

TRABAJOS GENERALES

Factores tóxicos en leguminosas

WERNER G. JAFFÉ
Instituto Nacional de Nutrición
Caracas, Venezuela

RESUMEN

Se presentan datos sobre la acción fisiológica de los inhibidores tripticos y de otros inhibidores enzimáticos de leguminosas y se discute su posible papel en la acción tóxica de semillas crudas de caraotas (*Phaseolus vulgaris*) y de soya. Probablemente estos inhibidores no son los principales causantes del efecto tóxico. Existen otros inhibidores de enzimas cuya importancia fisiológica es desconocida.

Igualmente se discute las propiedades de las hemaglutininas de dichas semillas, haciendo hincapié que algunas son mucho más tóxicas que otras, según su procedencia de diferentes plantas y su especificidad frente a diferentes tipos de sangre. Aglutininas tóxicas pueden interferir con la absorción intestinal. La toxicidad de las leguminosas crudas se debe probablemente a la acción combinada de varios factores.

Es un hecho reconocido desde principios de este siglo que las semillas de algunas leguminosas comestibles, cuando se incorporan en forma cruda en dietas experimentales para animales, no permiten un crecimiento normal. Las primeras observaciones al respecto se deben a Osborne y Mendel (1), quienes al utilizar dietas experimentales preparadas con harina de soya encontraron que sólo después de una cocción prolongada este material exhibe un valor nutritivo satisfactorio. Las ratas o pollos alimentados con raciones que contienen soya cruda tienen un crecimiento menor que los controles que ingieren una dieta similar, pero con soya previamente sometida al autoclave. Utilizando dietas preparadas con proteínas de

carraotas crudas (*Phaseolus vulgaris*), los mismos autores obtuvieron resultados parecidos, diferenciándose en que los animales perdían peso y morían después de unas dos semanas, lo cual no ocurre en los ensayos con soya (2). Johns y Finks (3), quienes hace más de 40 años se ocuparon también de este problema, suponían que la mala digestibilidad de estas leguminosas en forma cruda, en comparación con las cocidas, era la explicación para su bajo valor alimenticio.

La extensa literatura publicada posterior a los primeros estudios sobre este problema demuestra el interés que ha suscitado y los esfuerzos que se han hecho para aclararlo. Asimismo es de destacar que los múltiples resultados contradictorios han contribuido más aún a complicar el cuadro porque han dado origen a varias hipótesis diferentes (4); la mayoría de los estudios publicados tratan sobre las causas del bajo valor nutritivo de la soya cruda (5). Esto se debe probablemente a su industrialización y a su gran importancia en la ganadería. Las publicaciones sobre estudios en otras leguminosas han sido más escasas, aunque algunas exhiben una acción tóxica mucho más importante que la soya. En la presente revisión bibliográfica se van a considerar solamente aquellos factores de actividad antinutricional cuya acción desaparece por calentamiento.

La primera hipótesis que se hizo sobre la baja digestibilidad, como explicación del reducido valor alimenticio de muchas leguminosas crudas, encontró apoyo con el descubrimiento efectuado por Bowman (6) y por Ham y Sandstedt (7) de los inhibidores de la tripsina en la soya y en otras leguminosas. Se han obtenido en forma pura inhibidores tripticos de soya (8), de carraotas (9), de habas de lima (10), de frijoles (11) y otras. Parecía muy probable que la destrucción de estos factores podría ser la causa del mejoramiento en el valor nutritivo de las semillas crudas de las leguminosas al someterlas a la cocción. En un estudio comparativo se observó que los índices de digestibilidad de las especies con el mayor contenido en inhibidores tripticos eran los más bajos (12). La adición de un extracto pancreático a una dieta de soya cruda mejora su valor nutritivo (13) y por inyección de algunas preparaciones crudas de inhibidor triptico se pudo detectar una acción tóxica (14). El valor alimenticio de una dieta de soya cruda mejora mucho más por la suplementación

con metionina que el de una dieta de soya cocida. Esta observación llevó a Mellnick (15) a formular la hipótesis de que en la digestión de la soya cruda, la liberación de este aminoácido fuera más lento que en la soya cocida debido al inhibidor triptico.

