

00528  
62



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

INFLUENCIA DEL REMOJO EN LAS PECTINAS DE  
LA LAMINA MEDIA DEL COTILEDON DE LOS  
FRIJOLES DETERIORADOS (*Phaseolus vulgaris*).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A ;  
ROBERTO FRANCISCO MENDEZ VEGA



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2003

2



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

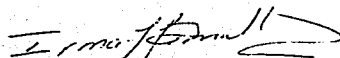
**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE  
VOCAL  
SECRETARIO  
1er. SUPLENTE  
2do. SUPLENTE**

**RAUL AGUILAR CABALLERO  
FRANCISCA ITURBE CHIÑAS  
IRMA OFELIA BERNAL LUGO  
JUAN DIEGO ORTIZ PALMA PEREZ  
BERTHA JULIETA SANDOVAL GUILLEN**

**Sitio donde se desarrollo el tema  
Laboratorio 104, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM**

**Asesor del tema:  
IRMA OFELIA BERNAL LUGO**



**Supervisor técnico:  
ENRIQUE MARTÍNEZ MANRIQUE**



**Sustentante:  
ROBERTO FRANCISCO MÉNDEZ VEGA**



**El presente trabajo fue apoyado  
por el proyecto de la DGAPA IN 208998**

C

Porque no existen palabras suficientes  
para agradecer todo lo que has obrado en mi,  
solo puedo decir  
**GRACIAS SEÑOR.**

D

**GRACIAS MAMA** porque desde que me diste el ser nunca me ha faltado tu apoyo, ni tu amor. Porque me has consolado aun sin saber, bastándome únicamente el estar a tu lado.

Porque las cosas más importantes las he aprendido de ti y siempre has sido un ejemplo.

Aunque es difícil nuestro trato, es imposible negar que te quiero. Mi admiración por ti es la que me inspiró a estudiar esta carrera  
**GRACIAS GUADALUPE.**

**WANDY** el platicar contigo aclara muchas de mis dudas y es de los momentos más agradables del día, parte de este trabajo te pertenece  
**GRACIAS.**

**ANGÉLICA** el escuchar tu risa alegre aun los momentos del más negro humor, aunque no te esperaba, no imagino mi vida sin ti

**GRACIAS PILAR por tu confianza y apoyo en todo momento.  
Por darme el impulso necesario para terminar esta tesis.  
Pero sobre todo por tu amor incondicional.  
TE AMO**

f

**DOCTORA IRMA OFELIA BERNAL LUGO**  
GRACIAS por permitirme trabajar con usted y  
por todas las atenciones que me dedico durante  
este trabajo

**ENRIQUE MARTÍNEZ MANRIQUE**  
GRACIAS por invitarme a realizar este trabajo  
y asesorarme durante el mismo, en ti encontré  
además de un maestro un amigo

GRACIAS CARMEN PARRA por enseñarme  
tantas cosas en el laboratorio, por todo tu cariño  
y apoyo



**GRACIAS A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
por la oportunidad de forjarme en sus aulas y prepararme para ser cada día mejor y a mis  
maestros por todo ese mundo de conocimientos adquiridos

**A mis amigos:**

**ADRIANA RAMÍREZ GRACIAS** por las  
horas de estudio y comunicación en silencio

**ANGÉLICA CASTAÑÓN GRACIAS** porque a  
pesar de que nunca nos pusimos de acuerdo  
siempre trabajamos bien

**ENRIQUE GRACIAS** por apoyarme dentro y  
fuera de la biblioteca

**MARTHA QUEZADA GRACIAS** por esas  
platicas a la hora de la comida

**VERÓNICA DEL RIO VITAL GRACIAS** por  
ese ejemplo de trabajo y amistad incondicional

I

## Indice

<b>1</b>	<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Justificación</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Introducción</b>	<b>4</b>
<b>4</b>	<b>Antecedentes</b>	<b>6</b>
4.1	Nombres del frijol en México	6
4.2	Orígenes del frijol	6
4.3	Descripción.Botánica	7
4.4	Estructura de las semillas de frijol	8
4.4.1	Exterior	9
4.4.2	Interior	9
4.5	Características de calidad del grano	12
4.5.1	Valor alimenticio	12
4.6	Preparación de los granos	13
4.6.1	Remojo de las semillas	13
4.6.2	El proceso de cocción	14
4.7	La pared celular	14
4.7.1	Proteínas	16
4.7.2	Celulosa	17
4.7.3	Hemicelulosas	18
4.7.4	Xiloglucanos	19
4.7.5	Pectinas	21
4.8	Modelo de la pared celular	22
4.9	Lamina media	24

