%).

Respecto a los taninos totales se observó una significativa disminución al finalizar el tratamiento, ya que en parte la mayoría de ellos son solubles en agua y solo el 2% lo representan los taninos condensados (Cuadro 21).

Los fenoles no taninos (flavonoides y ligninas) se encontraron en menor proporción que los taninos totales en las semillas control para las especies en estudio. Estos disminuyeron gradualmente con la aplicación del tratamiento térmico (Cuadro 21). A las 6 h, se observó una reducción en la concentración de taninos totales y condensados de 76.3 y 97.4% en *L. exaltatus* y de 79.8 y 60% en *L. montanus*, respectivamente (Figura 6c y 6d). Esta disminución podría estar relacionada con el hecho de que estos compuestos son termolábiles (Rakic *et al.*, 2007).

El tratamiento térmico hidrata más rápido a las semillas por el rompimiento de enlaces de los polisacáridos estructurales presentes en la testa, esto hace que las propiedades hidrofílicas de los alcaloides, polifenoles y taninos se manifiesten, sin embargo podría ser desfavorable para las vitaminas y minerales.

La Figura 7 nos muestra la variación media de pH en el agua durante el tratamiento térmico, antes de cada cambio del solvente, realizados entre periodos de 1.5 h.

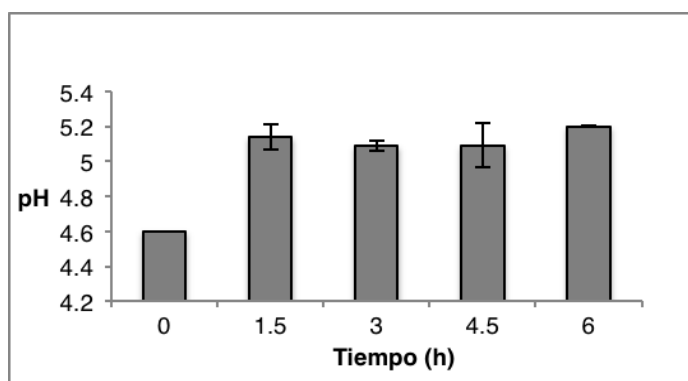


Figura 7. Cambios de pH en el agua durante el tratamiento térmico aplicado a las semillas de *Lupinus*.



Durante el tiempo de exposición de las semillas a la cocción, el pH del agua aumentó significativamente respecto al control en cada periodo. Esto puede relacionarse a la liberación de compuestos alcalinos, principalmente los alcaloides como su propio nombre sugiere por su parecido a los álcalis.

#### 6.2.2 Variación en la composición proximal y FAN's durante el tratamiento de remojo

Las medias de la composición química proximal durante un tratamiento de remojo en agua por 18 h a las semillas de *L. exaltatus* y *L. montanus* se presentan en el Cuadro 22. En general, todos los factores nutricionales (proteína, cenizas, grasa, y fibra) no mostraron variación significativa ( $p \leq 0.05$ ) durante el tratamiento de remojo en las dos especies de lupino evaluadas. Esto difiere del aumento observado en fibra cruda y disminución de la grasa en semillas de soya por efecto de un tratamiento de remojo en agua por 18 h (Ramadan, 2012). En el Cuadro 23 se muestra la variación de los factores anti-nutricionales de las semillas de *Lupinus* por efecto de un tratamiento de remojo por 18 h. Al finalizar el tratamiento *L. montanus* mostró aumento en el porcentaje de alcaloides, polifenoles totales, taninos totales y condensados respecto al control (36.3%, 28.1%, 33.5% y 24.0%, respectivamente) (Figura 8). En *L. exaltatus* solo se observaron diferencias estadísticas significativas respecto al control en el contenido de taninos totales (disminución 33.8%) por efecto del remojo en agua durante 18 h (Figura 8c). En contraste en semillas de *L. mutabilis*, Carvajal-Larenas *et al.* (2013) observaron una disminución en la concentración de alcaloides a valores inferiores de  $0.25 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  de PS mediante el remojo en agua por 3.6 días (42 h), agitación continua durante 22 h por día y 3 cambios de agua al día. Esto indica que con un mayor periodo de remojo combinado con agitación se podría reducir aún más el porcentaje de alcaloides en las especies en estudio.

**Cuadro 22. Efecto de diferentes tiempos de remojo en la composición nutricional en semillas de *Lupinus*.**

Parámetro	<i>L. exaltatus</i>				
	Control	3 h	6 h	9 h	18 h
Proteína cruda, %	43.04 ± 0.61	43.59 ± 1.31	42.99 ± 2.08	43.72 ± 1.10	44.44 ± 0.28
Fibra cruda, %	27.07 ± 3.26	30.13 ± 1.08	28.46 ± 0.75	28.29 ± 0.50	28.24 ± 0.89
Grasa cruda, %	5.83 ± 0.80	4.59 ± 0.52	6.85 ± 2.61	5.26 ± 0.19	4.49 ± 0.62
Cenizas, %	4.26 ± 0.12	4.21 ± 0.34	4.08 ± 0.12	3.98 ± 0.12	3.64 ± 0.47
Azúcares solubles totales, %	0.48 ± 0.02	0.27 ± 0.01	0.38 ± 0.02	0.40 ± 0.01	0.49 ± 0.02
Carbohidratos, %	19.78 ± 3.96	17.46 ± 2.87	17.6 ± 5.04	19.18 ± 0.50	19.18 ± 0.50
Ácidos grasos, %	4.66	3.67	5.48	4.20	3.59
Energía, Kcal 100 g <sup>-1</sup>	306.80	288.60	306.70	302.10	298.20
Parámetro	<i>L. montanus</i>				
	Control	3 h	6 h	9 h	18 h
Proteína cruda, %	45.94 ± 0.83	43.63 ± 0.81	42.25 ± 0.72	41.64 ± 0.16	44.76 ± 0.05
Fibra cruda, %	26.52 ± 0.82	28.78 ± 1.32	26.89 ± 1.26	29.52 ± 0.05	25.64 ± 0.99
Grasa cruda, %	10.02 ± 0.84	7.35 ± 0.32	7.08 ± 0.004	7.72 ± 0.18	9.01 ± 0.01
Cenizas, %	3.85 ± 0.12	4.07 ± 0.01	4.20 ± 0.22	4.96 ± 0.78	4.05 ± 0.01
Azúcares solubles totales, %	0.19 ± 0.004	0.47 ± 0.04	0.47 ± 0.01	0.42 ± 0.03	0.67 ± 0.03
Carbohidratos, %	13.66 ± 1.25	16.15 ± 2.44	19.58 ± 2.20	16.14 ± 1.08	16.53 ± 1.05
Ácidos grasos, %	8.02	5.88	5.66	6.17	7.21
Energía, Kcal 100 g <sup>-1</sup>	330.7	307.9	313.8	303.0	328.7

<sup>a</sup>Cada valor representa la media ± desviación estándar de 3 repeticiones de cada determinación.

<sup>b</sup>Carbohidratos calculados como (100-total de otros componentes).

<sup>c</sup>Ácidos grasos calculados (0.8 x grasa cruda).

<sup>d</sup>Cálculo de energía metabolizable (Kcal 100 g<sup>-1</sup>) (proteína x 17 + grasa x 37 + carbohidrato x 1)/4.184

**Cuadro 23. Factores anti-nutricionales en semillas de *L. exaltatus* y *L. montanus* tratadas con diferentes tiempos de remojo.**

<i>L. exaltatus</i>					
Tiempo (h)	Polifenoles totales, mg 100 g <sup>-1</sup>	fenoles no taninos, mg g <sup>-1</sup>	Taninos condensados, %	Alcaloides, %	*Taninos Totales, mg g <sup>-1</sup>
0	493.8 ± 19.5	0.32 ± 0.001	0.008 ± 0.00006	2.18 ± 0.06	4.61 ± 0.19
3	424.7 ± 22.8	1.47 ± 0.02	0.004 ± 0.0	1.62 ± 0.06	2.78 ± 0.20
6	486.6 ± 3.81	1.7 ± 0.04	0.0066 ± 0.0013	1.95 ± 0.05	3.17 ± 0.002
9	501.9 ± 37.1	1.9 ± 0.04	0.0065 ± 0.0006	2.43 ± 0.07	3.1 ± 0.41
18	477.1 ± 28.6	1.72 ± 0.01	0.0062 ± 0.001	2.43 ± 0.18	3.05 ± 0.27
<i>L. montanus</i>					
0	416.7 ± 24.6	0.45 ± 0.002	0.005 ± 0.0	3.33 ± 0.08	3.7 ± 0.25
3	428.5 ± 5	0.49 ± 0.02	0.0092 ± 0.0014	3.33 ± 0.1	3.8 ± 0.07
6	415.0 ± 37.1	0.44 ± 0.01	0.001 ± 0.0009	4.65 ± 0.1	3.7 ± 0.35
9	476.6 ± 26.2	0.47 ± 0.01	0.011 ± 0.0004	5.17 ± 0.43	4.29 ± 0.27
18	533.81 ± 50	0.39 ± 0.003	0.011 ± 0.0008	4.54 ± 0.3	4.94 ± 0.49

\*= Calculado por diferencia (polifenoles totales-fenoles no taninos).

Sin embargo aún cuando este tipo de tratamiento reduce los FAN's, este proceso todavía no es muy eficiente (FAO, 2013) debido a su alto consumo de agua (63 g de agua por g de semillas) (Caicedo *et al.*, 2001), el tiempo (5-6 días) (Villacrés *et al.*, 2000) y su alta pérdida de sólidos (230-270 g kg<sup>-1</sup> de semilla seca) (Torres *et al.*, 1980; Carvajal-Larenas *et al.*, 2013). Pero también se ha indicado que el uso de sólo agua es ventajoso debido a que evita la eliminación de residuos químicos (Rossetto, 1989), así como indeseables cambios de calidad que se producen en los otros procesos de eliminación del amargor.

### 6.2.3 Variación en la composición proximal y FAN's por un tratamiento de descascarillado

Actualmente se hace empleo del descascarillado de las semillas principalmente para mejorar las características de aceptabilidad y aprovechar la fibra. En Australia se emplea este tratamiento, para la elaboración de pan integral con adición de la testa de lupino y por otra parte, los cotiledones se usan para la producción de pastas.

La testa de las semillas en estudio comprende 29.1% para *L. exaltatus* y 28.4% para *L. montanus* del peso total de la semilla; 100 g de testa de estas especies contienen 66 y 68 g de fibra, respectivamente (Cuadro 24). La testa de lupino tiene pocas proteínas y lípidos y son en su mayoría compuestas por polisacáridos estructurales, celulosa, hemicelulosa y pectina, con aproximadamente 4-6% de proteína (Evans, 1994; DAF, 2007).

Los cotiledones son principalmente utilizados en la elaboración de alimentos y en las semillas de las especies en estudio su porcentaje constituyó más de la mitad del peso total (Cuadro 24).

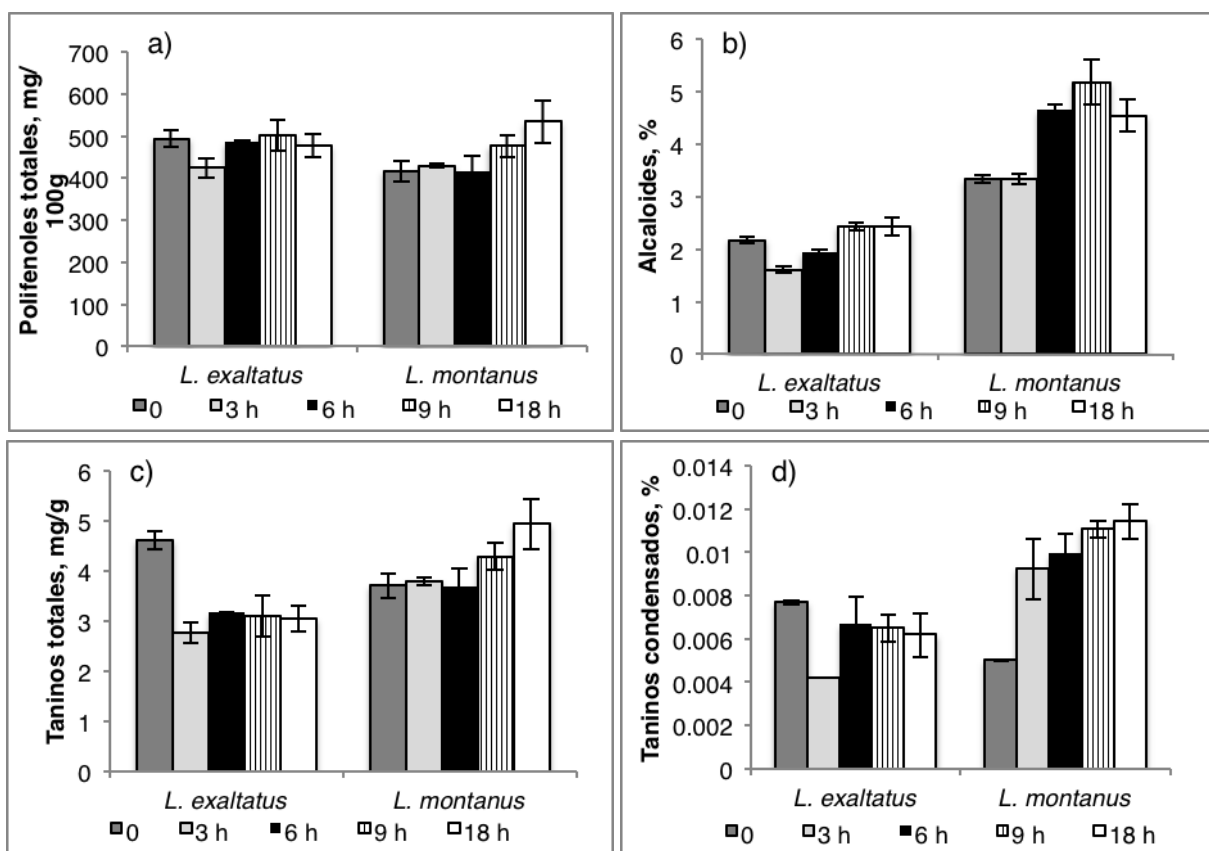


Figura 8. Cambios en la composición de factores anti-nutricionales de semillas de *L. exaltatus* y *L. montanus* después de la exposición a diferentes de remojo.

Para conocer el efecto del descascarillado de la semilla sobre la calidad nutricional, se evaluaron sus componentes por separado. Las concentraciones nutrimentales y de

alcaloides totales en las semillas de *Lupinus* y sus componentes (testa y cotiledones) se presentan en el Cuadro 25.

**Cuadro 24. Proporción de los componentes de las semillas de lupino.**

Especie	Testa, g	Cotiledones, g	Porcentaje de testa	Porcentaje de cotiledones
<i>L. exaltatus</i>	0.555 ±0.02	1.35 ± 0.01	29.1	70.9
<i>L. montanus</i>	0.415 ±0.02	1.46 ± 0	28.4	71.6

**Cuadro 25. Composición nutricional y de alcaloides en semillas de *Lupinus* y sus componentes (testa y cotiledones).**

Parámetro	<i>Lupinus exaltatus</i>		
	Semilla entera	Testa	Cotiledones
Proteína cruda, %	43.04 ± 0.61	6.85 ± 0.49	55.62 ± 0.27
Fibra cruda, %	27.07 ± 3.26	66.37 ± 0.02	12.67 ± 0.5
Grasa cruda, %	5.83 ± 0.8	1.14 ± 0.25	7.44 ± 0.095
Cenizas, %	4.26 ± 0.12	2.23 ± 0.003	4.2 ± 0.2
Carbohidratos <sup>a</sup> , %	19.78 ± 3.96	23.41 ± 0.76	20.07 ± 0.6
Ácidos grasos <sup>b</sup> , %	4.664	0.912	5.952
Energía <sup>c</sup> , Kcal 100g <sup>-1</sup>	306.8	133.0	373.3
Alcaloides, %	2.18 ± 0.06	0.66 ± 0.026	2.8 ± 0.026
Parámetro	<i>Lupinus montanus</i>		
	Semilla entera	Testa	Cotiledones
Proteína cruda, %	45.94 ± 0.83	7.09 ± 0.05	57.56 ± 0.61
Fibra cruda, %	26.52 ± 0.82	68.32 ± 2.44	16.7 ± 0.08
Grasa cruda, %	10.02 ± 0.84	1.31 ± 0.05	10.18 ± 0.15
Cenizas, %	3.85 ± 0.12	2.06 ± 0.06	4.05 ± 0.05
Carbohidratos <sup>a</sup> , %	13.66 ± 1.25	21.21 ± 2.41	11.5 ± 0.33
Ácidos grasos <sup>b</sup> , %	8.016	1.048	8.144
Energía <sup>c</sup> , kcal100 g <sup>-1</sup>	330.8	126.6	370.6
Alcaloides, %	3.33 ± 0.08	0.8 ± 0.04	6.22 ± 0.026

Cada valor representa la media ± desviación estándar de 3 repeticiones de cada determinación.

<sup>a</sup>Carbohidratos calculados como (100-total de otros componentes).

<sup>b</sup>Ácidos grasos calculados (0.8 x grasa cruda).

<sup>c</sup>Cálculo de energía metabolizable (kcal100 g<sup>-1</sup>) (proteína x 17 + grasa x 37 + carbohidrato x 1)/4.184

Las semillas de *L. exaltatus* y *L. montanus* poseen en los cotiledones la mayor cantidad de minerales (cenizas), grasa (7.4 y 10%, respectivamente), proteína (55 y 57%, respectivamente) y alcaloides, mientras que la testa es rica en fibra (66.3 y 68.3%, respectivamente). Sipsa (2003) mostró valores similares de proteína y grasa en

cotiledones de *L. luteus* (52 y 7%, respectivamente) y concentraciones proteicas menores para *L. angustifolius* (41%). De hecho hay reportes sobre el incremento del contenido de proteína en la semilla de *L. luteus* (53 vs 37-41%) y *L. angustifolius* (41 vs 27-38%) descascarillada sobre la semilla entera (Pettersen *et al.*, 1997; Sipsa, 2003; Smith *et al.*, 2006).

Podemos observar en la Figura 9 que los contenidos de proteína y grasas se concentran con la eliminación de la testa beneficiando su valor nutritivo, aunque con esto se eliminó gran parte del contenido de fibra.