Otros resultados experimentales, sin embargo, no confirman el papel nutricional del o de los inhibidores tripticos. La mejora que se observa en el crecimiento de ratas con la adición de tripsina a una dieta de soya cruda puede ser atribuida más bien al aporte en aminoácidos azufrados que a la enzima proteolítica, en vista de que la acción no desaparece al calentar la preparación hasta destruir su actividad enzimática (16). Liener (14) logró separar de un extracto de soya cruda una fracción con acción tóxica al ser aplicada por la vía intraperitoneal, y otra con acción inhibidora sobre la tripsina, que no es tóxica cuando se inyecta, demostrando así que las conclusiones previas sobre la toxicidad del inhibidor triptico debían revisarse. En la soya germinada se observa una actividad antitriptica prácticamente igual como en las semillas secas. Sin embargo, la retención de metionina era mayor en los animales que consumían la dieta de soya germinada comparado con los animales alimentados con soya cruda, aunque ambos no difieren en la composición en aminoácidos (17).

Según Saxena y col. (18), la adición del inhibidor triptico preparado según Bowman no reduce la utilización de los alimentos en pollos. Igualmente Sambeth y col. (19) no encontraron una reducción del crecimiento de pollos por la adición de inhibidor triptico preparado según Kunitz, comparable con la producida por soya cruda. Recientemente Gertler y col. (20) lograron producir hipertrofia pancreática en pollos y ratas agregando simultáneamente inhibidor triptico e inhibidor quimotriptico de soya a las dietas correspondientes. La reducción del crecimiento fue muy poca y mucho menor que la causada por la adición de soya cruda. Todas estas observaciones demuestran que es de poca importancia el efecto de estos factores sobre el crecimiento. Hay que recordar, sin embargo, que existen múltiples inhibidores tripticos en la soya (21) y que sus respectivas actividades fisiológicas no necesariamente son idénticas.

Contra la posibilidad de que la baja digestibilidad causada por una inhibición de la tripsina sea responsable del reducido

valor nutritivo de algunas leguminosas, existe el hecho de que la producción de enzimas digestivas por parte del páncreas supera aparentemente las necesidades fisiológicas. Ratas alimentadas por varias semanas con una dieta sin proteína y que en consecuencia tenían un contenido de enzimas pancreáticas de sólo un 20% del valor normal, no mostraron defectos digestivos significativos (22). La pancreatomía parcial del 95% del peso de este órgano no redujo la retención de nitrógeno en ratas (23). No parece probable, por lo tanto, que la combinación de una parte de las enzimas proteolíticas digestivas con inhibidores afecte seriamente el crecimiento de los animales. Se han encontrado más bien valores de actividad proteolítica más altos en los intestinos de ratas después del consumo de soya cruda comparado con los testigos que recibieron la soya cocida (24).

Conclusiones similares se han podido sacar de los estudios con inhibidores trípticos de otras leguminosas, los cuales tampoco son los principales responsables de los efectos tóxicos. La adición de caseína hidrolizada no mejora el crecimiento de ratas que consumen una dieta de caraotas crudas como debería esperarse, si la inhibición de la actividad trípica fuera la causa del mal crecimiento observado (25). Trabajando con caraotas negras, Jaffé y Gaede lograron preparar una proteína tóxica que llamaron "phaseolotoxina A", la cual no inhibe la actividad de la tripsina (26). El inhibidor trípico preparado de estas mismas semillas, a su vez, no es tóxico si se inyecta en ratones (27). Resultados similares fueron señalados por Honavar *et al.* con dos diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris* (28), mientras que Schonie y col. (29) aislaron un inhibidor trípico de "double beans"¹, el cual, sometido a la prueba biológica, no reduce el crecimiento de ratas en las mismas condiciones en que las semillas molidas lo hacen y, por lo tanto, no puede ser la causa del bajo valor biológico de esta leguminosa.