5

<b>5 Hipótesis y Objetivos</b>	25
5.1 Hipótesis	25
5.2 Objetivo general	25
5.2.1 Objetivos particulares	25
<b>6 Materiales y Métodos</b>	26
6.1 Material biológico	26
6.2 Endurecimiento de las semillas	26
6.3 Remojo de las semillas	28
6.4 Determinación de los tiempos de cocción	28
6.5 Extracción de las pectinas de la pared celular de los cotiledones de los frijoles deteriorados, secos y remojados	31
6.6 Determinación del ácido urónico y azúcares totales por métodos químicos	34
6.6.1 Cuantificación de ácido urónico	35
6.6.2 Cuantificación de azúcares totales	35
6.7 Separación de las pectinas en una columna de intercambio iónico	36
6.8 Determinación de pesos moleculares	36
6.9 Cromatografía líquida de alta resolución	38
6.9.1 Hidrólisis de las pectinas	38
6.9.2 Composición porcentual de azúcares neutros de las pectinas	38
<b>7 Resultados y Discusión</b>	40
7.1 Identificación de las modificaciones que sufre la pectina durante el remojo de la semilla	40
7.2 Absorción de agua, determinación de tiempo de cocción de las semillas de frijol, aislamiento y caracterización de pectinas.	40
7.2.1 Absorción de agua	40
7.2.2 Tiempo de cocción de los frijoles	41
7.2.3 Extracción de pectinas	42

K

7.2.4	Composición porcentual de azúcares neutros en las pectinas	44
7.3	Peso molecular de las pectinas y fuerza de interacción de las pectinas con los iones	47
7.3.1	Filtración en gel	47
7.3.2	Fraccionamiento de las pectinas en una columna de intercambio ionico	50
8	Conclusiones	56
9	Modelo	57
Anexo 1	Preparación de la columna de intercambio ionico	61
Anexo 2	Preparación de la columna de pesos moleculares	62
	Bibliografía	63

## 1 RESUMEN

El almacenamiento de las semillas de frijol en condiciones inadecuadas (humedades relativas y temperaturas altas) resulta en un deterioro de las cualidades culinarias y nutritivas de la semilla. Este deterioro se puede manifestar de dos formas:

- a) Después del remojo de la semilla, como un incremento en el tiempo de cocción con respecto a los frijoles frescos: consecuencia de que la velocidad de termosolubilización de las pectinas de los cotiledones de los frijoles disminuyó;
- b) Incapacidad de los frijoles secos para cocerse: debido a que las pectinas no se termosolubilizan.

Estos hechos sugieren que en las semillas deterioradas las características de las pectinas presentes en los cotiledones de frijoles secos y remojados son diferentes.

Con la finalidad de identificar algunas de las características de las pectinas que permiten o no su termosolubilización en este trabajo se determinaron: la composición de azúcares de la pectina, su fuerza de interacción con iones  $\text{Ca}^{++}$  (de manera indirecta) y su peso molecular. Encontrando que la interacción de las pectinas con los iones y la composición de los azúcares neutros se modifica con el remojo, siendo estas modificaciones las responsables de la termosolubilización de las pectinas de los frijoles deteriorados.

## 2 JUSTIFICACIÓN

El frijol es un alimento ampliamente consumido en todo el mundo, pero principalmente en México, donde es la leguminosa más consumida. Ocupa el segundo lugar después del maíz, en cuanto a su consumo percapita, por otra parte es una importante fuente de ingresos para los campesinos de nuestro país, especialmente para los de los Estados de Zacatecas, Durango, Guanajuato, San Luis Potosí, Chihuahua, Chiapas y Puebla, pues ellos en el ciclo agrícola Primavera-verano de 1991 fueron los principales productores (INEGI 1997).

Además el frijol aporta una gran parte de las proteínas, carbohidratos, minerales y fibra a la dieta de los seres humanos, es barato y se puede preparar en una gran variedad de estilos y formas, siendo estas tan variadas como la imaginación lo permita. Pero cuando los frijoles se deterioran pierden gran parte de sus cualidades sensoriales pues su sabor y textura se vuelven un tanto desagradables, así mismo su valor nutritivo disminuye pues se pierden parte de las proteínas y vitaminas que contiene a causa del sobre cocimiento al que deben de ser sometidos para su consumo. Aumenta el costo de su preparación pues al requerirse de un mayor tiempo para su cocción también se requiere de una mayor cantidad de combustible.