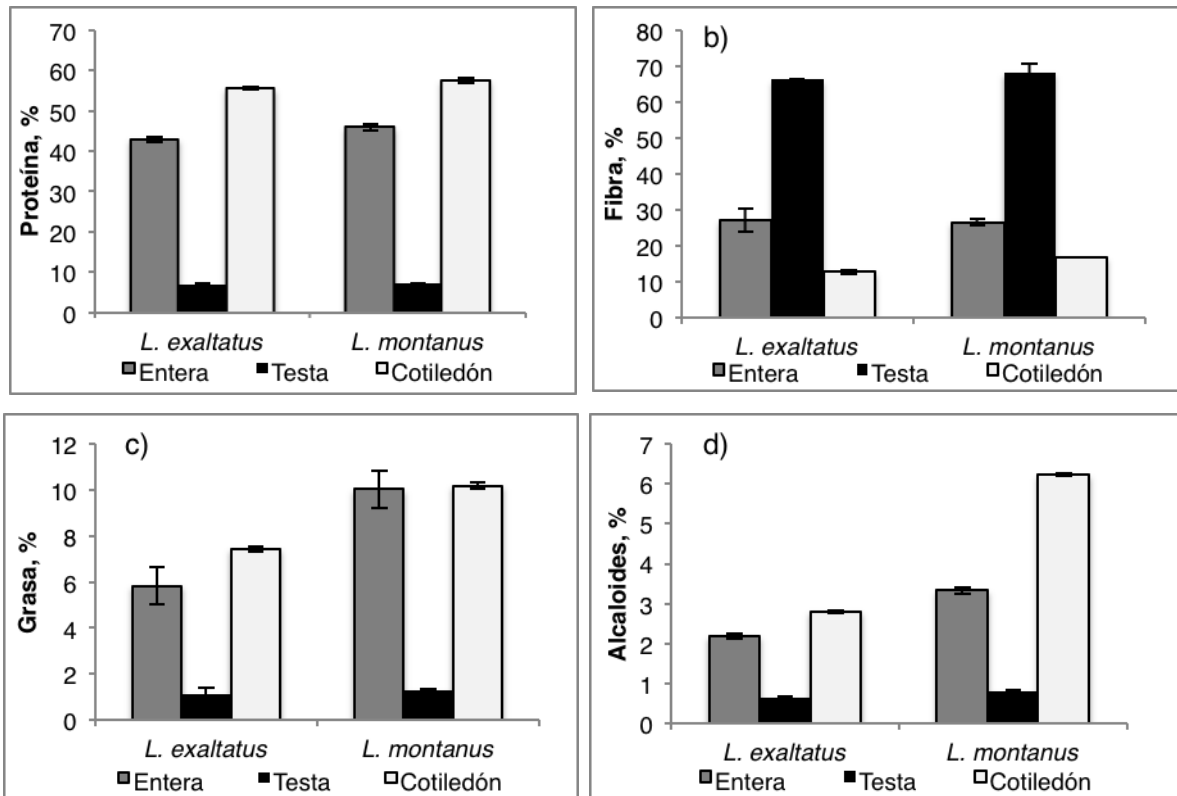


Figura 9. Distribución de nutrientes (a, b, c) y alcaloides totales (d) en las semillas de *L. exaltatus* y *L. montanus*.

Por otro lado, los alcaloides totales se encontraron en mayor proporción en los cotiledones. Esto descarta al descascarillado por si solo, como método para la eliminación de los alcaloides en los lupinos silvestres en estudio, ya que el mayor

contenido de alcaloides se encuentra en los cotiledones y al retirar la testa éste se concentró 28.4% en *L. exaltatus* y 86.8% en *L. montanus*.

No obstante la aplicación de un tratamiento térmico después del descascarillado podría ser una alternativa para la disminución de alcaloides, utilizando los subproductos del proceso: fibras, extracto acuoso con alcaloides y oligosacáridos, ya que este proceso podría hacer a las proteínas menos solubles en medio acuoso y eliminar los anti-nutricionales.

### 6.3 Efecto del tratamiento químico sobre las semillas de lupino

#### 6.3.1 Variación en la composición proximal y FAN's durante el tratamiento alcalino

Las sales de alcaloides por acción de los álcalis precipitan el alcaloide al estado base (Remington, 2000). En base a lo anterior, se aplicó el remojo de las semillas de lupino en medio alcalino y se evaluó su contenido nutricional y anti-nutricional en diferentes tiempos de exposición al tratamiento. Se observó un efecto de interacción para las variables evaluadas con excepción de las grasas, proteínas, polifenoles y alcaloides totales (Cuadro d del Anexo 3).

Las concentraciones de compuestos nutricionales de las semillas de dos especies de lupino durante un tratamiento alcalino se presentan en el Cuadro 26. Con el tratamiento alcalino durante 9 h, las semillas de *L. exaltatus* mostraron disminución en el contenido de proteína, fibra y grasa (13.3, 25 y 33%, respectivamente).

En *L. montanus* se observó un aumento en las cenizas (9.9%) y disminución en proteína y grasa (9.4 y 24.4%). En las dos especies el contenido proteico disminuyó a partir de las 3 h, al igual que la grasa (Figura 10a y 10c). Esta última inicialmente tuvo mayor concentración en *L. exaltatus*, pero al final el mayor porcentaje de reducción fue en las semillas de *L. montanus*. El cambio de pH afecta la carga superficial de las proteínas, esta alteración elimina la interacción electrostática de los enlaces que estabilizan la estructura terciaria, y a menudo produce su precipitación en el medio

(Stryer, 1988). Wanjekeche *et al.* (2003) mostraron también disminución de cenizas, fibra y grasas en semillas de *Mucuna* durante la cocción en medio alcalino.

**Cuadro 26. Composición nutricional de semillas de *L. exaltatus* y *L. montanus* después de un tratamiento alcalino durante diferentes tiempo de exposición.**

<i>L. exaltatus</i>				
Parámetros	Control	3 h	6 h	9 h
Proteína cruda, %	43.04±0.61	36.12±1.23	37.62±0.41	37.29±0.99
Fibra cruda, %	27.07±3.26	22.86±1.13	21.49±3.82	20.29±1.07
Grasa cruda, %	5.83±0.8	4.07±0.76	3.97±0.36	3.91±0.53
Cenizas, %	4.26±0.12	3.93±0.16	3.95±0.09	4.29±0.02
Azúcares solubles totales, %	0.48±0.02	0.5±0.08	0.42 0.03	0.34±0.03
Carbohidratos, %	19.78±3.96	33±0.7	32.94±3.95	34.2±2.62
Ácidos grasos, %	4.664	3.256	3.176	3.128
Energía, kcal 100 g <sup>-1</sup>	306.8	316.8	321.8	325
<i>L. montanus</i>				
Proteína cruda, %	45.94± 0.83	41.57± 0.36	40.34± 1.55	41.63± 0.31
Fibra cruda, %	26.52± 0.82	21.26± 0.39	25.41± 0.22	25.2± 1.95
Grasa cruda, %	10.02± 0.84	7.81± 0.47	7.39± 0.14	7.57± 0.1
Cenizas, %	3.85± 0.12	4.12± 0.03	4.21± 0.08	4.23± 0.24
Azúcares solubles totales, %	0.19± 0.004	0.63± 0.06	0.52± 0.02	0.43± 0.03
Carbohidratos, %	13.66± 1.25	25.22± 0.53	22.64± 0.006	21.34± 2.13
Ácidos grasos, %	8.016	6.248	5.912	6.056
Energía, kcal 100 g <sup>-1</sup>	330.7	340.4	321.2	322.8

<sup>a</sup>Cada valor representa la media ± desviación estándar de 3 repeticiones de cada determinación.

<sup>b</sup>Carbohidratos calculados como (100-total de otros componentes).

<sup>c</sup>Ácidos grasos calculados (0.8 x grasa cruda).

<sup>d</sup>Cálculo de energía metabolizable (kcal100 g<sup>-1</sup>) (proteína x 17 + grasa x 37 + carbohidrato x 1)/4.184

Las cenizas en *L. exaltatus* a partir de las 3 h se reducen 0.33% y a las 9 h aumentan a 4.29%, mientras que en las semillas de *L. montanus* aumentan gradualmente desde las 3 h, alcanzando su mayor concentración a las 9 h (Cuadro 26, Figura 10d). La variación de los FAN's durante un tratamiento alcalino por 9 h se muestra en el Cuadro 27. Los alcaloides totales presentes en las semillas fueron diferentes desde el inicio y se comportaron de manera inversa con el tratamiento.

El contenido de alcaloides se redujo al finalizar el tratamiento solo en *L. exaltatus* (31.6%). Desde las 3 h de exposición se observó el aumento en *L. montanus* y disminución gradual (5.9%) en *L. exaltatus* (Figura 11b).



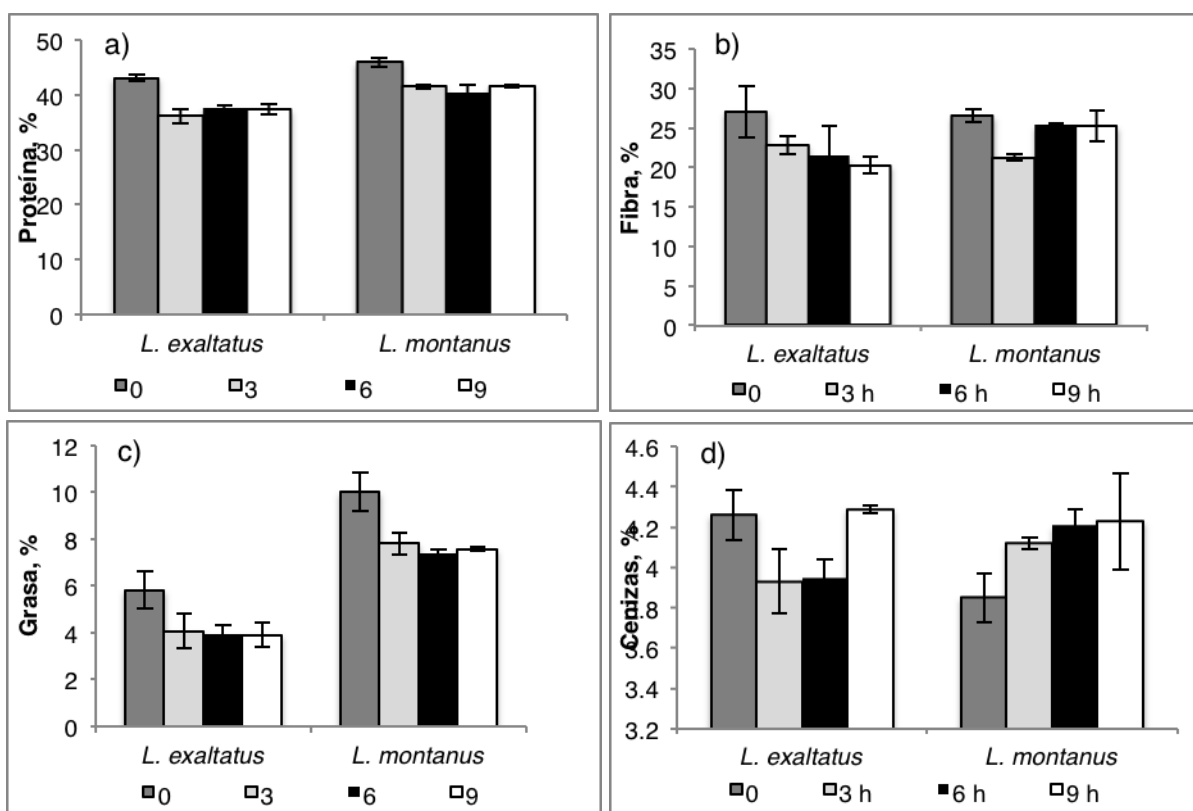


Figura 10. Cambios en la composición de factores nutritivos de semillas de *L. exaltatus* y *L. montanus* durante un tratamiento alcalino.

**Cuadro 27. Factores anti-nutricionales en semillas de *Lupinus* durante un tratamiento alcalino.**

<i>L. exaltatus</i>					
Tiempo (h)	Polifenoles totales, mg 100 g <sup>-1</sup>	Fenoles no taninos, mg g <sup>-1</sup>	Taninos condensados, %	Alcaloides, %	*Taninos Totales, mg g <sup>-1</sup>
0	493.8 ± 19.5	0.32 ± 0.0012	0.008 ± 0.00006	2.18 ± 0.06	4.61 ± 0.19
3	389.2 ± 25.7	0.54 ± 0.018	0.012 ± 0.0002	1.83 ± 0.11	3.34 ± 0.27
6	500.0 ± 45.7	0.34 ± 0.002	0.01 ± 0.0001	1.57 ± 0.03	4.65 ± 0.46
9	581.9 ± 40	0.29 ± 0.006	0.008 ± 0.002	1.49 ± 0.03	5.52 ± 0.4
<i>L. montanus</i>					
0	416.7 ± 24.6	0.45 ± 0.002	0.005 ± 0.0	3.33 ± 0.08	3.70 ± 0.25
3	322.8 ± 47.8	0.60 ± 0.025	0.013 ± 0.0003	5.9 ± 0.08	2.62 ± 0.50
6	378.9 ± 20.3	0.49 ± 0.003	0.011 ± 0.0015	5.52 ± 0.08	3.29 ± 0.21
9	430.3 ± 11.1	0.45 ± 0.012	0.013 ± 0.0006	4.6 ± 0.05	3.85 ± 0.10

\*= Calculado por diferencia (polifenoles totales-fenoles no taninos).

El pH de la solución alcalina fue medido al inicio y antes de cada cambio durante el tratamiento. De acuerdo a la Figura 11, cada 1.5 h el pH disminuyó respecto al pH inicial. *Lupinus montanus* fue la especie que mostró mayor disminución de pH.

Mayor reducción fue reportada por Torres *et al.* (1980) en *L. mutabilis* (98.6%) con un tratamiento alcalino por 6 h con un álcali no especificado. Otros autores reportaron que el uso de un medio alcalino reduce de 70-80% los AQ (Ortiz y Mukherjee, 1982). Sin embargo, en las semillas de *L. montanus* no se observó reducción en el contenido de AQ, por el contrario hubo un aumento significativo del 38% a las 9 h. Se ha indicado que el reactivo de Dragendorff también puede reaccionar con las proteínas, en especial si los alcaloides se extraen a partir de una solución alcalina (Evans, 2009).

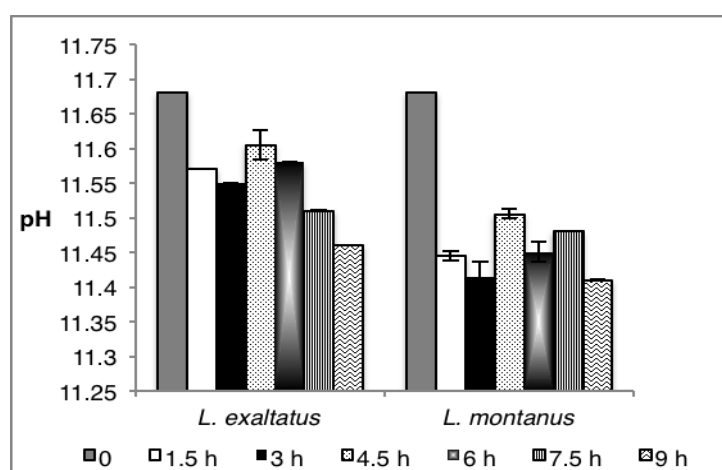


Figura 11. Cambios de pH en la solución durante el tratamiento alcalino aplicado a las semillas de *Lupinus*.

Los fenoles se dividen en varios grupos diferentes, que se distinguen por el número de átomos de carbono constitutivos en conjunción con la estructura del esqueleto fenólico básico (Kroll *et al.*, 2003; Michalak, 2006). Estos fitoquímicos hidrófilos que se producen en las semillas de lupino pueden dividirse en ácidos fenólicos, flavonoides y taninos (Siger *et al.*, 2012).

Los cambios en los factores anti-nutricionales en las semillas de dos especies de *Lupinus* por efecto del tratamiento alcalino se muestran en la Figura 12.

El contenido de polifenoles totales se redujo significativamente a las 3 h de exposición de las semillas de las dos especies al medio alcalino, pasado este tiempo la concentración aumentó a la inicial sin mostrar cambios hasta finalizado el tratamiento (Figura 12a).

En la Figura 12c y 12d se muestran los taninos totales y condensados, en ambas especies a las 3 h se observa reducción de taninos totales y aumento de los taninos condensados, lo que nos indica que la reducción específicamente fue de los taninos hidrolizables debido a la hidratación de las semillas. Posteriormente los taninos totales aumentan gradualmente hasta alcanzar su contenido original.

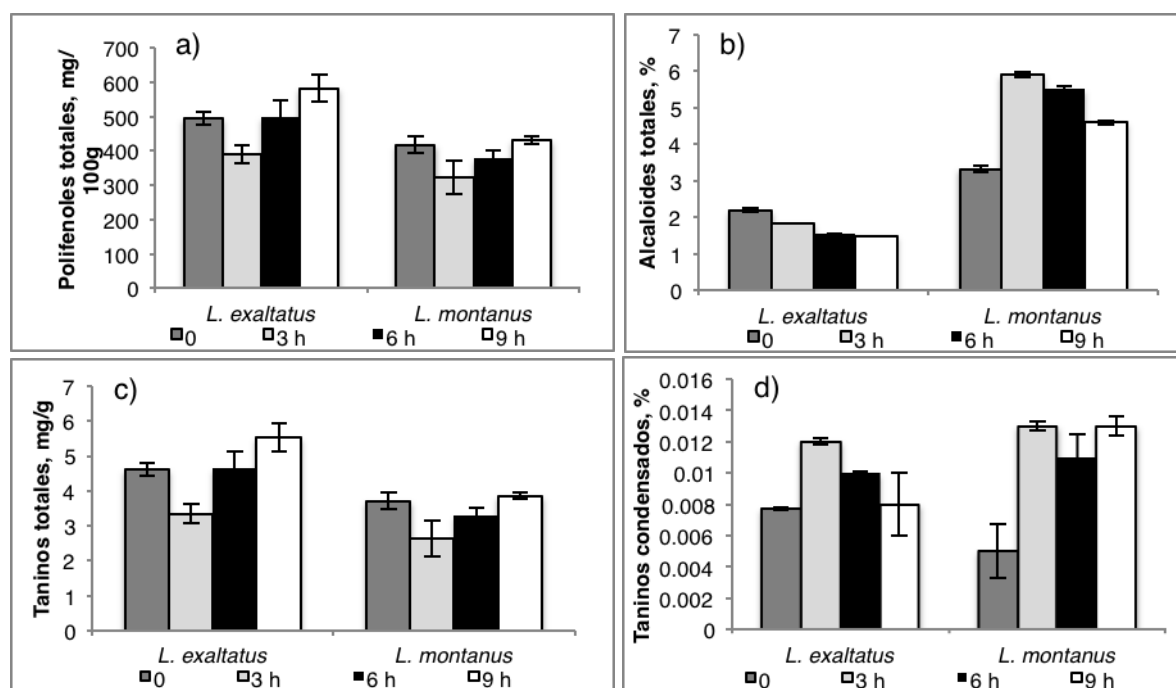


Figura 12. Cambios en la composición de factores anti-nutricionales de semillas de *L. exaltatus* y *L. montanus* durante un tratamiento alcalino.

Ortiz y Mukherjee (1982) observaron que este tratamiento químico fue adecuado para las semillas de lupino con contenidos de alcaloides de hasta  $4.2 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  de peso seco. Pero tiene desventajas, que incluyen pérdidas nutricionales y de sólidos (Gueguen y Cerletti, 1994), la incertidumbre con respecto a su seguridad química y negativo impacto en el medio ambiente.

## 6.4 Efecto del tratamiento biológico sobre las semillas de lupino

### 6.4.1 Variación en la composición proximal y FAN's durante el tratamiento de germinación

En el Cuadro 28 se presentan el porcentaje de germinación, las longitudes medias de los ejes embrionarios, y el rendimiento de las semillas germinadas a los 3 y 6 días después de iniciado el ensayo. Entre los 3 y 6 días de germinación, el eje embrionario presentó un crecimiento acelerado con rango de longitud de 1.3 a 2.75 cm para *L. exaltatus* y 1.4 a 2.9 cm en *L. montanus*. Como se registró en el Cuadro 28, el mayor porcentaje de germinación se observó durante los primeros 3 días, posterior a este tiempo el porcentaje disminuyó, siendo 0.17% al sexto día para *L. exaltatus* y 11.3% en *L. montanus* (Figura 9). El 70% de las semillas germinaron en el tercer día, este periodo máximo energético nos indica por lo general, que las plántulas que se originan de las semillas que germinan dentro del período energético constituyen el stock de plantación de mejor calidad (Ffolliott y Thames, 1983).