Aunque, a base de estas observaciones, parece muy poco probable que los inhibidores trípticos sean los responsables de la actividad tóxica, no se puede excluir la posibilidad de que posean acciones fisiológicas que puedan contribuir a al-

¹ El nombre científico del "double bean" fue indicado en algunas publicaciones como *Faba vulgaris*. Según información de la Dra. K. Schonie, fue identificada posteriormente como *Phaseolus lunatus*.

gunos de los diversos efectos producidos por el consumo de leguminosas crudas. Por ejemplo, desde que Chernick y col. llamaron la atención sobre el aumento del páncreas en pollos alimentados con dietas a base de soya cruda (30), estos resultados fueron confirmados por varios autores tanto en aves como en ratas (20, 31) y no sólo con el empleo de la soya, sino también cuando se alimentan con caraotas (32). En las leguminosas sin actividad de inhibidor trípico no se encontró tampoco la acción sobre el páncreas. Sambeth y col. (19) observaron hipertrofia pancreática y simultáneamente una contracción de la vesícula biliar después del consumo de dietas conteniendo fracciones de soya con actividad antitripica o inhibidor trípico puro. Mencionan la posibilidad de que se trate de una acción a través de las hormonas pancreozimina o colescistoquinina. La hipertrofia pancreática es acompañada por una mayor excreción de enzimas digestivas (33) y puede resultar en una mayor pérdida de nitrógeno fecal. Este efecto podría simular una reducción en la digestibilidad. La pérdida de metionina sería particularmente importante desde el punto de vista fisiológico, por ser el aminoácido limitante de la soya y de las demás leguminosas (34). No existe una relación cuantitativa entre la actividad antitripica y el aumento de tamaño del páncreas en ratas, si se comparan distintas variedades de leguminosas (32). La relación entre ácidos ribonucleicos a ácidos desoxiribonucleicos en los páncreas de ratas se encuentra aumentada después de haber sido alimentadas con una dieta de soya cruda, indicando un aumento del tamaño y no del número de las células (35). Saxena y col. (18) atribuyen el efecto de la soya cruda sobre el crecimiento del páncreas a otro factor que no es el inhibidor trípico.

Otro efecto atribuido a inhibidores trípicos es un bloqueo de la utilización de la cistina. Kwong y Barnes (36) llegaron a esta conclusión a base de la observación sobre un aumento significativo de la exhalación de C_{14} radioactivo, después de la inyección de metionina marcada con C_{14} y la aplicación previa de inhibidor trípico cristalino. Además, se encontró cierto aumento de la cantidad de cistina radioactiva en el páncreas de ratas que habían recibido simultáneamente metionina marcada e inhibidor trípico en comparación con los controles que recibieron sólo la metionina marcada (37).

Además de los inhibidores tripticos que en algunos casos inhiben también la acción de la quimotripsina (10), existen otros inhibidores enzimáticos en algunas leguminosas, los que han sido muy poco estudiados hasta el presente. Learmonth (38) describió una inhibición de la actividad proteolítica de la papaína por extractos de soya. Seidl y Jaffé (39) han estudiado la inhibición que ejerce una globulina de *Phaseolus vulgaris* sobre la pepsina, tripsina, papaína y otras proteinasas, y atribuyen a dicha globulina cierta importancia nutricional porque su concentración en las semillas es elevada. Hace más de 20 años, Bowman (40) describió un inhibidor de amilasa en las caraotas. Su posible importancia nutricional ha sido investigada recientemente por Jaffé y Vega (32), quienes observaron la excreción de gran cantidad de almidón fecal en ratas alimentadas con una dieta preparada con una variedad de *Phaseolus vulgaris* particularmente rica en dicho inhibidor. Sin embargo, el reemplazo de almidón por glucosa en la dieta no mejoró el crecimiento de los animales sometidos a estos ensayos, demostrándose así que el inhibidor de amilasa no fue la causa del mal crecimiento bajo las condiciones experimentales. Es de esperar, sin embargo, que la presencia de este factor en una dieta libre de otros inhibidores del crecimiento y rica en fécula causaría una baja en la utilización energética.

En muchas semillas de leguminosas y también en numerosas otras plantas existen sustancias termolábiles llamadas fitohemaglutininas, capaces de aglutinar los glóbulos rojos (41). La primera observación al respecto fue comunicada por Stillmarck (42) en el siglo pasado sobre una proteína obtenida de semillas del tártago (*Ricinus communis*) y que es altamente tóxica. Fue llamada ricina y ha sido estudiada por numerosos investigadores. Recientemente, Takahashi y col. (43) han descrito la separación de una fracción tóxica de otra hemaglutinante de ricina cristalizada por métodos cromatográficos. Desgraciadamente, presentan muy pocos detalles sobre las pruebas biológicas utilizadas para confirmar este resultado. Otros autores no lograron separar estas dos actividades de la ricina (44, 45). El problema es importante en relación con la toxicidad de las hemaglutininas de leguminosas comestibles.