Si bien es cierto que el deterioro de los frijoles se puede evitar almacenándolos bajo condiciones adecuadas, tales como: Cortos periodos de tiempo, y en almacenes con temperaturas y humedades relativas bajas, el lograr esto es casi imposible, pues la mayor producción de frijol se tiene en verano, cuando las temperaturas y humedades relativas son altas, además de que se tiene que almacenar el grano para su consumo en el resto del año.

Si además de lo anteriormente citado se tiene en cuenta de que en México se tienen malas técnicas de cosecha, aunadas a la ausencia de infraestructura y de equipo para limpieza y cribado, es fácil el suponer que gran parte de la producción se pierda a causa del deterioro del frijol ( se ha estimado que es alrededor del 30%), repercutiendo todo esto en pérdidas económicas tanto para los productores como para los consumidores (SAGARPA, 1997).

La finalidad de este estudio es conocer mejor los efectos del deterioro, pues al aumentar los conocimientos será más fácil resolver dicho problema.



### 3 INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es ampliamente consumido alrededor del mundo, pero principalmente en América latina y otros países en vías de desarrollo. El frijol se prepara de diversas maneras pero todas éstas requieren un pretratamiento, el cual consiste en remojar los granos de 8 a 12 horas, para posteriormente cocerlos en agua hirviendo hasta que estos adquieran características de textura y sabor deseables. Al periodo durante el cual los frijoles se mantiene en agua hirviendo para adquirir las características de sabor y textura deseables se le conoce como tiempo de cocción.

La suavización de los frijoles por medio de la cocción depende fundamentalmente de la separación de las células que los conforman, pues cuando esta separación no se da el ablandamiento es pequeño o no se da (Hincks y Stanley, 1986).

El material que mantiene unidas a las células de los frijoles es la lamina media, la cual esta constituida principalmente por pectinas. Estas son un grupo de polisacáridos que tienen en común la propiedad de ser extraíbles con soluciones acuosas de agentes quelantes. Entre las pectinas que conforman la lamina media de los cotiledones de los frijoles podemos contar: Homogalacturonanas, Ramnogalacturonanas I y II, Arabinanas. Xilanas, xiloglucanas (Stolle y col. 1999, García y Peña 1995, Thompson y Fry. 2000).

Los granos al ser almacenados durante largo tiempo con humedades relativas y temperaturas elevadas desarrollan un defecto caracterizado por el aumento en los tiempos de cocción, este defecto es conocido con diferentes nombres: Had too coock, endurecimiento, envejecimiento o deterioro.

Como resultado de diferentes investigaciones se sabe que el proceso de deterioro implica cambios estructurales, físicos y bioquímicos, en la semilla. Sin embargo el mecanismo por medio del cual se endurece el frijol es muy complejo ( Liu, 1995, Reyes y Paredes 1993).

La cocción de los frijoles deteriorados solo se realiza si las semillas se remojan previo al tratamiento térmico, lo cual puede implicar que durante el remojo del grano, las pectinas se modifiquen de tal manera que estas se puedan termosolubilizar.

Con la finalidad de identificar si el remojo de las semillas deterioradas provoca modificaciones en las pectinas de la lamina media del cotiledón, se aislaron las pectinas de los cotiledones de los frijoles deteriorados secos y remojados, comparando la composición de azucares neutros, pesos moleculares y afinidad con los iones  $Ca^{++}$  ( de manera indirecta).

## 4 ANTECEDENTES

### 4.1 NOMBRES DEL FRIJOL EN MÉXICO

De las más de 1300 especies de legumbres únicamente cerca de 20 son consumidas comúnmente por los humanos, una de ellas es el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) del cual se consume el grano (Reyes y Paredes, 1993), este recibe diferentes nombres dentro de nuestro país algunos de ellos son: Alubia (Aguascalientes, Durango, Jalapa, Puebla, Quintana Roo); Ayocote (D. F., Hidalgo, Estado de México, Morelia, Puebla, Queretaro, Tlaxcala); Bótil (Chiapas); Comba (Guerrero, Estado de México, Michoacán); Chichimequel (Veracruz); Habichuela (Durango); Ibe (Campeche, Quintana Roo; Yucatán); Judía (Guerrero, Estado de México, Michoacán, Mayocoba (Sinaloa); Patlaxte (Puebla), Patache (Chiapas); Patol (Durango, Zacatecas); Patoles (Aguascalientes); Tecomare (Chihuahua); Tepan (Sonora); Vigna (Bajacalifornia Sur); Xpelón (Campeche, Quintana Roo, Yucatan) (INEGI, 1997).