**Cuadro 28. Porcentaje de germinación, longitud del eje embrionario (cm), y rendimiento en peso de germinados de *L. montanus* y *L. exaltatus* después de 3 y 6 días de la germinación.**

Especie	Porcentaje de germinación		
	3 días	6 días	
<i>L. exaltatus</i>	86.3 ± 8.7	86.5 ± 8.0	
<i>L. montanus</i>	73.2 ± 2.0	84.5 ± 1.9	
Longitud de eje embrionario (cm ± d.e.)			
Especie	3 días	6 días	
<i>L. exaltatus</i>	1.32 ± 0.28	2.75 ± 0.86	
<i>L. montanus</i>	1.42 ± 0.25	2.97 ± 0.12	
Rendimiento en peso de germinados de 100 semillas (g PS)			
Especie	control	3 días	6 días
<i>L. exaltatus</i>	1.30	1.05 ± 0.03	1.06 ± 0.02
<i>L. montanus</i>	1.78	1.10 ± 0.01	1.12 ± 0.12

La capacidad de germinación de estas especies con el uso de la escarificación manual para romper la latencia varió de 84.5-86.5%. Esto puede deberse a daño del embrión

por efectos de la escarificación manual de la semilla o contaminación de las mismas por hongos.

El peso de las harinas de lupino disminuyó debido a la germinación. *L. exaltatus* mostró pérdidas de 19.2 y 18.5% a los 3 y 6 días respectivamente. Mayores pérdidas en peso se observaron para *L. montanus* con 38.2 y 37.0% a los 3 y 6 días. *Lupinus montanus* fue la especie con mayor rendimiento antes (27%) y después (5.4%) de los tratamientos con respecto a *L. exaltatus*. Sin embargo, pérdidas mayores a los 3 (21.9%) y 6 (28.4%) días fueron observados por Rumiyaqi *et al.* (2012) con germinados dulces de *L. angustifolius*; atribuyendo la pérdida del peso en seco al catabolismo de los lípidos y carbohidratos para producir energía durante la germinación.

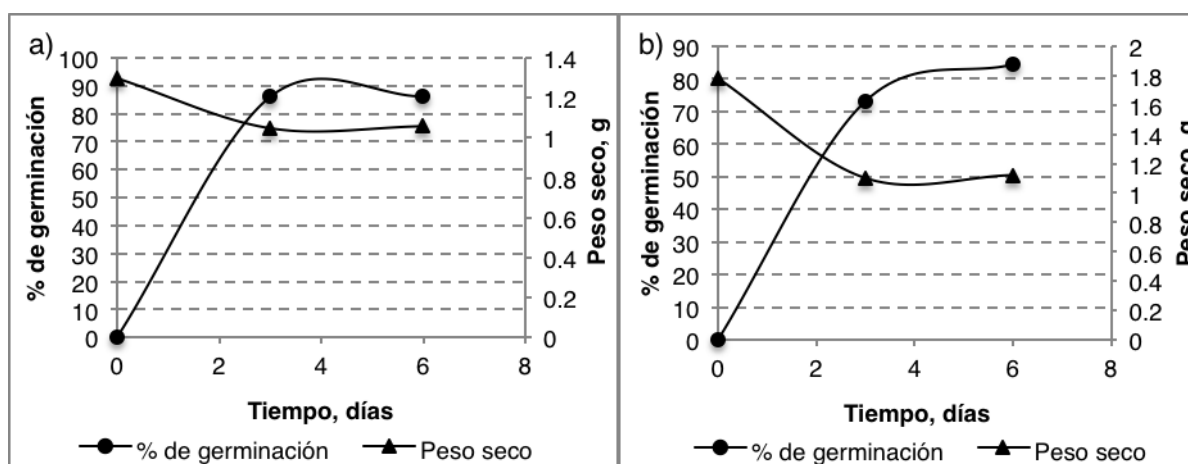


Figura 13. Relación porcentaje de germinación-peso seco de germinados de *L. exaltatus* (a) y *L. montanus* (b) después de 3 y 6 días.

La composición nutricional media de los germinados de lupino durante seis días se resumen a continuación expresados en porcentaje (Cuadro 29). En general, los factores nutricionales se mantuvieron estables con la germinación hasta los 6 días a excepción de un aumento en las proteínas y disminución del contenido de grasas que se describen más adelante. Dentro del contenido de azúcares solubles totales se encuentran los monosacáridos (pentosas, hexosas, fructosa, glucosa y galactosa),

disacáridos (azúcares reductores y no reductores como la sacarosa) y oligosacáridos. Estos últimos de gran importancia ya que son considerados no nutritivos pero el resto de los azúcares se consideran fuente de energía para el consumidor y para la semilla durante la germinación, por esa razón se ubicaron en el cuadro 29.

El contenido de azúcares solubles totales aumentó significativamente desde el tercer día. A los tres días después de la germinación, el incremento fue de 416 y 1342% y a los 6 días de 100 y 721% respecto al control en *L. exaltatus* y *L. montanus*, respectivamente. Esto debido a la removilización de reservas en la semilla para apoyar el crecimiento de la radícula primero y después para el crecimiento de la plántula (Nonogaki *et al.*, 2010).

La germinación a los 6 días incrementó 8.7 y 20.6% el contenido de proteínas en *L. exaltatus* y *L. montanus*, respectivamente (Figura 14a) y de cenizas 20.6% y 1.25%, respectivamente ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 14d) sobre las semillas control. El aumento de proteína puede deberse a la pérdida de harina no proteica de los germinados, pero también a la síntesis de aminoácidos para apoyar la proliferación celular durante este proceso (Nonogaki *et al.*, 2010). Desde el punto de vista nutricional, los germinados de las especies en estudio mejoran el contenido proteico a los 6 días de germinación. Este aumento de proteína en *L. exaltatus* fue similar al reportado por Dagnia *et al.* (1992) en *L. angustifolius*. En esta especie, la germinación a los 6 días aumentó un 10% el contenido de proteína; Rumiyaqi *et al.* (2012) observaron un 38% de incremento en la misma especie a los 9 días. El aumento de proteína durante la germinación también ha sido reportado en otras leguminosas como frijol mungo (Mubarack, 2005) y chícharo (Martinez-Villaluenga *et al.*, 2008). Otro importante componente químico del lupino son las grasas, que son una fuente de componentes nutricionales y compuestos bioactivos, tales como ácidos grasos mono y poliinsaturados, tocoferoles y fitoesteroles. Como se muestra en el Cuadro 29, la germinación durante 6 días reduce la grasa cruda en *L. exaltatus* de 5.83 a 4.31% (disminución de 26.07%) y en *L. montanus* de 10.02 a 6.02% (disminución de 39.5%) ( $p \leq 0.05$ ).

**Cuadro 29. Composición nutricional en semillas y germinados de *L. exaltatus* y *L. montanus*.**

Nutricionales									
Especie	Tiempo (dds)	Cenizas %	Grasas %	Proteína %	FDN %	Azúcares solubles totales %	Carbohidratos <sup>a</sup> %	Ácidos grasos <sup>b</sup> %	Energía <sup>c</sup> , kcal100 g <sup>-1</sup>
<i>L. exaltatus</i>	0	4.26 ± 0.12	5.83 ± 0.8	43.04 ± 0.61	27.07 ± 3.26	0.48 ± 0.02	19.78 ± 3.96	4.664	306.8
	3	4.94 ± 0.15	4.36 ± 0.04	52.28 ± 0.25	28.2 ± 1.01	2.48 ± 0.02	10.2 ± 0.64	3.488	292.4
	6	5.14 ± 0.34	4.31 ± 0.11	46.8 ± 0.17	27.22 ± 0.22	0.96 ± 0.13	16.5 ± 0.86	3.448	295.3
<i>L. montanus</i>	0	3.85 ± 0.12	10.02 ± 0.84	45.94 ± 0.83	26.52 ± 0.82	0.19 ± 0.004	13.66 ± 1.25	8.016	330.7
	3	4.65 ± 0.09	6.07 ± 0.64	54.1 ± 0.57	25.54 ± 0.73	2.74 ± 0.0	9.62 ± 2.04	4.856	312.6
	6	4.81 ± 0.02	6.06 ± 0.4	55.44 ± 0.07	21.61 ± 0.02	1.56 ± 0.24	12.3 ± 0.1	4.848	328.8

Cada valor representa la media ± desviación estándar de 3 repeticiones de cada determinación.

dds= días después de siembra

<sup>a</sup>Carbohidratos calculados como (100-total de otros componentes).

<sup>b</sup>Ácidos grasos calculados (0.8 x grasa cruda).

<sup>c</sup>Cálculo de energía metabolizable (kcal 100 g<sup>-1</sup>) (proteína x 17 + grasa x 37 + carbohidrato x 17).

La disminución es probable que sea por la utilización de los lípidos como fuente de energía durante la germinación. Este resultado fue menor al reportado por Rumiyaki *et al.* (2012) que observó 70% de disminución en el contenido de grasa cruda en germinados de *L. angustifolius* por 9 días.

En general, los contenidos de fibra no presentaron variación significativa por efecto de la germinación en *L. exaltatus* después de 6 h de exposición respecto al control (Figura 14b y 14d). En contraste en *L. montanus* se observó una reducción de 18.5% a las 6 h de exposición. Respecto al contenido de cenizas, éste mostró un incremento de 20.6% en *L. exaltatus* y de 24.9% en *L. montanus* después de 6 h de exposición.

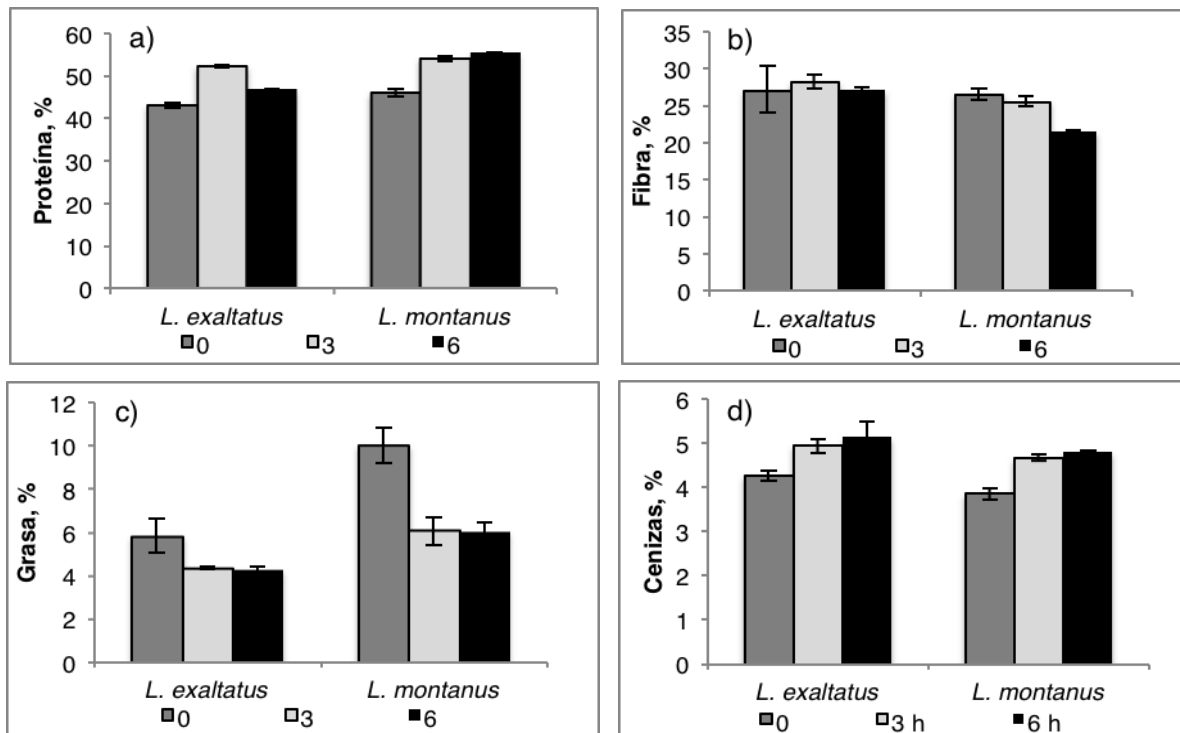


Figura 14. Cambios en la composición de factores nutritivos de semillas de *L. exaltatus* y *L. montanus* durante un tratamiento de germinación.

El total de las concentraciones de compuestos anti-nutricionales en las semillas de las dos especies de lupino germinadas durante seis días se presenta en el Cuadro 30. Los compuestos polifenoles totales de las semillas ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ) en extractos de metanol, fueron determinados a partir de la ecuación de regresión de la curva de calibración



( $Y=1.068x$ ,  $r^2 = 0.99$ ), expresada en mg AGE (mg de ácido gálico equivalente)/ 100 g de semillas. Las semillas del control, sin germinación, presentaron 493.8 y 416.8 mg 100 g<sup>-1</sup> de semilla para *L. exaltatus* y *L. montanus*, respectivamente. Estos valores se encontraron dentro del rango (374.4-2660.4 mg 100 g<sup>-1</sup> AGE) que reportaron Wang y Clements (2008) en 11 especies de lupino cultivadas en Australia. El contenido en polifenoles totales aumentó significativamente desde el tercer día para *L. montanus* (1.45%) y al sexto día en *L. exaltatus* (Figura 15a). Las concentraciones finales presentaron un aumento en *L. exaltatus* de 54.7 % y en *L. montanus* de 84.8% respecto al control.

**Cuadro 30. Composición de FAN's de semillas de *Lupinus* durante un proceso germinativo.**

Especie	Tiempo (días)	Anti-nutricionales				
		Polifenoles totales mg 100 g <sup>-1</sup>	Taninos condensados %	Fenoles no taninos mg g <sup>-1</sup>	Alcaloides %	*Taninos totales mg g <sup>-1</sup>
<i>L. exaltatus</i>	0	493.8 ± 19.5	0.01 ± 0.00006	0.32 ± 0.001	2.1 ± 0.06	4.6 ± 0.19
	3	486.6 ± 21.9	0.01 ± 0.004	0.40 ± 0.045	1.5 ± 0.18	4.4 ± 0.26
	6	763.8 ± 34.3	0.05 ± 0.0014	0.43 ± 0.04	1.4 ± 0.1	7.2 ± 0.3
<i>L. montanus</i>	0	416.7 ± 24.6	0.03 ± 0	0.46 ± 0.002	3.3 ± 0.07	3.7 ± 0.25
	3	674.7 ± 68.1	0.02 ± 0.001	0.41 ± 0.005	3.9 ± 0.18	6.3 ± 0.68
	6	770.4 ± 14.3	0.02 ± 0.003	0.73 ± 0.03	2.1 ± 0.03	6.9 ± 0.10

\*= Calculado por diferencia (polifenoles totales-fenoles no taninos).

El comportamiento mostrado por las semillas germinadas de *L. montanus* y *L. exaltatus* difiere del observado por Rusydi y Azrina (2012) en semillas de soya y cacahuete con disminución de 22.47 y 57.12% respectivamente; pero es similar al aumento de 65% durante la germinación a los 9 días observado por Dueñas (2008) en *L. campestris*. Jimenez-Martinez *et al.* (2012) indican un aumento en compuestos fenólicos a 450% más que el valor del control en *L. campestris* a los 9 días. Estos aumentos en compuestos fenólicos en las especies en estudio podrían conducir a la germinación de estas semillas como fuente de compuestos antioxidantes. Es necesario tomar en cuenta que el aumento depende de la especie y tiempo de germinación y no

siempre hay una relación entre contenido de polifenoles y actividad antioxidante (Wang y Clements, 2008).

En contraste con lo anterior, el contenido de alcaloides totales disminuyó de manera importante a los 6 días (33.5 y 35.4% en *L. exaltatus* y *L. montanus*, respectivamente). Sin embargo, el resto de los anti-nutricionales no disminuyeron respecto al control (Cuadro 30).

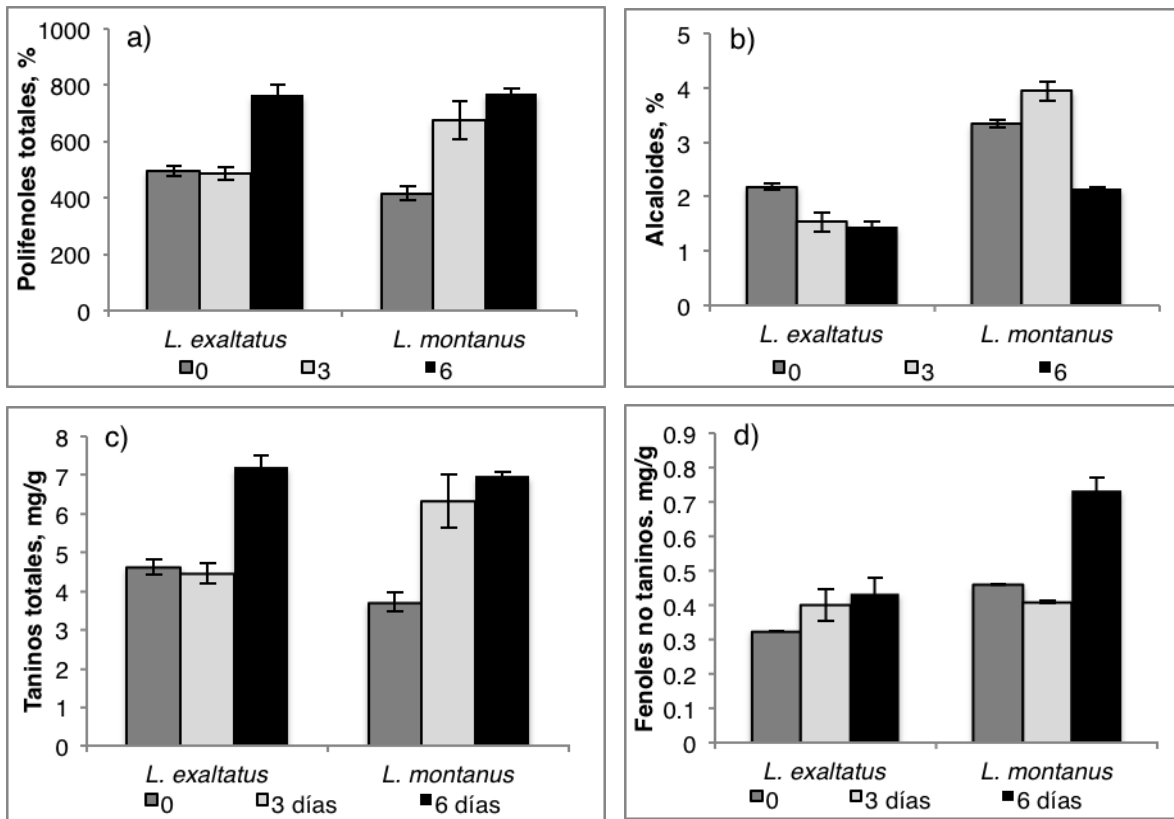


Figura 15. Variación de factores anti-nutricionales por efecto de la germinación durante 6 días en semillas de *Lupinus*.

De la Cuadra *et al.* (1994) encontraron un ligero aumento en alcaloides durante la germinación de *L. albus*, opuesto a lo encontrado en este estudio. Sin embargo, la reducción en el contenido de alcaloides en especies de lupino ha sido ya observada por Cortes *et al.* (2005). La germinación por tres días disminuyó 29-36% el contenido de alcaloides en 3 especies de lupino amargas (*L. albus* L. (LO-3923), *L. angustifolius*

(1413) y *L. campestris*), sugiriendo este tiempo como límite para minimizar la presencia de alcaloides y evitar la formación de ésteres de AQ (Cortes *et al.*, 2005).