Sumner cristalizó una globulina de *Canavalia ensiformis* que llamó concanavalina A y que tiene actividad de una aglu-

tinina (46). Su acción fisiológica ha sido poco estudiada, pero parece que es tóxica para animales (47).

La hemaglutinina de soya fue preparada por Liener y col. (14, 41, 48, 49), quienes estudiaron tanto sus características químicas como biológicas. Es tóxica si se inyecta en ratas siendo la dosis letal LD₅₀ cerca de 50 mg/kg de peso de rata. Incorporada en la dieta al nivel de 1% reduce el crecimiento a un 75% de los controles. Se estimó que un 50% de la inhibición de crecimiento observada por el consumo de soya cruda, en comparación con soya cocida, puede ser atribuido a la aglutinina. Posteriormente se ha podido demostrar que existen 4 hemaglutininas en soya (50).

También de las caraotas (*Phaseolus vulgaris*) se pueden obtener fracciones proteicas que tienen simultáneamente actividad hemaglutinante y tóxica (51). La faseolotoxina A, ya mencionada (26), es una de ellas. Su composición química incluye, además de aminoácidos, carbohidratos y probablemente también lípidos (52). La toxicidad de las hemaglutininas de diferentes variedades de caraotas puede variar considerablemente (28), como también la de diferentes aglutininas obtenidas de un mismo lote de semillas (51).

El efecto tóxico de las aglutininas ingeridas está probablemente relacionado con su acción sobre la absorción intestinal, la cual se ha estudiado en ratas alimentadas con dietas preparadas con caseína y adicionada con diferentes cantidades de la hemaglutinina aislada de caraotas negras, la faseolotoxina (27). Se observó que la retención del nitrógeno ingerido se reduce proporcionalmente con la cantidad de aglutinina incluida en la dieta. En experimentos de perfusión de una asa intestinal ligada de ratas se pudo detectar una reducción significativa de la absorción de glucosa en aquellos animales que anteriormente habían ingerido una dieta preparada con caraotas crudas (53) o que habían recibido una solución de la fitoaglutinina purificada por intubación estomacal previamente al experimento de absorción (54).

La actividad hemaglutinante se explica muy probablemente por una reacción entre las aglutininas con ciertos grupos receptores situados en la superficie de las membranas de eritrocitos. Como causa del efecto tóxico oral se puede suponer que la aglutinina se combina con grupos receptores en la superficie de células de la mucosa gástrica de manera similar

como se combina con los glóbulos rojos. Esta interreacción se puede demostrar porque tanto la actividad hemaglutinante como también la tóxica desaparecen de una solución de faseolotoxina al agitarla con una suspensión de intestino homogenizado y lavado (27), debido muy probablemente a la absorción en las superficies celulares. Resultados similares se obtienen con eritrocitos, células renales y otros. Esta capacidad de fijarse en las paredes celulares de algunas fitoehmaglutininas está probablemente relacionada con su acción tóxica.

La aglutinina de caraotas es resistente a la actividad digestiva del tracto gastro-intestinal. Esto se pudo demostrar por la acción hemaglutinante detectable en extractos de heces de ratas después de la ingestión de una dieta preparada con caraotas crudas (32).

El crecimiento de ratas que consumen una dieta preparada con caraotas con alto contenido en hemaglutininas no se mejora con la adición de caseína hidrolizada, mientras que se observa un fuerte estímulo del crecimiento causado por la suplementación con este mismo hidrolizado proteico, si la dieta fue preparada con una variedad de caraotas libre de actividad hemaglutinante (32). Esta observación apoya la hipótesis de que la hemaglutinina causa una reducción de la absorción intestinal y que este efecto puede ser la explicación de su acción tóxica. Igualmente se ha observado una reducción de la utilización de la vitamina E (55) y de aminoácidos (56) en dietas que contienen caraotas crudas. El efecto bociógeno de la soya cruda también podría estar relacionado con un defecto de absorción intestinal, como propone Liener (4), y también la reducción de la utilización biológica de la vitamina D, observada por Carlson y col. (57). Asimismo, la intensa hipoglucemia producida en ratas por dietas de caraotas crudas puede explicarse por un defecto en la absorción intestinal (58).