Aún cuando el contenido de alcaloides se redujo en *L. exaltatus* desde el tercer día y en *L. montanus* hasta el sexto día (Figura 15b), estas reducciones no son suficientes para recomendar el consumo de los germinados, ya que el límite permisible es del 0.02%. De acuerdo con la clasificación por el contenido de alcaloides (von Baer *et al.*, 1992), los germinados se encuentran aún dentro del rango de amargos (>0.30%).

Los contenidos iniciales de taninos totales fueron similares a los reportados en *L. albus* (0.42%) y *L. termis* (0.32%) y superiores al reportado en *L. montanus* (0.92mg g<sup>-1</sup>) (Petterson *et al.*, 1997; Güemes-Vera *et al.*, 2012). Los taninos totales aumentaron 56.2% en *L. exaltatus* y 87.8% en *L. montanus* después de 6 días de germinación (Figura 15c). Esta tendencia fue similar a la reportada por Ahmed *et al.* (2006) durante la germinación de semillas de Guar, que atribuyen a que los taninos solubles que se encontraban en la testa se absorbieron durante la imbibición en la germinación.

El contenido de fenoles no taninos (flavonoides y ligninas) de semillas no tratadas de *L. exaltatus* y *L. montanus* fue de 0.32 y 0.46 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente; estas aumentaron con la germinación a los 6 días (Figura 15d). Los contenidos reportados de flavonoides en germinados de *L. albus*, *L. luteus* y *L. angustifolius* son 0.119-0.631 mg g<sup>-1</sup> (Siger *et al.*, 2012); los valores de fenoles no taninos obtenidos en este estudio se posicionarían dentro de este rango teniendo en cuenta la suma de las ligninas.

#### 6.5 Análisis de perfil de alcaloides por CCF

Además del análisis cuantitativo de alcaloides totales por el método espectrométrico de Dragendorff, se realizó un perfil de alcaloides por CCF con los controles y último tiempo de exposición en cada tratamiento para detectar la presencia de los mismos. En el cuadro 31 se presentan los valores de R<sub>f</sub> (relación con respecto al frente) de las muestras evaluadas en semillas de *L. exaltatus* y *L. montanus*.

Los resultados de CCF muestran que todas las muestras evaluadas presentaron AQ (Figura 16).

**Cuadro 31. Valores obtenidos del Rf (Relación con respecto al frente) a partir de muestras de semillas de *Lupinus*.**

Número	Muestra	Tratamiento	Mancha (cm)	Mancha (cm)	Mancha (cm)	Mancha (cm)	RF	RF	RF
1	Esparteína	Estándar	0.65				0.081		
2	<sup>1</sup> <i>L. montanus</i>	Control			3.5	6.95			0.86
3	<sup>2</sup> <i>L. montanus</i>	Control	0.4		3.5				
4	<sup>2</sup> <i>L. montanus</i>	Térmico 6h	0.45		3.25		0.05		
5	<sup>2</sup> <i>L. montanus</i>	Remojo 18h	0.4	2.35	3.3		0.056	0.29	
6	<sup>2</sup> <i>L. montanus</i>	Alcalino 9h	0.45	2.4	3.5		0.05	0.3	
7	<sup>2</sup> <i>L. montanus</i>	Cotiledones	0.6	2.45	3.55		0.056	0.306	
8	<sup>3</sup> <i>L. exaltatus</i>	Control			3.25	6.65	0.075		0.83
9	<sup>3</sup> <i>L. exaltatus</i>	Térmico 6h		2.1		6.25		0.26	0.78
10	<sup>3</sup> <i>L. exaltatus</i>	Remojo 18h			3	6.55			0.81
11	<sup>3</sup> <i>L. exaltatus</i>	Alcalino 9h			3.45	6.75			0.84
12	<sup>3</sup> <i>L. exaltatus</i>	Cotiledones			3.55	6.7			0.83

<sup>1</sup>Municipio de Guadalupe Victoria, <sup>2</sup>Municipio de Tlachichuca, localidad Miguel Hidalgo, <sup>3</sup>Xipes.

Por sus valores de RF y su parecido a la mancha que desarrolla la esparteína utilizada como estándar, los AQ mayoritarios en *L. montanus* pudieran tratarse de esparteína, sin embargo las concentraciones pudieran variar conforme a los tratamientos aplicados.

Asimismo, éste análisis cualitativo permitió separar a *L. montanus* (número 2) colectado en el municipio de Guadalupe Victoria (GV), de los colectados en el municipio de Tlachichuca, localidad Miguel Hidalgo (MH) (3 al 7). Aún cuando presentan las mismas características morfológicas, parece ser que el alcaloide principal no es esparteína.

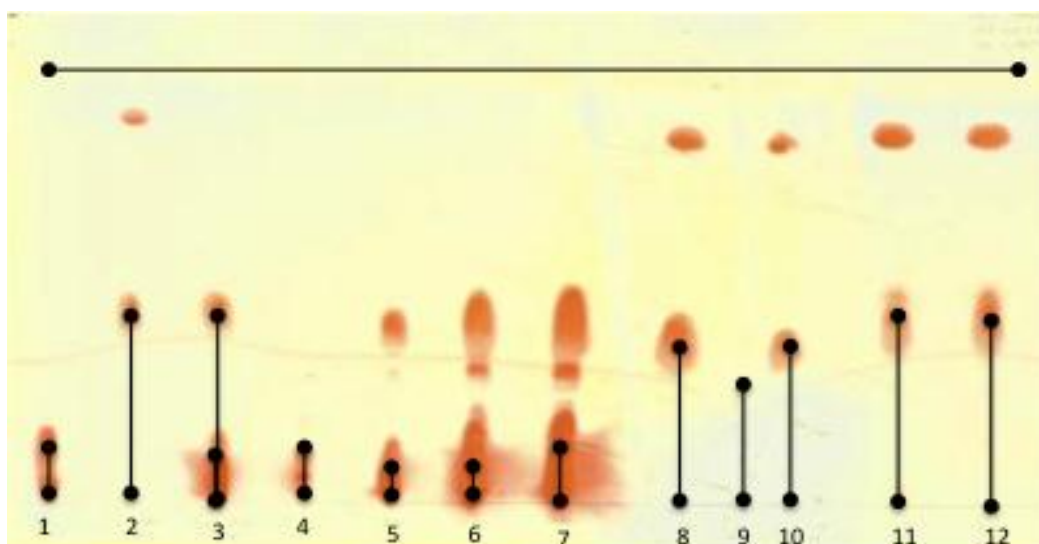


Figura 16. Análisis cualitativo para determinar la presencia de alcaloides en semillas de *Lupinus*, 1=estándar (1 mg esparteína/ml), 2=*L. montanus* Guadalupe Victoria, 3=*L. montanus* Miguel Hidalgo, 4=*L. montanus* MH térmico 6h, 5=*L. montanus* MH remojo 18 h, 6=*L. montanus* MH alcalino 9 h, 7=*L. montanus* MH, cotiledones, 8=*L. exaltatus*, 9=*L. exaltatus* térmico 6 h, 10=*L. exaltatus* remojo 18 h, 11=*L. exaltatus* alcalino 9 h, 12= *L. exaltatus*, cotiledones.

De igual manera en la Figura 16 se puede observar que en *L. exaltatus* se encuentra otro tipo de alcaloide diferente a la esparteína utilizada como estándar. Además de

que en la posición 4 y 9 en la placa las manchas son más pequeñas y de menor intensidad.

Estos resultados concuerdan con el análisis anterior que mostró que el tratamiento térmico fue el más eficiente sobre la reducción de alcaloides respecto al resto de los tratamientos aplicados.

## 7. CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados en esta investigación sobre el efecto de tratamientos hidrotérmicos, de remojo, alcalino, descascarillado y germinación sobre la concentración de compuestos nutricionales y antinutricionales de semillas de *L. montanus* y *L. exaltatus*, se concluye:

Los tratamientos físicos, químicos y biológicos aplicados, mostraron efecto significativo de especie y tiempo de exposición, sobre el contenido nutricional y anti-nutricional de las semillas de *L. exaltatus* y *L. montanus*.

La reducción o aumento en las variables evaluadas dependió de la especie y del tiempo de exposición (interacción especie x tiempo)

El tratamiento térmico reduce en mayor proporción el peso de las harinas en comparación con el de remojo; las disminuciones fueron de 23 vs 6.07% para *L. exaltatus* y 22 vs 1.97% en *L. montanus*, respectivamente. La aplicación éste tratamiento durante 6 horas a las semillas disminuye los compuestos anti-nutricionales e incrementa la concentración de proteína y de fibra. Los alcaloides se reducen 82 y 62.7% después de 6 h de exposición en semillas de *L. exaltatus* y *L. montanus*, respectivamente. La hipótesis planteada se rechaza.

El tratamiento de remojo durante 18 h no presentó ningún efecto sobre la concentración de compuestos nutricionales, pero incrementaron los anti-nutricionales en las semillas de las especies en estudio.

El descascarillado de la semilla mostró que el mayor contenido de alcaloides totales, grasa cruda y proteína cruda se encuentra en el cotiledón. Éste constituye el 59 y

71.6% del total de las semillas de *L. exaltatus* y *L. montanus*, respectivamente. La fibra cruda se encuentra en mayor proporción en la testa de las semillas de las especies analizadas (66.3 y 68.3%, en *L. exaltatus* y *L. montanus*, respectivamente).

El tratamiento alcalino disminuye 31.6% el contenido de alcaloides en *L. exaltatus* pero también reduce el de los nutricionales.

El tratamiento germinativo, a los 6 días, redujo 33.5 y 35.4% el contenido de alcaloides totales en *L. exaltatus* y *L. montanus*, respectivamente, sin reducción de los factores nutricionales. El peso seco de la semilla germinada de las dos especies analizadas, disminuye 18.4% en *L. exaltatus* y 36% en *L. montanus* al finalizar la germinación; y la longitud del eje embrionario aumenta dos veces a partir del tercer día.

El tratamiento de germinación durante 6 días aumenta el contenido de polifenoles totales en *L. exaltatus* (54.7%) y *L. montanus* (84.8%), pudiendo ser éste un método alternativo para la producción de compuestos antioxidantes.

## 8. RECOMENDACIONES

Se hacen las siguientes recomendaciones:

Cuantificar los factores anti-nutricionales como los AQ por Cromatografía de gases-Espectrofotometría de masas (GC-MS) y obtener el perfil de alcaloides; y oligosacáridos por cromatografía líquida de alta resolución en ambas especies.

Evaluar los tratamientos aplicados en las harinas de las semillas para tener expuestos los FAN's, ya que sabemos que los que están en mayor proporción se encuentran en el cotiledón.

Evaluar la aplicación de otros tratamientos combinados como descascarillado/térmico, remojo/fermentación (*Rhizopus oligosporus*), remojo/térmico, extrusión/térmico y el remojo con agitación constante en las semillas de *Lupinus* en estudio.

Buscar otras alternativas a largo plazo como el mejoramiento genético para disminuir los FAN's a través de la búsqueda de mutantes naturales con bajos contenidos de compuestos no deseados.

Para el aprovechamiento de las semillas de estas especies en la alimentación es necesario evaluar su manejo agronómico y la disminución de la latencia de las semillas por ser una leguminosa de testa dura.

## 9. LITERATURA CITADA

Aguilera, J. M., M. F. Gerngross and E. W. Lusas. 1983. Aqueous processing lupin seed. *Journal of Food Technology* 18: 327-333.

Aguilera, Y., M. A. Martín-Cabrejas, V. Benítez, E. Mollá, F. J. López-Andréu, and R. M. Esteban. 2009. Changes in carbohydrate fraction during de hydration process of common legumes. *Journal of Food Composition and Analysis* 22: 678- 683.

Ahmed, M. B., R. A. Hamed, M. E. Ali, A. B. Hassan and E. E. Babiker. 2006. Proximate Composition, Antinutritional Factors and Protein Fractions of Guar Gum Seeds as Influenced by Processing Treatments. *Pakistan Journal of Nutrition* 5 (5): 481-484.

Alaa, Y. A., G. S. Adil and E. N. Ibtisam. 1982. Occurrence and stability of trypsin inhibitor in Iraqi local legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30: 1184-1185.

Alonso, R., A. Aguirre and F. Marzo. 2000. Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and *in vitro* digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chemistry* 68: 159-165.

Ambaye, C., T. Tolessa, A. Abera, H. T. Sherief, D. Abebe and K. Urga. 2002. Antihypertensive activity of residue from gebto arekei, locally distilled medicinal spirit from a brew containing *Lupinus albus* seeds in renovascular hypertensive guinea-pigs. *Ethiopian Journal of Health Sciences* 12: 25-35.

Archer, B. J., S. K. Johnson, H. M. Devereux and A. L. Baxter. 2004. Effect of fat replacement by insulin or lupin-kernel fibre on sausage patty acceptability, post-meal perceptions of satiety and food intake in men. *British Journal of Nutrition* 91: 591-599.

Arinathan, V., V. R. Mohan, and A. J. De Britto. 2003. Chemical composition of certain tribal pulses in south India. *International Journal of Food Sciences and*



Nutrition 54: 209-17.

Armour, J.C., R.L.C. Perera, W.C. Buchan and G. Grant. 1998. Protease inhibitors and lectins in soya beans and effects of aqueous heat-treatment. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture* 78: 225-231.

Arnoldi, A. 2005. Optimised processes for preparing healthy and added value food ingredients from lupin kernels, the european protein-rich grain legume. Aracne Ed., Italy, 202 p.

Arntfield, S. D., M. G. Scanlon, L. J. Malcolmson, B. M. Watts, S. Cenkowski and D. Ryland. 2001. Reduction in lentil cooking time using micronization: comparison of 2 micronization temperatures. *Journal of Food Science* 66: 500-505.

A.O.A.C., Association of Official Analytical Chemists. 1995. *Official Methods of Analysis*, 16<sup>th</sup> edn. AOAC, Arlington, VA.

Augustin, J. and B.P. Klein. 1989. Nutrient composition of raw, cooked, canned, and sprouted legumes. En: *Legumes: chemistry, technology, and human nutrition*. Matthews R.H. Ed. 187-217.

Aykroyd, W. R. 1977. Las leguminosas en la nutrición humana. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Colección Alimentación y Nutrición. Roma. Segunda reimpresión. 42-131.

Azeke, M. A., B. Fretzdorff, H. Buening-Pfaue and T. Betsche. 2007. Comparative effect of boiling and solid substrate fermentation using the tempeh fungus (*Rhizopus oligosporus*) on the flatulence potential of African yambean (*Sphenostylis stenocarpa* L.) seeds. *Food Chemistry* 103:1420-1425.

Azizah, A. H. and H. Zainon. 1997. Effect of processing on dietary fiber contents of selected legumes and cereals. *Malaysian Journal of Nutrition* 3: 131-137.

Ballester D., X. Castro, P. Cerda, E. Garcmha and E. Yanez. 1988. Bread quality nutritional value of marraqueta and hallulla supplemented with full-fat sweet lupine flour *Lupinus albus* cultivar multolupa. *International Journal of Food Science and Technology* 23:225-232.

Barampama, Z. and R. E. Simard. 1994. Oligosaccharides, antinutritional factors and protein digestibility of dry beans as affected by processing. *Journal of Food Sciences* 59: 833-838.

Bartholomai, G. B., E. Tosi y R. González. 2000. Caracterización de compuestos nutritivos, no nutritivos y calidad proteica. Programa Iberoamericano de Ciencia y

Tecnología para el Desarrollo. Editorial Eudeba, Buenos Aires, Argentina.

Batterham, E. S. y A. R. Egan. 1986. Utilization of food legumes as feed. In Food Legume Improvement for Asian Farming Systems, E. S. Wallis and D. E. Byth, editors, Canberra: ACIAR. 193-200.

Bellaloui, N., J. E. Hanks, D.K. Fisher and A. Mengistu. 2009. Soybean seed composition is influenced by within-field variability in soil nutrients. Crop Management, doi:10.1094/CM-2009-1203-01-RS.

Bermúdez-Torres, K., J. Martínez-Herrera and R. Brito-Figueroa. 2009. Activity of quinolizidine alkaloids from three Mexican *Lupinus* pest *Spodoptera fungiperla* Biocontrol, 54: 459-466.

Bermúdez-Torres, K., N. Robledo Quintos, J. Martínez-Herrera, A. Tei and M. Wink. 1999. Biodiversity of the genus *Lupinus* in Mexico. En E. van Santen, M. Wink, S. Weissman, y P. Roemer (Ed.), *Lupin an Ancient crop for the New Millennium*. Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Lupin Conference. New Zealand: International Lupin Association.

Bernal, A. A., J. N. Zamora, G. Virgen y R. Nuño. 2005. Actividad biológica in vitro de extractos etanólicos de *Lupinus* spp. sobre hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología 23: 140-146.

Bhardwaj, H. L., A. A. Hamama and L. C. Merrick. 1998. Genotypic and environmental effects on lupin seed composition. Plant Foods Human Nutrition 53: 1-13.

Bhat, R. and A. A. Karim. 2009. Exploring the nutritional potential of wild and under utilized legumes. Food Science and Food Safety 8: 305-333

Blade, S. F., K. Lopetinsky, M. Olson, P. Laflamme and C. P. Blade, S.F. 2003. High protein lupins for western Canada. Canadian Journal of Plant Science (in press) Disponible en: [http://www.regional.org.au/au/asa/2004/poster/3/4/7/418\\_bladesf.htm](http://www.regional.org.au/au/asa/2004/poster/3/4/7/418_bladesf.htm).

Boschin G., A. D'Agostina, P. Annicchiarico and A. Amoldi. 2008. Effect of genotype and environment on fatty acid composition of *Lupinus albus* L. seeds. Food Chemistry 108: 600-606.

Boye, J. I., S. Aksay, S. Roufik, S. Ribéreau, M. Mondor, E. Farnworth and S. H. Rajamohamed. 2010. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. Food Research International 43: 537-546.

Bressani R, M. Lau and M. S. Vargas. 2003. Protein and cooking quality and residual content of dehydroxyphenylalanine and of trypsin inhibitors of processed *Mucuna* beans (*Mucuna* spp). Tropical and Subtropical Agroecosystems 1: 197-212.

Burel, C., T. Boujard, F. Tulli and S. Kaushik. 2000. Digestibility of extruded peas, extruded lupin, and rapeseed meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*). Aquaculture 188: 285-298.

Butler, L. G. and K.D. Bos. 1993. Analysis and characterization of tannins in faba beans, cereals and other seeds. A literature review. In: Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds: proceedings of the Second International Workshop on 'Antinutritional Factors (ANFs) in Legume Seeds', Wageningen, The Netherlands, 1-3 December 1993. Poel, A.F.B. van der, J. Huisman and H.S. Saini (Editors). EAAP Publication no. 70. Wageningen Pers. Netherlands, pp: 81- 90.

Caicedo, C., E. Peralta, E. Villacrés y M. Rivera. 2001. Poscosecha y mercado del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) en Ecuador. Quito, Ecuador: INIAP-FUNDACIT, Quito, Ecuador. In: Chocho o lupino producción, fitonutrición, enfermedades y plagas, zonificación, mercado y poscosecha, agroindustria, guía del cultivo de chocho y costos de producción, (ed. Peralta, E.), Published as CD by INIAP-FUNDACIT.

Carbonaro, M., M. Cappelloni., S. Nicoli., M. Lucarini., and E. Carnovela. 1997. Solubility-Digestibility Relationship of Legume Proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45(9): 3387-3394.

Cardador-Martinez, A., G. Loarca-Pina and B. D. Oomah. 2002. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 50:6975-80.

Carvajal-Larenas, F.E., M.J.R. Nout, M.A.J.S. van Boekel, M. Koziol and A.R. Linnemann. 2013. Modeling of the aqueous debittering process of *Lupinus mutabilis* Sweet. LWT - Food Science and Technology 53: 507-516.

Casey, R., C. Domoney and A. M. Smith. 1993. Biochemistry and molecular biology of seed products. In R Casey, DR Davies, eds, Peas: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology. CAB International, Wallingford, UK, 141-163.

Charley, H. 1999. Tecnología de alimentos. Procesos químicos y físicos en la preparación de alimentos. (Ed). Limusa. México. (pp: 623-633).

Chau, C. F. and P. C. K. Cheung. 1997. Effect of various processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch of two Chinese indigenous legume seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45: 4773-4776.

Cheeke, P. R. and J.D. Kelly. 1989. Metabolism, toxicity and nutritional implications of quinolizidine (lupin) alkaloids. In: J. Huisman, T.F.B. van der Poel and I. E. Liener (Eds). Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds. Proceedings of the 1st International Workshop on Antinutritional Factors (ANF) in Legume Seeds, November 23-25, 1988. Pudoc, Wageningen, Netherlands. (pp: 189-210).

Chel-Guerrero, L. V. Perez-Flores, D. Bentacur-Ancona and G. Davila-Ortiz. 2002. Functional properties of flours and protein isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 584-91.

Chi-Fai, C., C. K. Peter and W. Y. Shing. 1997. Effect of cooking on content of amino acids and antinutrients in the Chinese indigenous legume seeds. Journal of the Science of Food and Agriculture, 75, 447-452.

Chung, K-T., T. Y. Wong, C-I. Wei, Y-W. Huang and Y. Lin. 1998. Tannins and human health: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 38(6): 421-464.

Clark, R. and S. Johnson. 2003. Sensory acceptability of food with added lupine (*Lupinus angustifolius*) kernel fiber using pre-set criteria. Journal of Food Science 67: 356-362.

Clements, J. C, B. J. Buirchel, H. Yang, P. M. Smith, C. Sweetingham and C. G Smith. 2005. Lupin. In: Singh, R. J. y P. P. Jauhar (eds.). Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement grain legumes. Volume I. CRC Press, LLC. eBook. Boca Raton, Florida, USA.

Cortes, S. M., P. Altares, M. M. Pedrosa, C. Burbano, C. Cuadrado, C. Goyoaga, M. Muzquiz, C. Jimenez-Martínez, G. Dávila-Ortiz. 2005. Alkaloid variation during germination in different lupin species. Food Chemistry 90: 347-355.

Conn, E. E. 1973. In Toxicants occurring naturally in foods. Washington, D.C.: Food and Nutrition Broad Research Council/National Academy of Sciences.

Cunha-Queda, A. C., y M. L. Beirao da Costa. 1994. A RSM study to the effect of controlled germination in *Lupinus luteus* alkaloid content. In J. M. Neves-Martins and M. L. Beirao da Costa (Eds.), Advances in lupin research (pp. 521-523). Lisboa: Instituto Superior de Agronomía (ISA press).

DAF, Departamento of Agricultura and Food. 2007. Australian Sweet Lupin. A very healthy asset. Government of Westwern Australia, 1:3-4.

Dagnia, S. G., D. S. Petterson, R. R. Bell and F.V. Flanagan. 1992. Germination alters the nutritional value of lupin seed. Journal of the Science of Food and Agriculture 60:

419-423.

De Almeida, G. E., K. D. Queiroz-Monici, S. M. Machado and A. Costa. 2006. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chemistry* 94: 327-330.

De la Cuadra, C., J. C. Tello, M. Muzquiz y R. Calvo. 1994. Poder fungicida *in vitro* de esparteína y gramina, alcaloides del Lupino amargo. *Studia Botánica* 13: 99-101.

De la Vega, R., M.P. Gutiérrez, C. Sanz, R. Calvo, L.M. Robredo, De la Cuadra, C., and Muzquiz, M. 1996. Bactericide like effect of *Lupinus* alkaloids. *Industrial Crops and Products*,5: 141-148.

Deshpande, U. S. and S. S. Deshpande. 2001. Legumes. In Salunke and Deshpande (Ed.), *Foods of Plant Origin. Production, Technology and Human Nutrition* England, pp: 137-300.

Dijkink, B., V. Miedendorp and W. Blom. 2008. Lupins for health and Wealth. *Proceedings of the 12 th International Lupin Conference*. En Palta, J. A. and J. B. Berger (Ed.), *Altering Lupine Flour for the Food Industry*. Canterbury, New Zealand. (pp:454-458).

D'Mello, J.P.F. and A.G. Walker. 1991. Detoxification of jackbeans (*Canavalia ensiformis*): Studies with young chicks. *Animal Feed Science and Technology* 33: 117-127.

Doxastakis, G., M. Papageorgiou, D. Mandalou, M. Irakli, E. Papalamprou and A. D'Agostina. 2007. Technological properties and non-enzymatic browning of white lupin protein enriched spaghetti. *Food Chemistry* 101: 57-64.

Doyle, J. J. 1994. Phylogeny of the legume family: an approach to understanding the origins of nodulation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25:325-49.

Drakos, A., G. Doxastakis and V. Kiosseoglou. 2007. Functional effects of lupin proteins in comminuted meat and emulsion gels. *Food Chemistry* 100: 650-655.

Duenas, M., Hernandez, T., Estrella, I. and Fernandez, D. 2009. Germination as a process to increase the polyphenol content and antioxidant activity of lupin seeds (*Lupinus angustifolius* L.). *Food Chemistry* 117: 599-607.

Duffus, C. y C. Slaughter. 1992. *Las semillas y sus usos*. AGT (Editor). México. Primera reimpression (pp: 9-25, 31-36,121-123).

Duranti, M., A. Consonni, C. Magni, F. Sessa and A. Scarafoni. 2008. The Major

Proteins of Lupin Seed: Characterization and Molecular Properties for Use as Functional and Nutraceutical Ingredients. *Trends in Food Science and Technology* 19(12): 624-633.

Eastwood, R. J., and C. E. Hughes. 2008. Origins of domestication of *Lupinus mutabilis* in the Andes. Proceedings of the 12th International Lupin Conference. Canterbury, New Zealand: International Lupin Association. (pp: 373- 380).

Eicher, N. J. and L.D. Satterlee. 1988. Nutritional quality of Great Northern bean proteins processed at varying pH. *Journal of Food Sciences* 53: 1139-1143.

Eisner, P., K. Muller, U. Knauf and G. Kloth. 2008. Method for producing a vegetable protein ingredient for ice cream and ice cream containing said protein ingredient. Patent USPTO Application #: 20080089990–Class: 426565000 (USPTO).

Esonu, B. O., A. B. I. Udedibie and C.R. Carlini. 1998. The effect of toasting, dry urea treatment and sprouting on some thermostable toxic factors in the jackbean seed. *Nigerian Journal of Animal Production* 25: 36-39.

España, J. I., R. Uauy, X. Cassorla, G. Barrera and E. Yañez. 1992. Sweet lupin protein quality in young men. *Journal of Nutrition* 122: 2341-2347.

Erdemoglu, N., S. Ozkan, y F. Tosum. 2007. Alkaloid profile and antimicrobial activity of *Lupinus angustifolius* L. alkaloid extract. *Phytochemistry Reviews* 6: 197-201.

Evans, A. J. 1994. The carbohydrates of lupins, composition and uses. *In*: M. Dracup and J. Palta (Eds). Proceedings of the First Australian Lupin Technical Symposium. Western Australian Department of Agriculture, South Perth. Pp. 110-114.

Evans, W. C. 2009. Trease and Evans, Pharmacognosy. Chapter 26. 16th edition. Saunders Elsevier. USA. pp. 353-415.

Evans, D. M. and P. J. Murphy. 2011. A biomimetic approach to the cylindrospermopsin alkaloids. *Chemical Communications* 47: 3225-3226.

Famurewa, J.A.V. and A. O. Raji. 2005. Parameters affecting milling qualities of undefatted soybeans (*Glycine max* L. Merrill) Selected thermal treatment. *International Journal of Food Engineering* 1:1-9.

FAO/WHO. 1985. Energy and Protein Requirements: Report of a joint FAO/WHO meeting. Expert consultation. Technical report series 724; World Health Organization: Geneva, Switzerland.

FAO. 2013. Neglected crops:1492 from a different perspective, Vol. 2012, Rome: FAO/United Nations. Available on line at. <http://fao.org/docrep/t0646e/T0646E0f.htm>.

Farhangi, M. and C. G. Carter. 2001. Growth, physiological and immunological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to different dietary inclusion levels of dehulled lupin (*Lupinus angustifolius*). *Aquaculture Research* 32: 329-340.

Fernandez, N.M., P. Aranda, M. Lopez-Jurado, G. Urbano, I. Estrella, C. Sotomayor, C. Diaz, M. Prodanov, J. Frias and C. Vidal-Valverde. 1993. Effect of processing on some antinutritive factors of faba beans: Influence on protein digestibility and food intake in rats. In: Recent advances of research in antinutritional factors in Legume seeds; Wageningen Per: Wageningen, The Netherlands, pp: 467-471.

Fernandez-Orozco, R., J. Frias, H. Zielinski, R. Muñoz, M. Piskula and H. Kozłowska. 2009. Evaluation of bioprocesses to improve the antioxidant properties of chickpeas. *LWT-Food Science and Technology* 42:885-892.

Ffolliott P. F. y J. L. Thames. 1983. Recolección, manipuleo, almacenaje y pretratamiento de las semillas de Prosopis en América Latina. FAO. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/q2180s/Q2180S00.htm#TOC>

Fraile, M. E., D. García-Suarez y A. Martínez-Bernal. 2007. Nutritivas y apetecibles: conozca de leguminosas comestibles. Parte I. Hojas, vainas y semillas. (pp: 27-35).

Fraunhofer Magazine. 2006. Vegetable ice cream. A publication of Fraunhofer Gesellschaft. ISN 1615-7028. [www.fraunhofer.de/magazine](http://www.fraunhofer.de/magazine).

Fredrikson M., M. Larsson Alminger, N. G. Carlsson and A. S. Sandberg. 2001. Phytate content and phytate degradation by endogenous phytase in pea (*Pisum sativum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 1139-1144.

García-López, P. M., M. Muzquiz, M. A. Ruíz-López, J. F. Zamora-Natera, C. Burbano-, M. M. Pedrosa, C. Cuadrado and P. Garzón-De la Mora. 2001. Chemical composition and fatty acid profile of several mexican wild lupins. *Journal of Food Composition and Analysis* 14:645-665.

García-López, P.M., P. Garzon de la M., W. Wysocka, B. Maiztegui, M. E. Alzugaray, H. Del Zotto and M. I. Borelli. 2004. Quinolizidine alkaloids isolated from *Lupinus* enhance insulin secretion. *European Journal of Pharmacology* 504: 139-142.

George Weston Foods Limited. 2005. Process for the production of lupin extracts. Patent: WO/2005/002355, International Application No PCT/AU2004/000877, IPC: A23J 3/14 (2006.01), A23L 1/20 (2006.01).

- Giczewska, A. and J. Borowska. 2003. Nutritional value of broad bean seeds. Part 1: Starch and fibre. *Nahrung* 47 (2): 95-7.
- Ghezlou, K. 2000. Extraction, Identification and Estimation of Carotenoids in Australian Lupin Seed. MSc Thesis, Curtin University of Technology, Perth, Australia.
- Gladstones, J. S. 1998. Distribution, origin, taxonomy, history and importance. Chapter I. In; J.S. Gladstones, C. A. Atkins, J. Hamblin (eds.). *Lupins as crop plants: biology, production and utilization*. CAB International, Wallingford, UK, (pp: 1-39).
- Glencross, B. D. and Hawkins, W. E. 2004. A comparison of the digestibility of several lupin (*Lupinus* spp.) kernel meal varieties when fed to either rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) or red seabream (*Pagrus auratus*). *Aquaculture Nutrition* 10: 65-73.
- Glencross, B. 2008. Harvesting the benefits of lupin meals in the aquaculture feeds. In "Lupins for Health and Wealth. Proceedings of the 12th International Lupin Conference", Palta, J. A. and J. B. Brger, (eds), International Lupin Association, Canterbury, New Zealand. (pp. 496-505).
- Grela, E. R., T. Studziński and J. Matras. 2001. Antinutrients factors in seeds of *Lathyrus sativus* cultivated in Poland. *Lathyrus Lathyrism Newsletter*, 2: 101-104.
- Grosjean, F., D. Bastianelli, A. Bourdillon, P. Cerneau, C. Jondreville and C. Peyronnet. 1998. Feeding value of pea (*Pisum sativum* L.). 2. Nutritional value in the pig. *Journal of Animal Science* 67: 621-625.
- Gross, R. 1982. El cultivo y utilización del tarwi *Lupinus mutabilis* Sweet. Estudio FAO: Producción y Protección vegetal; Food and Agriculture Organization: Rome.
- Golovhenko, V. I. 1982. Mutagenesis in selection of alkaloidless varieties of White and yellow lupin. In: Proceedings of the second International lupin conference, Publicaciones Agraris, Ministry of Agriculture, Madrid, Spain, pp: 43-45.
- Gouveia, A. and S. J. Davies. 2000. Inclusion of an extruded dehulled pea seed meal in diets for juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 182: 183-193
- Güemes-Vera, N., J. Martinez-Herrera, J. F. Hernandez-Chavez, J. Yanez-Fernandez and A. Totosaus. 2012. Comparison of Chemical Composition and Protein Digestibility, Carotenoids, Tanins and Alkaloids Content of Wild *Lupinus* Varieties Flour. *Pakistan Journal of Nutrition* 11(8): 676-682



- Güemes-Vera, N., R. Peña, C. Jiménez, G. Dávila and G. Calderón. 2008. Effective detoxification and decoloration of *Lupinus mutabilis* seed derivatives, and effect of these derivatives on bread quality and acceptance. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 1135-1143.
- Gurfinkel, D.M. and A.V. Rao. 2002. Determination of saponins in legumes by direct densitometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 426-430.
- Gurumoorthi, P., K. Janardhanan and R. V. Myhrman. 2008. Effect of differential processing methodson L-dopa and protein quality in velvet bean, an underutilized pulse. *Food Science and Technology* 41: 588-96.
- Gustafsson, E. L. and A. S. Sandberg. 1995. Phytate reduction in brown beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science* 60: 149-152.
- Hall, R.S., S.K. Johnson, A.L. Baxter and M.J. Ball. 2005. Lupin kernel fibre enriched foods beneficially modify serum lipids in men. *European Journal of Clinical Nutrition* 59: 325-33.
- Hall, R.S., S.J. Thomas and S.K. Johnson. 2005. Australian sweet lupin flour addition reduced the glycaemic index of a white bread breakfast without affecting palatability in healthy human volunteers. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 14: 91-97.
- Hamama, A.A. and H.L. Bhardwaj. 2004. Phytosterols, triterpene alcohols, and phospholipids in seed oil from white lupin, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 81: pp. 1039-1044.
- Hata, K., K. Hori and S. Takahashi. 2003. Role of p. 38 MAPK in Lupeol induced B16 2F2 mouse melanoma cell differentiation. *Journal of Biochemistry* 134: 441-445.
- Hatzold, T., I. Elmadfa and R. Gross. 1983. Edible oil and protein concentrate from *Lupinus mutabilis*. *Plant. Foods for Human Nutrition* 32: 125-132.
- Hedge, J. E. and B. T. Hofreiter. 1962. In: *Carbohydrate Chemistry* 17 (Eds Whistler R L and Be Miller, J N) Academic Press New York.
- Hill, G. D. 1986. Recent developments in the use of lupins in animal and human nutrition. In: *Proceeding of the IV International lupin conference*. Geraldton, Western Australia, (pp: 40-61).
- Hill, G. D. 1990. The utilization of lupin in animal nutrition. In *Proceedings of the 6th International Lupin Conference*, Temuco, Pucon, Chile.
- Hinojosa, G., and A. Torrico. 1990. Utilization and commercialization of "Tarwi". In

Proceedings of the 6th International Lupin Conference, Temuco, Pucon, Chile.

Huisman, J. and G.H. Tolman. 1992. Antinutritional factors in the plant proteins of diets for non ruminants. In: Recent Advances in Animal Nutrition. Garnsworthy, P.C., H. Haresing and D.J.A. Cole (Eds.). Butterworth Heinemann. U.K. (pp 3-31).

Huisman, J. and G.H. Tolman. 2001. Antinutritional factors in the plant proteins of diets for non-ruminants. In: P.C Garnsworthy and J. Wiseman (Eds.). Recent Developments in Pig Nutrition 3. Nottingham University Press, Nottingham, UK. 261-322.

Huisman, J., T. F. B. van der Poel y I. E. Liener. 1989. Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds. Proceedings of the Firts International Workshop on Antinutritional Factors (ANF) in Legume Seeds, Wageningen, The Netherlands November 23-25, 1988. Pudoc Wageningen, Netherlands. (pp: 4-5).

Hutton, K. y P. D. Foxcroft. 1975. Effect of processing temperature on some indices of nutritional significance for micronized soya beans. Proceedings of the Nutrition Society (2): 34-49.

Jamalian, J. 1999. Removal of favism-inducing factors vicine and convicine and the associated effects on the proteincontent and digestibility of fababeans (*Vicia faba* L.). Journal of the Science of Food and Agriculture 79: 1909-1914.

Janardhanan, K., V. Vadivel y M. Pugalenth. 2003. Biodiversity in Indian under-exploited/tribal pulses. In: Improvement strategies for Leguminosae Biotechnology (editors: Jaiwal P. K. and R. P. Singh), Kluwer Academic Publishers, Britain. (pp: 353-405).

Jezierny, D. 2009. In vivo and in vitro studies with growing pigs on standardised ileal amino acid digestibilities in grain legumes. Ph.D. Thesis. University of Hohenheim, Stuttgart, Cuvillier Verlag Göttingen, Germany.

Jimenez-Martínez, C., H. Hernández-Sánchez, G. Álvarez-Manilla, N. Robledo-Quintos, J. Martínez-Herrera and G. Dávila-Ortiz. 2001. Effect of aqueous and alkaline termal treatments on chemical composition and oligosaccharide, alkaloid and tannin contents of *Lupinus campestris* seeds. Journal of the Science of Food and Agriculture 81: 421-428.

Jiménez-Martínez, C., H. Hernández-Sanchez and G. Dávila-Ortiz. 2003. Production of a yogurth-like product from *Lupinus campestris* seeds. Journal of the Science of Food and Agriculture 83: 515-522.

Jiménez-Martínez, C. y Dávila-Ortíz, G. 2006. Elaboración de un producto tipo

botanaa base de harina de trigo fortificada con aislado proteico de *Lupinus mutabilis*. Alfa Editores técnicos, pp: 12-20.

Jiménez-Martínez, C., H. Hernández-Sánchez, and G. Dávila-Ortiz. 2007. Diminution of quinolizidine alkaloids, oligosaccharides and phenolic compounds from two species and soybean seeds by the effect of *Rhizopus aligosporus*. Journal of the Science of Food and Agriculture 87: 1315-1322.