Numerosas publicaciones han reportado una "mala digestibilidad" de las leguminosas crudas en comparación con las cocidas, apoyándose en determinaciones de la relación entre el nitrógeno ingerido y fecal. No se toma siempre en cuenta que también puede existir una mayor excreción de nitrógeno fecal como consecuencia de una mayor pérdida de nitrógeno endógeno causado por hiperfunción pancreática o por un defecto en la absorción intestinal no relacionada con las enzimas digestivas. Las conclusiones sobre defectos en la digestibilidad

a que se puede llegar erróneamente así y que generalmente se relacionen con los inhibidores tripticos, han contribuido a oscurecer la posible importancia de otros factores antinutricionales, especial de las fitohemaglutininas.

No todas las fitohemaglutininas tienen propiedades tóxicas. Una aglutinina no tóxica fue aislada recientemente de arvejas blancas por Huprikar y Sohonié (59). Su incorporación en una dieta experimental para ratas al nivel de 1% no afecta el crecimiento de estos animales.

Casi todas las aglutininas obtenidas de diferentes plantas se distinguen entre sí por sus respectivas especificidades frente a los glóbulos rojos de diferente origen. Así, extractos de arvejas, garbanzos o lentejas son activos en aglutinar sangre de conejo, pero no actúan sobre sangre humana de ningún grupo sanguíneo, como lo hacen las aglutininas de caraotas. Otras, como los extractos de habas de lima (*Phaseolus lunatus*), aglutinan sólo sangre humana del grupo A (60). Por esta especificidad, Boyd ha propuesto el nombre de "lectinas" (del latín *legere*=elegir) para las aglutininas vegetales (61). Cada lectina con una especificidad distinta debe considerarse como una sustancia diferente de todas las demás fitohemaglutininas con propiedades fisiológicas específicas, que muy bien pueden o no incluir acciones que resulten nocivas para los animales que los ingieren, es decir, pueden ser tóxicas o no.

La dosis letal de las aglutininas de soya y caraotas, respectivamente, es prácticamente igual si se aplican por vía intraperitoneal (26, 48), pero las caraotas son mucho más nocivas que la soya por vía oral. Las primeras tienen acción letal en estas condiciones; las segundas, no. Una posible explicación se ofrece en la facilidad con que la aglutinina de soya es digerida por la pepsina (62) y la notable resistencia de la de caraota frente a esta enzima (63).

Tanto Stead y col. (64) como Kakade y Evans (65) obtuvieron fracciones de caraotas en las cuales la relación entre la actividad hemaglutinante y la toxicidad varía considerablemente. Concluyeron de esta observación que ambas actividades se deben a factores diferentes, es decir, que deben existir toxinas desconocidas distintas de las aglutininas. Los resultados podrían explicarse, sin embargo, también por la existencia de múltiples hemaglutininas con distintos grados de toxicidad (51). Aunque parece comprobado que las hemaglu-

tininas son parcialmente responsables de los efectos nocivos, intervienen seguramente también otros factores, como inhibidores enzimáticos, mala digestibilidad, además de la posible existencia de otros factores tóxicos desconocidos.

Los factores tóxicos en leguminosas tienen no sólo un interés teórico, sino son de cierta importancia práctica, especialmente en la nutrición animal. También se han descrito casos de intoxicación en humanos a causa de la ingestión de caraotas crudas (66) o de harina de caraotas insuficientemente cocida (67). El uso de leguminosas en productos de panificación debería controlarse cuidadosamente por razón de la resistencia de las hemaglutininas tóxicas y la destrucción por calor seco (25). Igualmente, su utilización en fórmulas de productos para la suplementación en la nutrición humana, especialmente la infantil, requiere un cuidadoso control para evitar posibles accidentes.

El contenido relativamente alto en cistina encontrado en el inhibidor trípico de caraotas (9) señala la posibilidad de lograr una mejora en el valor biológico de las proteínas de esta leguminosa que es limitado por la baja proporción de aminoácidos azufrados (34), seleccionando variedades con elevado contenido en dicho factor, como la actividad antitriptica desaparece con la cocción, no ofrece peligro para la salud.