Jiménez-Martínez, C., A. Cardador Martínez, A. L. Martínez Ayala, M. Muzquiz, M. Martín Pedrosa, and G. Dávila-Ortiz. 2012. Changes in Protein, Nonnutritional Factors, and Antioxidant Capacity during Germination of *L. campestris* Seeds. Article ID 387407, 7 pages.

Johnson S.K., V. Chua, R.S. Hall and A.L. Baxter. 2006. Lupin kernel fibre foods improve bowel function and beneficially modify some putative faecal risk factors for colon cancer in men. British Journal of Nutrition 95 (2): pp .372-378.

Jood, S., S. Bishnoi., and S. Sehgal. 1998. Effect of processing on nutritional and antinutritional factors of moongbean cultivars. Journal of Food Biochemistry 22(3): 245-257.

Jurado, C. 1989. Toxicología Veterinaria. (2ª ed.), Salvat, Barcelona.

Kadam, S. S., S. S. Deshpande and N. D. Jambhale. 1989. Seed structure and composition. Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology, and Utilitation. Vol. I. Salunkhe, D.K., Kadam, S.S. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, EEUU, (pp:23-50).

Kadlec, P., J. Dostalova, M. Zatopkova, M. Houska and J. Strohaln. 2004. The shelf life of germinated grain legume seeds treated by high pressure. En: 5th European Conference on Grain Legumes, Abstracts of posters no. 73.

Kakade, M., J. Rackis, J. McGhee and G. Puski. 1974. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure. Cereal Chemistry 51: 376-382.

Katagiri Y., Ibrahim R. K. and Tahara S. 2000. HPLC analysis of white lupin isoflavonoids. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 64: 1118-1215.

Kelly, J. F. 1975. Increasing protein in quantity and quality. In Nutritional Improvement of Food Legumes by Breeding (M. Milner. Ed). Wiley New York, (pp: 179-184).

Khattab, R., S. Arntfield and C. Nyachoti. 2009. Nutritional quality of legume seeds as

affected by some physical treatments, Part 1: Protein quality evaluation. *LWT-Food Science and Technology* 42: 1107-1112.

Kim, J.C., J. R. Pluske and B. P. Mullan. 2007. Lupins as a protein source in pig diets. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 2. CABI, Wallingford, pp: 1-12.

Krishnan, H. B. 2000. Biochemistry and molecular biology of soybean seed storage proteins. *Journal of New Seeds* 2: 1-25

Kubo, H., M. Inoue, J. Kamei and K. Higashiyama. 2006. Hypoglycemic effect of multiflorine derivatives in normal mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29: 2046-2050.

Kumar, R. and J. P. F. D'Mello. 1995. Anti-nutritional factors in forage legumes. In: *Tropical Legumes in Animal Nutrition*. D'Mello, J.P.F. and C. Devendra (Eds.). CAB International. U.K. (pp: 95-133).

Kyle, W.S.A. 1995. *The Current and Potential Uses of Lupins for Human Food*. Department of Food Technology, Victoria University.

Lagunes-Espinoza L. C., C. Huyghe, J. Papineau, and D. Pacault. 1999. Effect of genotype and environment on pod wall proportion in Whitelupin: consequences to seed yield. *Australian Journal of Agricultural Research* 50: 575-82.

Lagunes-Espinoza, L. C., J. López-Upton, E. García-López, J. Jasso-Mata, A. Delgado-Alvarado, y G. García de los Santos. 2012. Diversidad morfológica y concentración de proteína de *Lupinus* spp. en la región centro-oriental del estado de Puebla, México. *Acta Botánica Mexicana* 99: 73-90.

Lallès, J.P., Jansman, A.J.M., 1998. Recent progress in the understanding of the mode of action and effects of antinutritional factors from legume seeds in non-ruminant farm animals. In: Jansman, A.J.M., Hill, G.D., Huisman, J., van der Poel, A.F.B. (Eds.), *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Rapeseed*. Proceedings of the Third International Workshop, Wageningen, The Netherlands, July 8-10, 1998. Centre for Agricultural Publishing and Documentation (PUDOC), Wageningen, (pp: 219-232).

Lampart-Szczapa, E. 2001. Chemical and functional properties of food proteins. (Z. E. Sikorski, Ed.) Boca Raton, Florida, United States of America: CRC Press.

Lampart-szczapa, E., J. Korczak, M. Nogala-Kalucka and R. Zawirska-Wojtasiak. 2003. Antioxidant properties of lupin seed products. *Food chemistry* 83: 279-285.

Lee, C. H. 1986. Lupin seed for human consumption. Proceedings of the 4th International Lupin conference. Geraldton, Western Australia, pp: 64-76.

Lee, Y.P., T. Mori, S. Sipsas, A. Barden, I. Puddey, V. Burke, R. Hall and J. Hodgson. 2006. Lupin enriched bread increases satiety and reduces energy intake acutely. American Journal of Clinical Nutrition 84: pp. 975-980.

Liener, I. E. 1976. Legume toxins in relation to protein digestibility A-Review. Journal of Food Science 41: 1076.

Liener, I. E. 1989. Antinutritional factors in legume seeds: state of the art. In: Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds. Proceedings of the First International Workshop on 'Antinutritional Factors (ANF) in Legume Seeds', Wageningen, The Netherlands November 23-25, 1988. Huisman, J., T.F.B. van der Poel and I.E. Liener (Editors). Pudoc Wageningen, Netherlands. (pp: 6-13).

Lopez-Bellido, L. 1993. The role of legumes crop in sustainable agriculture. The case of lupine. Advances in Lupin Research. Agronomy and production (pp: 272-289).

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193: 265-275.

Lucas, B., A. Guerrero, L. Sigales and A. Sotelo. 1988. True protein content and non protein amino acids present in legumes seeds. Nutrition Reports International 37: 545-553.

Lucas, B. y A. Sotelo. 1982. Amino acid determination in pure protein, foods and feeds using two different acid hydrolysis methods. Analytical Biochemistry 123: 349-356.

Lucisano M. and C. Pompei. 1981. Baking properties of lupin flour. Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie 14: 323-330.

Magni, C., F. Sessa, E. Accardo, M. Vanoni, P. Morazzoni, A. Scarafoni and M. Duranti. 2004. Conglutin  $\gamma$ , a lupin seed protein, binds insulin in vitro and reduces plasma glucose levels of hyperglycemic rats. Journal of Nutritional Biochemistry 15: 646-650.

Mahadevamma, S. and Tharanathan, R. N. 2004. Processing of legumes: resistant starch and dietary fiber contents. Journal of Food Quality 27 (4): 289-303.

- Mahajan, A. and S. Dua. 1997. Nonchemical approach for reducing antinutritional factors in rapeseed (*Brassica campestris* Var. Toria) and characterization of enzyme phytase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 2504-2508.
- Makkar, H.P.S., Blummel, M., Borowy, N.K., Becker, K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture* 61: 161-165.
- Mariscal-Landín, G., Y. Lebreton and B. Sève. 2002. Apparent and standardised true ileal digestibility of protein and amino acids from faba bean, lupin and pea, provided as whole seeds, dehulled or extruded in pig diets. *Animal Feed Science and Technology* 97: 183-198.
- Martínez H.J. y M.A. Zulet. 2000. *Alimentos: Composición y Propiedades*. McGraw Hill Interamericana de España, S. A., 7: 155-168.
- Martínez-Villaluenga, C., J. Frías and C. Vidal-Valverde. 2006. Functional lupin seeds *Lupinus albus* L. and *Lupinus luteus* L. after extraction of  $\alpha$ -galactosides. *Food Chemistry* 98: 291-299.
- Martins, J.M., M. Riottot, M. J. Viegas-Crespo, J. A. Lança, J.B. Freire and O.P. Bento. 2005. Cholesterol-lowering effects of dietary blue lupin (*Lupinus angustifolius* L.) in intact and ileorectal anastomosed pigs. *Journal of Lipid Research*,46: 1539-1547.
- McGinnis, J. 1990. Use of lupin in poultry nutrition. In: VI International lupine Conference. Pucón. Chile, 3p.
- Msika, P., A. Piccirilli and N. Piccardi. 2006. Use of a cosmetic of pharmaceutical composition, comprising a lupeol-rich extract as an active ingredient for stimulating the synthesis of heat shock proteins. Patent USPTO #: 20060216249-Class: 424058000.
- Msika, P., P. Rancurel and M.G. Montaudoin. 2000. Antioxidant and/or antielastase composition based on lupine oil. US Patent # 6146616.
- Moore S. and W.H. Stein. 1954. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of aminoacids and related compounds. *Journal of Biological Chemistry* 211: 907-913.
- Moure, A. J. S., H. Domínguez and J. C. Parajó. 2006. Functionally of oil seed protein products: A review. *Food Research International* 39: 945-963.
- Mubarak, A. E. 2005. Nutritional composition and antinutritional factors of mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes. *Food Chemistry* 89: 489-495.

Murray, J. 1987. Unlocking new product opportunities with infra-red processing. 23-25 September. Paper given at Food Plants/87, Chicago, IL.

Muzquiz, M., C. Cuadrado, G. Ayet, C. De la Cuadra, C. Burbano, A. Osagie. 1993. Variation of alkaloid components of lupin seeds in 49 genotypes of *Lupinus albus* L. from different countries and locations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 1447-1450.

Muzquiz, M., C. de la Cuadra, C. Cuadrado, C. Burbano and R. Calvo. 1994. Herbicide-like effect of *Lupinus* alkaloids. *Industrial Crops and Products*, 2: 273-280.

Muzquiz, M., G. D. Hill, C. Cuadrado, M. M. Pedrosa and C. Burbano. 2004. Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds. EAAP publication, Wageningen, The Netherlands.

Muzquiz, M., M. Pedrosa, A. Varela, E. Guillamón, C. Goyoaga, C. Cuadrado and C. Burbano. 2006. Factores no-nutritivos en Fuentes Proteicas de Origen Vegetal. Su Implicación en Nutrición y Salud. *Brazilian Journal of Food Technology* pp:93-96.

Nikiema, J.B., R. Vanhaelen-Fastre, M. Vanhaelen, J. Fontaine, C. DeGraef and M. Heenen. 2001. Effects of anti-inflammatory triterpenes isolated from *Leptadenia hastata* latex on Keratinocyte proliferation. *Phytotherapy Research* 15: 131-134.

Nonogaki H., G.w. Bassel and J. Derek B. 2010. Germination-still a mystery. *Plant Science* 170: 574-581.

Norton, G. 1991. Proteinase inhibitors. In D' Mello, J. P. F., C. M. Duffus and J. H. Duffus (Eds.), *Toxic substances in crop plants* (pp. 68-106). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

Nowicka, G., L. Klosiewicz-Latoszek, C. R. Sirtori, A. Arnoldi and M. Naruszewicz. 2006. Lupin proteins in the treatment of hypercholesterolemia. *Atherosclerosis Supplements* 7: 477-477.

Nyirenda, D., M. Musukwa and L. O. Jonsson. 2003. The effects of different processing methods of velvet bean (*Mucuna pruriens*) on L-dopa content, proximate composition and broiler chicken performance. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 1: 253-260.

Obendorf, R. L. 1997. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Science Research* 7: 63-74.

Ogunwolu, S. O., F. O. Henshaw, H.-P. Mock, A. Santos and S. O. Awonorin. 2009. Functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew

(*Anacardium occidentale* L.) nut. Food Chemistry 115: 852-858.

Ologhobo, A.D., D.F. Apata and A. Oyejide. 1993. Utilization of raw jackbean (*Canavalia ensiformis*) and jackbean fractions in diets for broiler chicks. British Poultry Science 34: 323-337.

Ortiz, J.G.F. and K.D.C. Mukherjee. 1982. Extraction of alkaloids and oil from bitter lupin seed. Journal of the American Oil Chemists' Society 59: 241-244.

Pablo-Perez, M. 2013. Caracterización del valor nutritivo de cinco especies de leguminosas del género *Lupinus*. Tesis Colegio de Postgraduados, 3: 53p.

Pastuszezwska, B., M. Vitjazkova, E. Swiech and M. Taciak. 2004. Composition and *in vitro* digestibility of raw versus cooked white and colour flowered peas. Nahrung/Food 48: 221-225.

Petterson, D.S., S. Sipsas and J.B. Mackintosh. 1997. The chemical composition and nutritive value of Australian grain legumes, (2<sup>nd</sup> Edn.), Grains Research and Development Corporation, Canberra, Australia.

Petterson, D.S. and G.B. Crosbie. 1990. Potential of lupins as food for humans. Food Australia 42: 266-8.

Petterson, D.S. 2000. The use of lupins in feeding systems review. Asian-Australian Journal of Animal Science 13: 861-882.

Pilvi, T.K., T. Jauhiainen, Z.J. Cheng, E. M. Mervaala, H. Vapaatalo and R. Korpela. 2006. Lupin protein attenuates the development of hypertension and normalises the vascular function of NaCl loaded Goto-Kakizaki rats. Journal Physiological Pharmacology 57: 167- 176.

Porter, L. J., L. N. Hrstich and B. G. Chan. 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. Phytochemistry 25: 223-230.

Price M. L., A. E. Hagerman and L. G. Butler. 1980. Tannin content of cow pea, chick peas, pigeon peas and mung beans. Journal of Agricultural and Food Chemistry 28:459-461.

Prodanov, M., I. Sierra and C. Vidal-Valverde. 2004. Influence of soaking and cooking on the thiamin, riboflavin and niacin contents of legumes. Food Chemistry 84: 271-277.

Rakic, S., Petrovic, S., Kukic, J., Jadranin, M., Tesevic, V., Povrenovic, D. 2007. Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of



oak acorns from Serbia. Food Chemistry 104: 830–834.

Rapp, W. 2009. Invasive Plant Management in Glacier Bay National Preserve: Summer 2009 Field Season Report. Glacier Bay National Preserve, National Park Service, U.S. Department of the Interior. Gustavus, AK. 164 p. Sitio web:[http://www.nps.gov/glba/naturescience/upload/Rapp\\_2009\\_GLBA\\_Invasive\\_Report\\_small.pdf](http://www.nps.gov/glba/naturescience/upload/Rapp_2009_GLBA_Invasive_Report_small.pdf)

Reddy, N.R., C. V. Balakrishnan and O.K. Salunkhe. 1978. Phytate phosphorus and mineral changes during germination and cooking of black gram (*Phaseolus mungo*) seeds. Journal of Food Science 43: 540- 543.

Reddy, N. R., M. D. Pierson, S. K. Sathe and D. K. Salunkhe. 1985. Dry bean tannins a review of nutritional implications. Journal of the American Oil Chemists Society 62: 541–549.

Rehman, Z. and W. H. Shah. 2005. Thermal heat processing effects on anti-nutrients, protein and starch digestibility of food legumes. Food Chemistry 91: 327–331.

Rodríguez–Ambriz, S. L., A. L. Martínez–Ayala, F. Millán and G. Dávila–Ortiz. 2005. Composition and functional properties of *Lupinus campestris* protein isolates. Plant Foods for Human Nutrition 60: 99–107.

Roth-Maier, D.A. and B.R. Paulicks. 2004. Nutritive value and use of blue and yellow lupin (*Lupinus angustifolius* L. and *Lupinus luteus* L.) in the feeding of pigs./Ermittlung des Futterwertes und Einsatz von blauen und gelben Lupinen (*Lupinus angustifolius* L. und *Lupinus luteus* L.) bei Schweinen. In: Rapsextraktionsschrot und Körnerleguminosen in der Geflügel- und Schweinefütterung. UFOP-Schriften 24: 73–94 (in German).

Ruiz, L.M.A., S. J. Casas, K. Gulewicz, A. S. C. Reyes y L. P. M. Garcia. 2007. Efecto prebiótico de oligosacáridos obtenidos de *Lupinus exaltatus* (leguminosa) en prevención de salmonela. IX Congreso de ciencia de los alimentos y V foro de ciencia y tecnología de alimentos, pp: 444-449.

Ruiz, L. M, R. R. Macias y N. S. Pérez. 2006. Evaluación químico nutricional de *Lupinus exaltatus* Zucc, del Nevado de Colima México, como fuente potencial de forraje. Interciencia 31: 758-761.

Ruiz, M. A. and A. Sotelo. 2001. Chemical composition, nutritive value, and toxicology evaluation of Mexican wild lupin. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 5336-5339.

Ruiz-López, M. A., P. M. García-López, H. Castañeda-Vazquez, J. Zamora N. J., P.

Garzón de la Mora, J. Bañuelos Pineda, C. Burbano, M.M. Pedrosa, C. Cuadrado, and M. Muzquiz. 2000. Chemical composition and antinutrient content of three *Lupinus* species from Jalisco, Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis* 13(3): 193-199.

Ruiz-López, M.A., M.R. Rodríguez y S. Navarro P. 2006. Evaluación química nutricional de *Lupinus exaltatus* Zucc., del Nevado de Colima, México, como fuente potencial de forraje. *Interciencia* 31(10): 758-761.

Ruiz-Moreno, J. J., M. A. Ruiz-López and J. F. Zamora-Natera. 2000. The genus *Lupinus*: taxonomy and distribution in Jalisco, Mexico. In: van Santen, E., M. Wink, S. Weissman y P. Roemer (eds.). *Lupin an ancient crop for the new millennium. Proceedings of the 9th International Lupin Conference. 20-24 June, 1999. Klink, Alemania. (pp: 297-300).*

Saleem, M., F. Afaq, V. M. Adhami and H. Mukhtar. 2004. Lupeol modulates NF- $\kappa$ B and P13K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene* 23: 5203-5214.

Sandberg, A. S. and T. Andlid. 2002. Phytogenic and microbial phytases in human nutrition. *International Journal of Food Science and Technology* 37: 823-833.

Sas-Piotrowska, B., T. Aniszewski and K. Gulewicz. 1997. Evidence for fungistatic activity of some preparations from alkaloid-rich lupin seeds on potato pathogenic fungi. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences Biological Sciences* 44:1-2:41-47.

Sanchez, M., P. Altares, M. Pedrosa, C. Burbano, C. Cuadrado, C. Goyoaga, M. Muzquiz, C. Jimenez, and G. Dávila. 2005. Alkaloid variation during germination in different lupin species. *Food Chemistry* 90: 347-355.

Sangronis, E., M. Rodriguez, R. Cava, and A. Torres. 2006. Protein quality of germinated *Phaseolus vulgaris*. *European Food Research and Technology* 222: 144-148.

Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 12: 387-388.

Schmeller, T. and M. Wink. 1998. Utilization of alkaloids in modern medicine. In: Roberts M.F., Wink, M. (Eds.). *Alkaloids. Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications. Plenum Press, USA(pp. 435-459).*

Seena, S., K. R. Sridhar and K. Jung. 2005. Nutritional and antinutritional evaluation of raw and processed seeds of a wild legume, *Canavalia cathartica* of coastal sand dunes of India. *Food Chemistry* 92: 465-72.

Seena S., K. R. Sridhar, A. B. Arun, C. C. Young. 2006. Effect of roasting and pressure-

cooking on nutritional and protein quality of seeds of mangrove legume *Canavalia cathartica* from southwest coast of India. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 284-93.

Serrano J. y I. Goñi. 2004. Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población Guatemalteca. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 54(1):1-21.

Siddhuraju, P., K. Vijayadumari, and K. Janardhaan. 1996. Chemical Composition and protein quality of the little known legume, velvet bean (*Mucuna puriens*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 2636-2641.

Siger, A., J. Czubinski, P. Kachlicki, K. Dwiecki, E. Lampart-Szczapaa and M. Nogala-Kalucka. 2012. Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species. *Journal of Food Composition and Analysis* 25: 190-197.

Skerget M., P. Kotnik, M. Hadolin, A. R. Hras, M. Simoncic and Z. Knez. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry* 89:191-198.

Smith, A. K., and S. J. Circle. 1972. Soybeans: Chemistry and Technology. Vol 1, Proteins. Avi: Westport, Conn.

Smith S.C., R. Choy, S.K. Johnson, R.S. Hall, A.C.M. Wildeboer-Veloo and G. W. Welling. 2006. Lupin kernel fibre consumption modifies fecal microbiota in healthy men as determined by rRNA gene fluorescent in situ hybridization. *European Journal of Nutrition* 45: 335-41.

Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* 195: 19-23.

Sousa, S. M. y A. Delgado S. 1998. Leguminosas mexicanas: fitogeografía, endemismo y orígenes. In: Ramamoorthy, T. P., R. Bye, A. Lot y J. Fa (comp.). *Diversidad biológica de México: orígenes y distribución*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., México. Pp: 449-500.

Spielmann, J., A. Shukla, C. Brandsch, F. Hirche, G.I. Stangl and K. Eder. 2007. Dietary lupin protein lowers triglyceride concentrations in liver and plasma in rats by reducing hepatic gene expression of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Annals of Nutrition and Metabolism* 51: 387-392.

Sreerama Y. N., V. B. Sashikala and V. M. Pratapa. 2009. Effect of enzyme pre-dehulling treatments on dehulling and cooking properties of legumes. *Journal of Food Engineering* 92(4): 389-395.

Sreevidya, N. y S. Mehrotra. 2003. Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. *Journal of AOAC International*, 86(6): 1124-1127.

Stryer, L. 1988. *Bioquímica*, 3ª edición. Ed. Reverte, S. A. Barcelona España. (Pp: 145-288).

Sujak, A., A. Kotlarz y W. Strobel. 2006. Compositional and nutritional evaluation of several lupin seeds. *Food Chemistry* 98:711-719.

Summerfield, R. J. and A. H. Bunting. 1980. *Advances in legume science. Breeding Legumes for nutritional quality*. University of Reading, England. 179p.

Szczawinska, K., K. Bobkiewicz, K. Ko- zaryn, M. Peretiatkowicz and K. Gu- lewicz. 1994. Some pharmacological properties of an extract from bitter Lupin (*L. angustifolius*) seeds. In: Neves-Martin, J.M., Beirão da Costa, M. L. (Eds.), *Advances in Lupin Research. Proceeding of the VII th International Lupin Conference, 18-23 april 1993, Évora, Portugal* pp: 297-300.

Tapia, M. 1982. Proceso Agroindustrial del Tarwi (*Lupinus mutabilis*). En II Conferencia Internacional del Lupino, Torremolinos, España, pp: 58-62.

Tharanathan, R. N. and S. Mahadevamma. 2003. Grain legumes a boon to human nutrition. *Trends in Food Science and Technology* 14: 507-518.

Tizazu, H. and A. S. Emire. 2010. Chemical composition, physicochemical and functional properties of lupin seeds grown in Ethiopia. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development* 10(8): 3029-3046.

Torija, M. E. and C. Díez. 1999. Legumbres. En: *Tratado de nutrición*, Hernández M., Sastre A. (Ed.), Ediciones Díaz de Santos, Madrid, España, pp: 425-429.

Torres, T. F., A. Nagata and S. W. Dreifuss. 1980. Métodos de eliminación de alcaloides en la semilla de *Lupinus mutabilis*, Sweet. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 30:200-209.

Trugo, L.C. 1993. Effect of germination on nutritive value of lupin seeds. In *Abstracts of the VII international lupin conference*, Portugal: Evora.

Tucek, M. 2006. Use of lupin bran in high-fibre food products. Patent No. WO/2006/133492. PCT/AU2006/000821. IPC A23L 1/20 (2006.01), A23J 1/12 (2006.01), A23K 1/14 (2006.01), B02B 3/14 (2006.01).

Udensi, E. A., F. C. Ekwu and J. N. Isinguzo. 2007. Antinutrient factors of vegetable

cowpea (*Sesquipedalis*) seeds during thermal processing. *Pakistan Journal of Nutrition* 6: 194-197.

Van Barneveld, R. J. 1999. Understanding the nutritional chemistry of lupin (*Lupinus* spp.) seed to improve livestock production efficiency. *Nutrition Research Reviews* 12: 203-230.

Van der Poel, A.F.B., S. Gravendeel, D. J. van Kleef, A. J. M. Jansman and B. Kemp. 1992. Tannin containing faba beans (*Vicia faba* L.): effects of methods of processing on ileal digestibility of protein and starch for growing pigs. *Animal Feed Science and Technology* 36: 205-214.

Varasundharosoth, D. and F. M. Barnes. 1985. Protein fractions of lupin seed meal: Quantitative importance and amino acid composition, *New Zealand Journal of Agricultural Research* 28(1): 71-80.

Viana, P. A., S. T. de Rezende, D. L. Falkoski, T. Leite, I. C. Jose and M. A. Moreira. 2007. Hydrolysis of oligosaccharides in soy bean products by *Debaryomyces hansenii* UFV-1  $\alpha$ -galactosidases. *Food Chemistry* 103: 331-337.

Vidal-Valverde, C., J. I. FriasEstrella, M. J. Gorospe, R. Ruiz and J. Bacon. 1994. Effect of processing on some antinutritional factors of lentils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 42: 2291-2295.

Villacrés E, C. Caicedo and E. Peralta. 1998. *Disfrute cocinando con chocho*. Quito-Ecuador: PRONALEG, 48p.

Villavicencio, M. A. y B. E. Pérez-Escandón. 1998. Lista florística del Estado de Hidalgo. Recopilación bibliográfica. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca, Hidalgo (147 p).

Von Baer, D. 1990. International Lupin Association. *Proceedings of the 6th International Lupin Conference*, Nov. 25-30, Temuco-Pucon, Chile, Asociación Chilena del Lupino, Temuco, Chile. 406p.

von Baer, D., E. von Baer, U. Hashagen, R. Ibañez, L. Lamperti, M. Morales, E. Ross, P. Puentes y I. Perez. 1992. Proyecto FDP-CORFO "Normas de Calidad de Lupino": Resultados de cosechas 1989, 1990, 1991 y conclusiones finales. En: 1ª Conferencia Nacional del Lupino. Temuco, Chile (pp: 65-75).

von Baer, D., M. Marivil, E. von Baer, U. Hashagen y R. Ibañez. 1997. Alcaloides en semilla de híbridos de *Lupinus angustifolius* dulce y amargo. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, N° 629.

- Walker, A. F., and N. Ochha. 1982. Effect of processing including domestic cooking on nutritional quality of legumes. *Proceedings of the Nutrition Society* 4(1): 41-56.
- Wang, S. and J. Clements. 2008. Antioxidant activities of lupin seeds. In: Palta, J.A., Berger, J.B. (Eds.), *Lupins for Health and Wealth, Proceedings of the 12th International Lupin Conference*. 14-18 September 2008, Fremantle, Western Australia. International Lupin Association, Canterbury, New Zealand.
- Wang, S.F., A. Liu, T. J. Ridsdill-Smith and E. L. Ghisalberti. 2000. Role of alkaloids in resistance of yellow Lupin to red-legged earth mite. *Holotydeus destructor*. *Journal of Chemical Ecology* 26: 429-441.
- Wang, T. L., C. Domoney, C. L. Hedley, R. Casey and M. A. Grusak. 2003. Can we improve the nutritional quality of legume seeds? *Plant Physiology* 131: 886-891.
- Wanjekeche, E., V. Wakasa and J. G. Mureithi. 2003. Effect of germination, alkaline and acid soaking and boiling on the nutritional value of mature and immature *Mucuna* (*Mucuna pruriens*) beans. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 1: 183-192.
- Watson, R.E.B., S.P. Long, J.J. Bowden, J.Y. Bastrilles, S. P. Barton and C.E.M. Griffiths. 2008. Repair of photoaged dermal matrix by topical application of a cosmetic antiageing product. *British Journal of Dermatology* 15: 472-477.
- Welsh, S. 1974. *Anderson's Flora of Alaska and Adjacent Parts of Canada*. Brigham Young University Press. Provo, UT. 269-274 p.
- Wink, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64:3-19.
- Wink, M. and P. Mende. 1987. Uptake of lupanine by alkaloid-storing epidermal cells of *Lupinus polyphyllus*. *Planta Medica* 53: 465-469.
- Wink, M. 1991. Plant Breeding : High or low alkaloid levels. *Proc. 6<sup>th</sup> International Lupin Conference* Temuco, pp 326 - 334.
- Wink, M., and T. Twardowski. 1992. Allelo chemical properties of alkaloids. Effects on plants, bacteria and protein biosynthesis. In S. J. H. Rizvi y V. Rizvi (Eds.), *Allelopathy. Basic and Applied Aspects* (pp. 129-150). London: Chapman and Hall.
- Wink, M., and Witte, L. 1984. Turnover and transport of quinolizidine alkaloids. Diurnal fluctuations of lupanine in the phloem, sap, leaves and fruits of *Lupinus albus* L. *Planta Medica* 161: 519-524.

Wink, M., M. Roberts, 1998. Alkaloids. Biochemistry, ecology, and medicinal applications. Plenum.

Wink, M. 1994. Biological activities and potential application of lupin alkaloids. In J. M. Neves-Martins and M. L. Beirao da Costa (Eds.), *Advances in lupin research* (pp. 161-178). Lisboa: Instituto Superior de Agronomía (ISA press).

Wink, M., C. Meißner, L. Witte. 1995. Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. *Phytochemistry* 38:139-153.

Wink, M. 1988. Plant breeding: Importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics* 75: 225-233.

Wolko, B., J.C. Clements, B. Naganowska, M. N. Nelson and H. Yang. 2011. *Lupinus*. In: Kole, C. (Ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Legume Crops and Forages*. Springer, Berlin(pp. 153-206).

Yemm, E. W. and A. J. Willis. 1954. The Estimation of Carbohydrates in Plant Extracts by Anthrone. *Biochemical Journal* 57(3): 508-514.

Yoshie-stark, Y. and A. Wäsche. 2004. In vitro binding of bile acids by lupin protein isolates and their hydrolysates. *Food Chemistry* 88(2): 179-184.

Yoshie-Stark, Y., J. Bez and A. Wäsche. 2006. Effect of different pasteurization conditions on bioactivities of *Lupinus albus* protein isolates. *LWT-Food Science and Technology* 39:118-123.

Yu, R. 1988. Incorporation of lupin into human foods. In: *Proceedings of the Food Conference 88*. (Ed.) Saipin Maneepur, Pivan Varangoon and Budan Phithakpol. Bangkok, Institute of Food Research and Product Development, Kaselsart University, Thailand. Pp: 24-26.

Zamora N.J. F., A. Bernal, M. A. Ruiz-López, M. Soto-Hernandez y A. E. Escalante. 2005. Inhibición del crecimiento micelial de hongos fitopatogenos in vitro con lupanina y un extracto alcaloideo obtenido de semillas de *Lupinus exaltatus* Zucc. (Fabacea). *Revista Mexicana de Fitopatología* 23(2): 124-129.

Zamora-Natera, F., P. García-López, M. Ruíz-López, y E. Salcedo-Perez. 2009. Composición de alcaloides en semillas de *Lupinus mexicanus* (fabaceae) y evaluación antifúngica y alelopática del extracto alcaloideo. *Agrociencia* 42: 185- 192.

Zohary, D. and M. Hopf. 2000. *Domestication of Plants in the Old World*. New York, United States. Pp: 112-116.

## 10. ANEXOS

**Anexo 1.** Análisis químico proximal aplicados a las semillas de acuerdo a la AOAC 1990.

### **Materia seca (MS) y humedad**

Para la determinación de la materia seca (MS) y la humedad se utilizó la metodología de AOAC (1990). Se tomaron al azar tres grupos de semillas por especie, considerando cada grupo como una repetición.

Enseguida se registró el peso en fresco de cada grupo de semillas; los cuales se colocaron en cajas petri y se introdujeron en la estufa de aire forzado marca ShellLab modelo CE3F a 60°C por 72 h. Al término, las muestras se colocaron en un desecador para que alcanzaran la temperatura ambiente; se registró el peso seco de cada muestra, y por diferencia de peso se obtuvo el porcentaje de humedad y MS, de acuerdo a la fórmula:

$$\% \text{ humedad} = \frac{\text{peso de muestra húmeda} - \text{peso de muestra seca}}{\text{peso de muestra húmeda}} \times 100$$

### **Proteína cruda (PC)**

Se determinó a partir del análisis de Nitrógeno total multiplicándolo por el factor 6.25 de acuerdo con la metodología establecida por la AOAC (1990). El Nitrógeno total se cuantificó mediante el método de Micro-Kjeldahl. Se pesaron por triplicado 0.3 g de material molido de cada componente de la planta por especie, incluyendo una muestra estándar de concentración conocida de Nitrógeno total como referencia. Estas se colocaron en tubos de ensaye donde se adicionaron 3 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y 1g de mezcla catalizadora (93g sulfato de potasio (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) + 7g sulfato de cobre (Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)). Todo se homogenizó en vortex. Posteriormente se procedió a la digestión de las muestras en block digester Tecator hasta alcanzar una temperatura de 360°C, por 4 h de digestión para que las muestras en ebullición tornaran a un color azul-verde claro cristalino. Las muestras digeridas se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se destilaron en un equipo Labconco modelo 200830 EE.UU., agregándoles 10 mL de hidróxido de sodio 0.102040816 N y recuperándose en matraces que contenían 6 ml de ácido bórico al 4%. Estos fueron titulados con ácido clorhídrico valorado a 0.1N formando por cada equivalente de boro-amoniaco, un equivalente de sulfato-amoniaco (sulfato de amonio), en donde un ml de ácido clorhídrico neutraliza 0.014 g de nitrógeno en forma de ión amonio. Los cálculos para la determinación del porcentaje de Nitrógeno total Microkjeldhal son:

$$\%NT = \frac{(GHCL - GHCL \text{ Blanco})(NHCL)(1.4) \times 6.25}{\text{peso de la muestra}}$$



Dónde:

NT= Nitrógeno total

GHCL= Gasto ácido clorhídrico

GHCL Blanco= Gasto ácido clorhídrico Blanco

NHCL= Normalidad del ácido clorhídrico

1.4= Factor de ajuste para Nitrógeno (0.014 miliequivalentes multiplicado por 100).

### **Grasa (extracto etéreo, EE)**

El contenido de grasa se determinó mediante la técnica descrita por AOAC (1990). Se pesaron por triplicado 1.5 g de muestra de cada especie y se colocaron en un papel filtro dentro de un dedal que se fijó en los porta dedales del equipo de extracción marca Goldfish modelo TE-044-8/50 Brasil. Se agregaron 40 mL de éter de petróleo a los vasos del equipo (los vasos fueron previamente secados a 65°C por 12 horas y se registró el peso de cada uno). Estos se fijaron al condensador y se dejaron extraer durante 4 h a una temperatura constante de 125°C. Finalizado el tiempo de extracción, los vasos se colocaron en una estufa a 65°C durante 30 minutos para liberar residuos de éter de petróleo. Después de este tiempo se colocaron en un desecador para que se enfriaran a temperatura ambiente y se pesaron nuevamente. Se calculó el porcentaje de extracto etéreo en base seca utilizando la siguiente ecuación.

$$\%EE(\text{base seca}) = \frac{\text{peso de vaso con residuo} - \text{peso de vaso vacío}}{\text{g de muestra}} \times 100$$

### **Fibra Detergente Neutro (FDN)**

Se pesaron por duplicado 0.4 g de cada muestra, agregándoseles soluciones detergente neutro para romper las paredes celulares y determinar FDN.

Las muestras se colocaron en bolsas de nylon (4 cm de ancho x 8 cm de largo) en el equipo para determinar fibras marca TECNAL modelo TEC-149. En el equipo, a las muestras se les agregaron 50 mL de una solución neutra que contenía 30 g de Lauril sulfato de sodio, 18.61 g de EDTA, 4.56 g de fosfato ácido disódico, 6.81 g de Tetraborato de sodio y 10 mL de Etilen glicol, ajustada a pH 7, y se dejaron en reflujo durante una hora. Transcurrido el tiempo de reflujo, las muestras se lavaron con abundante agua para eliminar completamente la solución detergente. Estas se secaron a 65°C en una estufa de aire forzado hasta obtener peso constante, finalmente se colocaron en un desecador y se pesaron. El rendimiento de la fibra detergente neutro recuperado se expresó como porcentaje de constituyente de la pared celular (CPC ó FDN), utilizando la siguiente fórmula:

$$FDN = \frac{\text{peso bolsa + muestra} - \text{bolsa}}{\text{peso de muestra}} \times 100$$

### **Minerales (cenizas)**

Se determinó la materia inorgánica, o cenizas según AOAC (1990). Se registraron los

pesos de los crisoles y de las muestras previamente secados a 65°C por 1 h en una estufa de aire forzado. A los crisoles se les agregó 1 g de muestra y se sometieron a una temperatura de 550°C por 5 h en una mufla TSW modelo "J". Después de este tiempo se colocaron en un desecador enfriándose hasta temperatura ambiente y se pesaron. Para determinar la cantidad de cenizas presentes en la muestra se utilizó la fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{peso del crisol con cenizas} - \text{peso del crisol solo}}{\text{mg de muestra}} \times 100$$

**Anexo 2.** Preparación de reactivo de Dragendorff para revelado de CCF.

Solución A:

- 0.85 g de nitrato de bismuto
- 10 mL de ácido acético
- 40 mL de agua destilada

Solución B:

- 8 g de ioduro de potasio
- 40 mL de agua destilada

Solución patrón:

- Solución A + B al mismo volumen

Solución reveladora (Dragendorff):

- 1 mL de solución patrón
- 2 mL de ácido acético
- 10 mL de agua destilada

### Anexo 3. Efecto de especie, tratamiento y tiempo de exposición al tratamiento.

#### a) Tratamiento térmico

Fuente de variación	gl	Cenizas	Grasas	Proteína	Fibra	Azúcares solubles totales	Polifenoles totales	Taninos condensados	Fenoles no taninos	Alcaloides totales	Taninos totales
E	1	3.3998***	38.3923***	62.0825***	483.19***	0.0982***	26381.72***	0.000002*	0.01026***	4.8279***	2.97***
T	3	2.2437***	2.9921**	14.6172*	662.13***	0.0890***	125984.95***	0.000029***	0.09267***	4.2716***	10.6***
E * T	3	0.11	2.9568**	18.3067**	71.14**	0.0168***	705.78	0.0000047***	0.0964***	0.0457	0.10*
EM	16	0.0423	0.2537	1.8798	5.93	0.0002	581.58	0.0000002	0.000028	0.0197	0.94

E= especie; T= tiempo de exposición; E\*T= interacción, EM= Error medio

#### b) Tratamiento de remojo

Fuente de variación	gl	Cenizas	Grasas	Proteína	FDN	Azúcares solubles totales	Polifenoles totales	Taninos condensados	Fenoles no taninos	Alcaloides totales	Taninos totales
E	1	0.2676	60.2448***	0.0559	7.0381	0.0123***	3865.43*	0.000071***	7.08449***	32.5406***	4.16268***
T	4	0.3019	3.1151*	5.3866*	8.4339*	0.0539***	5986.62**	0.0000084**	0.59676***	1.7512***	0.80474**
E * T	4	0.4298*	4.3402*	4.9896*	3.0618	0.0579***	4633.9*	0.000017***	0.61787***	0.6799***	1.63417***
EM	20	0.1067	0.9042	1.5728	1.8475	0.00056	831.19	0.00000089	0.000471	0.0357	0.08375