SUMMARY

Toxic factors in legumes

Data on the physiological action of trypsin inhibitors and other enzyme inhibitors from legumes, especially kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) and soybeans are presented and their possible toxic action is discussed. Their importance as causative agents of the toxicity of the legume seeds is probably small. Other enzyme inhibitors may be present but their physiological importance is unknown. Phytohemagglutinins are found in many legumes, and the toxicity of some has been demonstrated. Toxic agglutinins may interfere with intestinal absorption. The toxicity of crude legumes is probably caused by a combination of several factors.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Osborne, T. B. & Mendel, L. B.—The use of soybean as food. *J. Biol. Chem.* 32: 369, 1917.
- (2) Osborne, T. B. & Mendel, L. B.—Beobachtungen über Wachstum bei Fütterungsversuchen mit isolierten Nahrungssubstanzen. *Hoppe Seilers Z. Physiol. Chem.* 80: 307-370, 1912.

- (3) Johns, C. O. & Finks, A. J.—The deficiency of cystine in proteins of the genus *Phaseolus*. *Science*, 52: 414, 1920.
- (4) Liener, I. E.—Toxic factors in edible legumes and their elimination. *Am. J. Clin. Nutr.* 11: 281-293, 1962.
- (5) Mickelsen, O. & Yang, M. G.—Naturally occurring toxicants in foods. *Fed. Proc.* 25: 104-123, 1965.
- (6) Bowman, D. E.—Fractions derived from soybeans and navy beans which retard the tryptic digestion of casein. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 57: 139-140, 1944.
- (7) Ham, W. E. & Sandstedt, R. M.—A proteolytic inhibiting substance in the extract from unheated soybean meal. *J. Biol. Chem.* 154: 505, 1944.
- (8) Kunitz, M.—Crystallization of a trypsin inhibitor. *Science* 101: 668-669, 1945.
- (9) Wagner, L. P. & Riehm, J. P.—Purification and partial characterization of a trypsin inhibitor from the navy bean. *Arch. Biochem. Biophys.* 121: 672-677, 1967.
- (10) Tauber, H., Kershaw, B. B. & Wright, R. D.—Studies on the growth inhibitor fraction of lima beans and isolated crystalline heatstable inhibitor. *J. Biol. Chem.* 179: 1155, 1949.
- (11) Mateus Ventura, M. & Xavier Filho, J.—A trypsin inhibitor from black eyed pea (*Vigna sinensis*). I. Purification and partial characterization. *An. Acad. Brasil. Ciencias* 38: 553-566, 1966.
- (12) Jaffé, W. G.—Protein digestibility and trypsin inhibitor activity of legume seeds. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 75: 219-220, 1950.
- (13) Almquist, H. J. & Merrit, J. B.—Effect of crystalline trypsin on the raw soybean growth inhibitor. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 83: 269, 1953.
- (14) Liener, I. E.—Soyin, a toxic protein from the soybean. I. Inhibition of rat growth. *J. Nutr.* 49: 527, 1953.
- (15) Melnick, D., Oser, B. L. & Weiss, S.—Rate of enzyme digestion of proteins as a factor in nutrition. *Science* 103: 326-329, 1946.
- (16) Borchers, R. & Ackerson, C. W.—Nutritive value of legume seeds XI Counteracting the growth inhibitor of raw soybeans. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 78: 81-83, 1951.
- (17) Desikachar, H. S. R. & De, S. S.—The tryptic inhibitor and the availability of cystine and methionine in raw and germinated soya beans. *Biochem et Biophys. Acta* 5: 285-289, 1950.
- (18) Saxena, H. C., Jensen, L. S. & McGinnis, J.—Pancreatic hypertrophy and chick growth inhibition by soybean fractions devoid of trypsin inhibitor. *Proc. Soc. Biol. Med.* 112: 101-105, 1963.
- (19) Sambeth, W., Nesheim, M. C. & Serafin, J. A.—Separation of soybean whey into fractions with different biological activities. *J. Nutr.* 92: 479-490, 1967.
- (20) Gertler, A., Birk, Y. & Bondi, A.—A comparative study of the nutritional and physiological significance of pure soybean trypsin inhibitors and ethanol extracted soybean meal in chicks and rats. *J. Nutr.* 91: 358-370, 1967.
- (21) Rackis, J. J. & Anderson, R. L.—Isolation of four soybean trypsin