E= especie; T= tiempo de exposición; E\*T= interacción, EM= Error medio

#### c) Tratamiento de descascarillado

Fuente de variación	gl	Cenizas	Grasas	Proteína	Fibra	Alcaloides totales
E	1	0.28**	27.22***	13.83***	14.57	11.86***
T	2	8.69***	109.67***	4176.83***	4472.57***	22.26***
E * T	2	0.04	6.95***	3.07*	8.04	4.12***
EM	12	0.01	0.27	0.32	3.18	0.01

E= especie; T= tiempo de exposición; E\*T= interacción, EM= Error medio

d) Tratamiento alcalino

Fuente de variación	gl	Cenizas	Grasas	Proteína	Fibra	Azúcares solubles totales	Polifenoles totales	Taninos condensados	Fenoles no taninos	Alcaloides totales	Taninos totales
E	1	0.0001	84.4084***	88.9539***	16.7623	0.00066	64918.29***	0.000014**	0.09***	56.5828***	8.15***
T	3	0.0681*	6.9251***	44.0581***	26.4112*	0.0608***	23298.62***	0.000042***	0.05***	1.4876***	3.03***
E * T	3	0.1352*	0.155	2.4997	15.5793*	0.0583***	2345.77	0.000015***	0.003***	2.7256***	0.28
EM	16	0.0162	0.3304	0.7984	4.0541	0.0019	1020.85	7.70E-07	0.0001	0.01	0.11

E= especie; T= tiempo de exposición; E\*T= interacción, EM= Error medio

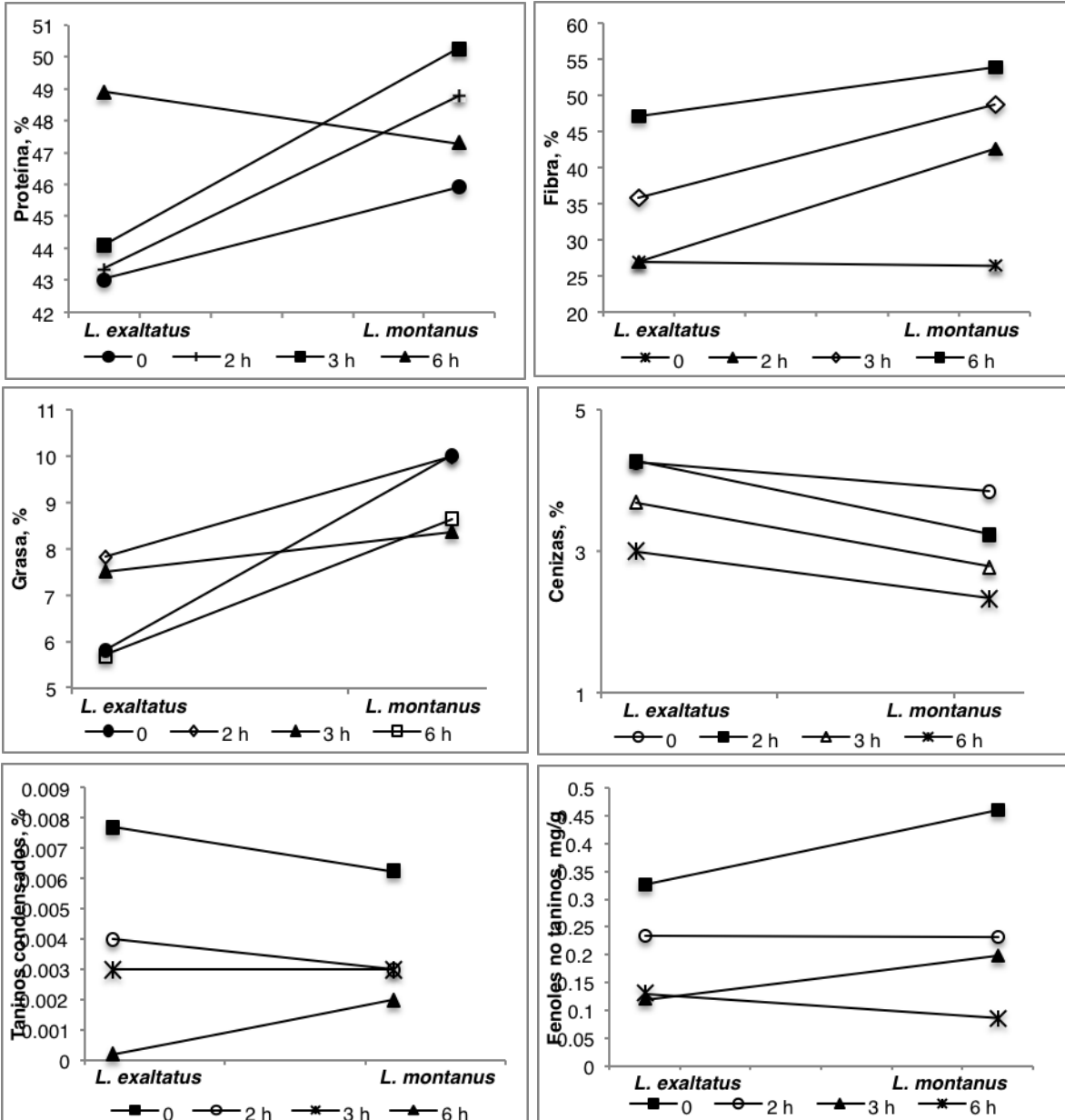
e) Tratamiento de germinación

Fuente de variación	gl	Cenizas	Grasas	Proteína	Fibra	Azúcares solubles totales	Polifenoles totales	Taninos condensados	Fenoles no taninos	Alcaloides totales	Taninos totales
E	1	0.5418*	29.1703***	87.84***	38.8406*	0.1671*	6931.13*	0.001***	0.09806***	9.1067***	0.27
T	2	1.4314***	14.8511***	928.47***	11.7117*	7.8689***	147732.41***	0.0012***	0.0698***	1.7841***	12.94***
E * T	2	0.0044	3.0323*	376.9***	9.6625*	0.3003***	27552.13***	0.0003***	0.0315***	1.1779***	3.15***
EM	12	0.037	0.3007	0.2508	2.1609	0.0134	1274.47	0.000005	0.00091	0.02	0.12

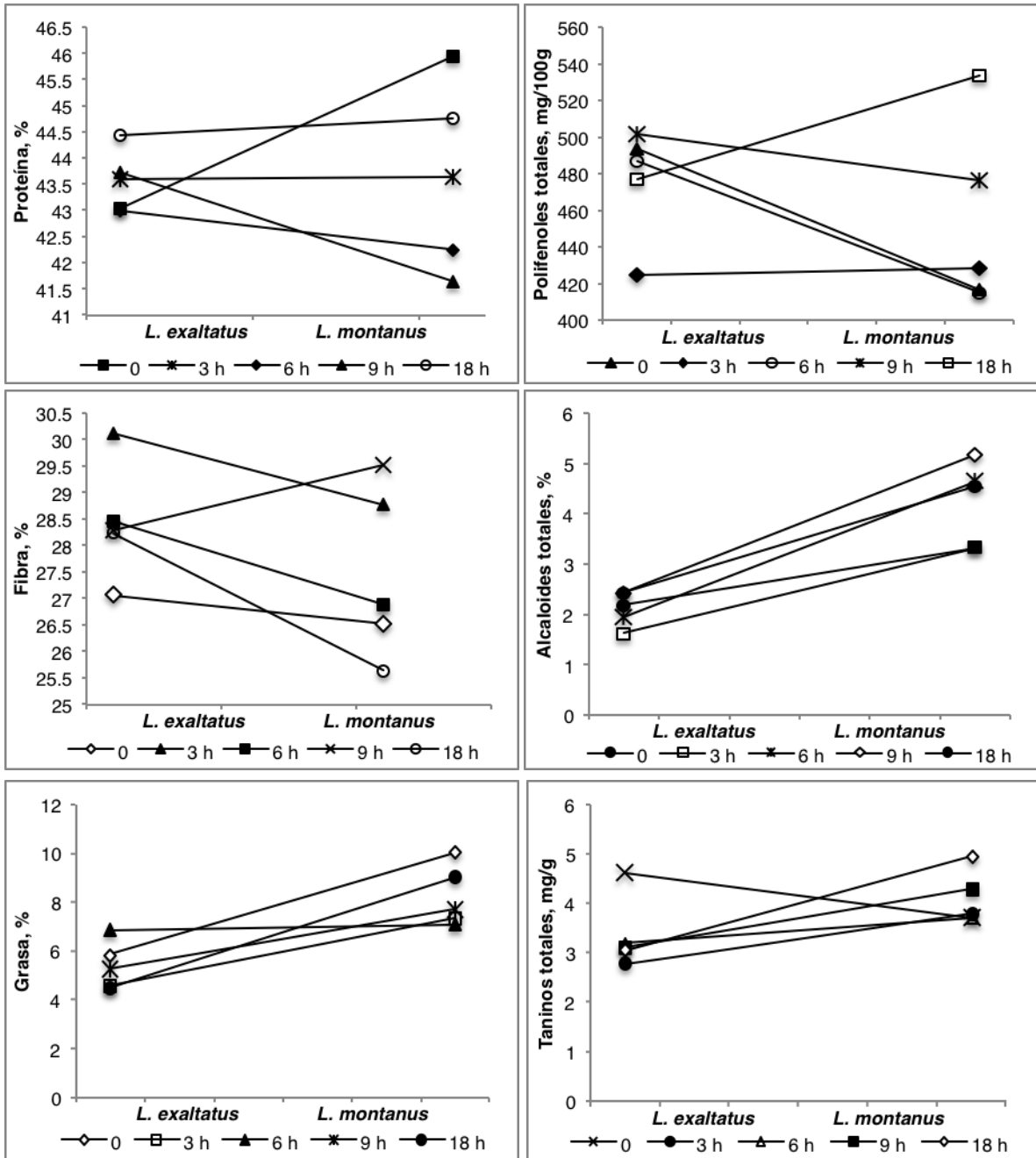
E= especie; T= tiempo de exposición; E\*T= interacción, EM= Error medio

Anexo 4. Interacción especie\*tiempo de las variables por tratamiento aplicado.

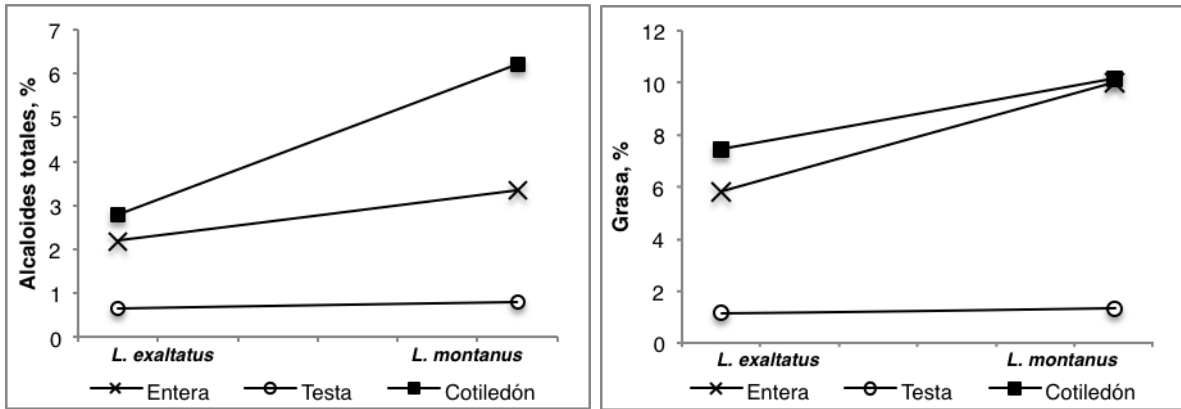
a) Tratamiento térmico



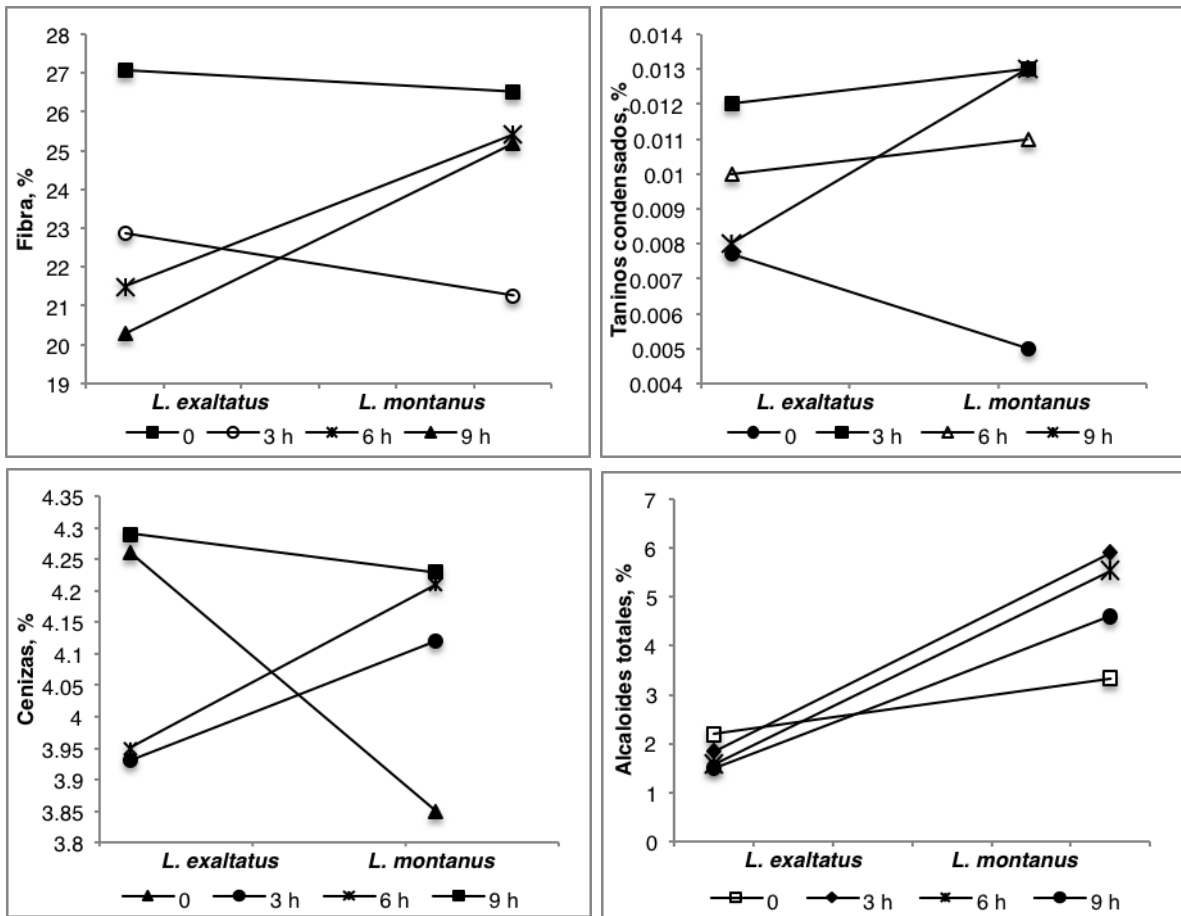
b) Tratamiento de remojo



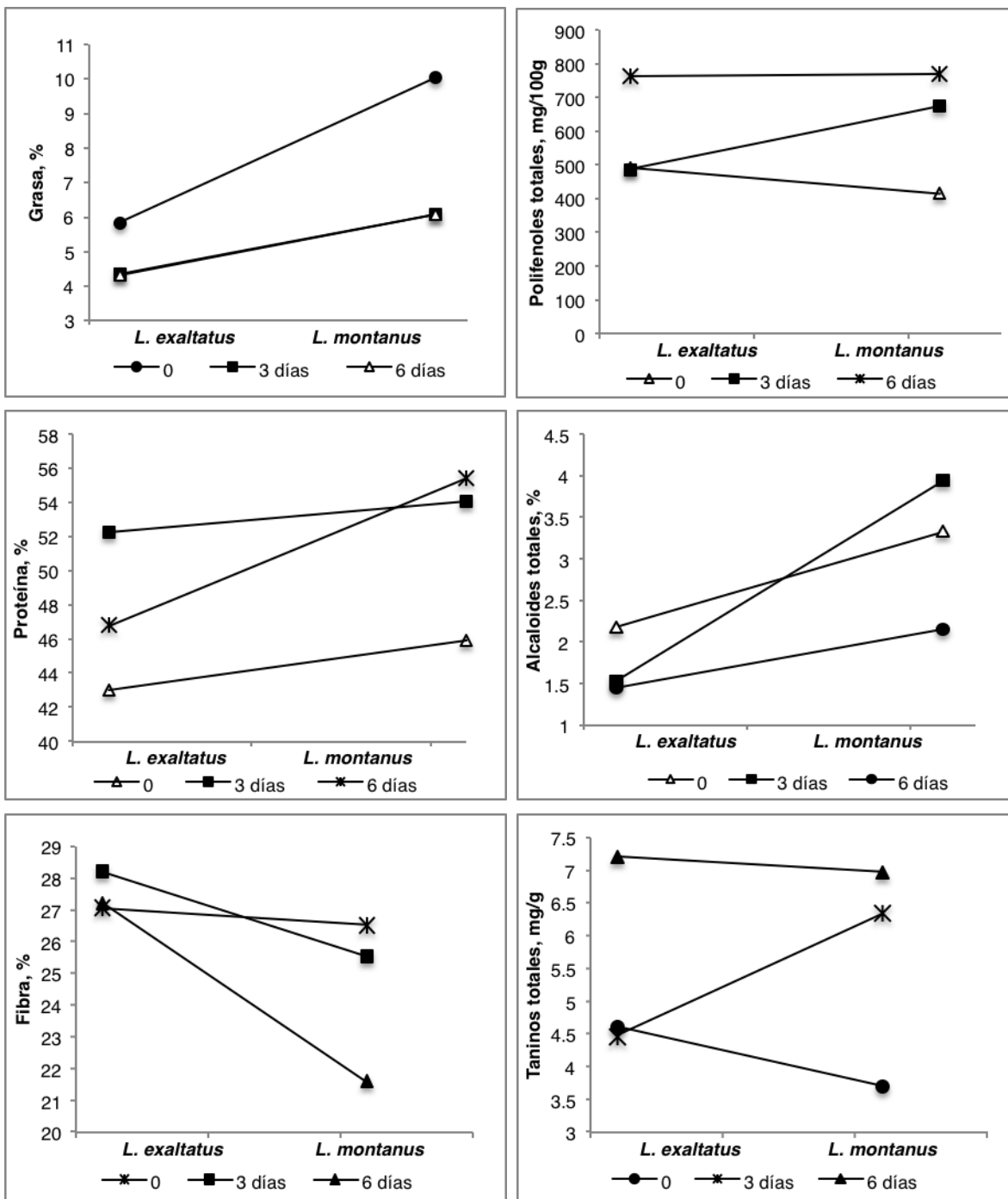
c) Tratamiento de descascarillado



d) Tratamiento alcalino



e) Tratamiento de germinación





**Anexo 5.** Materia seca y humedad de las semillas de *Lupinus*.

<b>Especie</b>	<b>Humedad %</b>	<b>Materia seca %</b>
<i>L. exaltatus</i>	6.31 ± 0.10	93.67± 0.10
<i>L. montanus</i>	5.85 ± 0.12	94.13 ± 0.12