- inhibitors by DEAE-cellulose chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 15: 230-235, 1964.
- (22) Jaffé, W. G.—Alteraciones pancreáticas en ratas con deficiencia de proteínas. *Arch. Venez. Nutr.* 13: 175-191, 1963.
- (23) Scow, R. O.—“Total” pancreatectomy in the rats operation, and postoperative care. *Endocrinology* 60: 359-367, 1957.
- (24) Haines, P. C. & Lyman, R. L.—Relationship of pancreatic enzyme secretion to growth inhibition in rats fed soybean trypsin inhibitor. *J. Nutr.* 74: 445, 1961.
- (25) Jaffé, W. G.—Toxicity of raw kidney beans. *Experientia* 5: 81-90, 1949.
- (26) Jaffé, W. G. & Gaede, K.—Purification of a toxic phytohemagglutinin from black beans (*Phaseolus vulgaris*). *Nature (London)* 183: 1329, 1959.
- (27) Jaffé, W. G.—Über Phytotoxine aus Bohnen. *Arzneimittel Forsch.* 10: 1012 (1960).
- (28) Honovar, P. M., Shih, C. V. & Liener, I. E.—The inhibition of the growth of rats by purified hemagglutinin isolated from *Phaseolus vulgaris*. *J. Nutr.* 77: 109-114, 1962.
- (29) Sohonie, R., Apte, U. & Ambe, K. S.—Trypsin inhibitors in Indian foodstuffs Part V. Effect of raw double bean and double bean trypsin inhibitor on the growth of rats. *J. Sci. Industr. Res. (India)* 17C: 42-46, 1958.
- (30) Chernick, S. S., Lepkovsky, S. & Chaikoff, I. L.—A dietary factor regulating the enzyme content of the pancreas. Changes induced in size and proteolytic activity of the chick pancreas by the ingestion of raw soybean meal. *Am. J. Physiol.* 155: 33, 1948.
- (31) Booth, G. N., Robbins, J., Ribelin, W. E. & DeEds, F.—Effect of raw soybean meal and amino acids on pancreatic hypertrophy in rats. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 104: 681-683, 1960.
- (32) Jaffé, W. G. & Vega, C. L.—Heat labile growth inhibiting factors in beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Nutr.* 94: 203-210, 1968.
- (33) Lyman, R. L. & Lepkovsky, S.—The effect of raw soybean meal and trypsin inhibitor diets on the intestinal and pancreatic enzyme secretion in the rat. *J. Nutr.* 62: 269, 1957.
- (34) Jaffé, W. G.—Limiting essential amino acids in some legume seeds. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 71: 398-399, 1949.
- (35) Konijn, A. M. & Guggenheim, K.—Effect of raw soybean flour on the composition of rat pancreas. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 126: 65-67, 1967.
- (36) Kwong, E. & Barnes, R. H.—Effect of soybean trypsin inhibitor on methionine and cystine utilization. *J. Nutr.* 81: 392-398, 1963.
- (37) Barnes, R. H. & Kwong, E.—Effect soybean trypsin inhibitor and penicillin on cystine biosynthesis in the pancreas and its transport as exocrine protein secretion in the intestinal tract of the rat. *J. Nutr.* 86: 245, 1965.
- (38) Learmonth, E. M.—The influence of soya flour on bread doughs. III. The distribution of the papain-inhibiting factor in soya-beans. *J. Sci. Food Agric.* 9: 269, 1958.
- (39) Seidl, D. & Jaffé, W. G.—Por publicarse.

- (40) Bowman, D. E.—Amylase inhibitor of navy beans. *Science* 102: 358, 1945.
- (41) Liener, I. E.—Seed hemagglutinins. *Econ. Bot.* 18: 27-33, 1964.
- (42) Stillmarck, H.—Uber Ricin. *Arch. pharmakol. Inst. zu Dorpat.* 3: 59-128, 1889.
- (43) Takahashi, T., Funatsu, G. & Funatsu, M.—Biochemical studies on castor bean hemagglutinin. II. Hemagglutinin separated from crystalline ricin and its molecular weight. *Journ. Biochem. (Japan)* 52: 50, 1962.
- (44) Jaffé, W. G., Wagner, F., Marcano, P. & Hernández, R.—Una fracción de lipo-glico protefna tóxica de *Ricinus communis*. *Acta Cient. Venez.* 15: 29-32, 1964.
- (45) Waller, G. R., Ebner, K. E., Scroggs, R. A., Das Gupta, B. R. & Corcoran, J. B.—Studies on the toxic action of ricin. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 121: 685-691, 1966.
- (46) Sumner, J. B. & Howell, S. F.—The identification of the hemagglutinin of the jack bean with Convanavalin A. *J. Bacteriol.* 32: 227-237, 1936.
- (47) Dameshek, W. & Miller, E. B.—Pathogenic mechanisms in hemolytic anemias. *Arch. Int. Med.* 72: 1, 1943.
- (48) Liener, I. E. & Palansch, M. J.—Purification and toxic properties of a substance from defatted soybean flour. *J. Biol. Chem.* 197: 29, 1952.
- (49) Liener, I. E. & Rose, J. E.—Soyin, a toxic protein from the soybean. III. Immunochemical properties. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 83: 539, 1953.
- (50) Lis, H., Fridman, C. Sharon, N. & Katchalski, E.—Multiple hemagglutinins in soybeans. *Arch. Biochem. Biophys.* 117, 301, 1966.
- (51) Jaffé, W. G.—Blutagglutinierende und toxische Eiweissfraktionen in Bohnen. *Experientia* 18: 76, 1962.
- (52) Jaffé, W. G. & Hanning, K.—Fractionation of proteins from kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Arch. Biochem. Biophys.* 109: 80, 1965.
- (53) Jaffé, W. G., Planchart, A., Páez Pumar, J. I., Torrealba, R. & Franceschi, N.—Nuevos estudios sobre un factor tóxico de las caraotas crudas (*Phaseolus vulgaris*). *Arch. Venez. Nutr.* 6: 195, 1955.
- (54) Jaffé, W. G. & Camejo, G.—La acción de una proteína tóxica, aislada de caraotas negras (*Phaseolus vulgaris*), sobre la absorción intestinal en ratas. *Acta Cient. Venez.* 12: 59, 1961.
- (55) Hintz, H. F. & Hogue, D. E.—Kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) and the effectiveness of vitamin E for prevention of nutritional muscular dystrophy in the chick. *J. Nutr.* 84: 283, 1964.
- (56) Kakade, M. L. & Evans, R. J.—Growth inhibition of rats fed navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Nutr.* 90: 191, 1966.
- (57) Carlson, C. W., Saxena, H. C., Jensen, L. S. & McGinnins, J.—Rachitogenic activity of soybean fractions. *J. Nutr.* 2: 507, 1964.
- (58) Hintz, H. F., Hogue, D. E. & Krook, L.—Toxicity of red kidney beans in the rat. *J. Nutrition* 93: 77-86, 1967.
- (59) Huprikar, S. V. & Schonie, K.—Haemagglutinins in Indian pulses. II. Purification and properties of haemagglutinin from white pea (*Pisum sp.*). *Enzymologia* 28: 333, 1965.

- (60) Boyd, W. C. & Reguera, R. M.—Hemagglutinating substances for human cells in various plants. *J. Immunol.* 62: 333, 1949.
- (61) Boyd, W. C. & Shapleigh, E.—Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science* 119: 419, 1954.
- (62) Liener, I. E.—Inactivation studies on the soybean hemagglutinin. *J. Biol. Chem.* 233: 401, 1958.
- (63) Goddard, V. R. & Mendel, L. B.—Plant hemagglutinins with special reference to a preparation from the navy bean. *J. Biol. Chem.* 82: 447, 1929.
- (64) Stead, R. H., de Muellenaere, H. J. H. & Quicke, G. V.—Trypsin inhibitor, hemagglutination and intraperitoneal toxicity of extracts of *Phaseolus vulgaris* and *Glycine max.* *Arch. Biochem. Biophys.* 113: 103, 1966.
- (65) Kakade, M. L. & Evans, R. J.—Growth inhibition of rats fed navy bean fractions. *Agr. Food Chem.* 13: 450, 1965.
- (66) Faschingbauer, H. & Kofler, L.—Über Giftwirkung von rohen Bohnen und Bohnenkeimlingen. *Wien. klin. Wchnschr.* 42: 1069, 1929.
- (67) Griebel, C.—Erkrankungen durch Bohnenflocken (*Phaseolus vulgaris*) und Platterbsen (*Lathyrus tingitanus* L.) *Ztsch. Lebensm. Untersuch. Forsch.* 90: 191, 1950.