### 4.2 ORÍGENES DEL FRIJOL

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es una leguminosa originaria de América pero actualmente es cultivada en gran parte del mundo. Su producción se ha extendido desde los 52° N hasta los 32°S y desde el nivel del mar en América y Europa hasta altitudes de más de 3000 m en los andes suramericanos. El frijol fue domesticado originalmente en las tierras altas de Latinoamérica hace más de 7000 años, identificándose dos puntos separados en los cuales se comenzaron a cultivar, uno en el altiplano Mexicano (En el valle de Tehuacan, Puebla) y el otro en los Andes suramericanos (En el callejón de Huayales, Perú), los frijoles

cultivados en cada uno de estos puntos presentan diferencias agronómicas y morfológicas (Graham y Ranalli, 1997; Mendoza, 1992).

La dispersión de los frijoles alrededor del mundo aparentemente siguió diferentes rutas. Los frijoles del altiplano mexicano se dispersaron a centro América y norte de Brasil vía el caribe y en menor medida en el sudoeste de los Estados Unidos. La mayoría de los frijoles encontrados en Europa son del tipo de los frijoles de suramerica y probablemente fueron introducidos a través de la península ibérica y de ahí a África durante el trafico de esclavos y posteriormente al noreste de los Estados Unidos vía inmigración (Graham y Ranalli 1997).

#### 4.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es una leguminosa, tribu Phaseoleae, subfamilia Papilionoideae (Reyes y Paredes, 1993).

Debido al gran número de variedades, se clasifican normalmente, según su porte, en dos grupos: arbustivas, de crecimiento bajo y determinado; y en trepadoras, de tallos largos y crecimiento indefinido, aunque es importante aclarar que durante la germinación la planta es esencialmente trepadora y que conforme se desarrolla adquiere cualquiera de las dos características antes mencionadas. La abundancia de ramificación y follaje, así como la duración de ciclo vegetativo, también son importantes para su clasificación (INEGI, 1997).

En la planta madura el tallo es aristado o cilíndrico, hueco y con la epidermis pubescente o lisa. Las hojas superiores (exceptuando las dos primeras en la germinación, que son simples y opuestas) son alternas y compuestas, se forman de tres folíolos, con el haz frecuentemente piloso, el central es obovado y simétrico, los laterales asimétricos, con la base del peciolo engrosada, debajo de la cual hay un par de estípulas; el tamaño y forma de la hoja varían

considerablemente según la variedad o los factores ambientales. Las flores son amariposadas, bisexuales, su color varía del blanco al morado y aunque el color de la semilla y el de la flor es genéticamente independiente se puede establecer generalmente una relación entre ambos. Una característica distintiva del género es que el ápice de la quilla está arrollado en espiral; las flores están dispuestas en racimos en las axilas de las hojas, los racimos pueden variar desde una flor hasta varias de ellas (Graham y Ranalli, 1997). El fruto es una legumbre dehiscente, puede ser aplanada, recta o curva, con ápice encorvado o recto, el color es variable, de verde uniforme a morado casi negro; contiene varias semillas de forma que van desde la esférica hasta la casi cilíndrica, siendo la más común la arriñonada, la coloración externa también varía mucho, de negro a blanco, pasando casi por toda la gama de colores y puede ser uniforme, jaspeada, punteada o manchada, el peso de las semillas varía desde los 50 mg en algunas variedades salvajes de México hasta más de 2000 mg en algunas variedades colombianas (Reyes y Paredes 1997).

Las semillas de frijol tardan en germinar entre 5 y 7 días en el suelo, el tiempo de florescencia varía de acuerdo con el cultivar, la temperatura y la cantidad de luz (Graham y Ranalli, 1997)

#### **4.4 ESTRUCTURA DE LAS SEMILLAS DE FRIJOL**

Las semillas de frijol son un fruto el cual se desarrolla a partir de un óvulo. El frijol se encuentra contenido en una vaina (que cuando esta verde y no ha madurado se conoce como ejote), la vaina puede ser recta o arqueada, la cual al abrirse en dos valvas deja al descubierto las semillas. En el exterior de las semillas se pueden apreciar las siguientes estructuras: testa, micropilo, hilo y lentilla, en el interior de la semilla se pueden apreciar

dos cotiledones, y un eje embrionario formado por epicotilo e hipocotilo. (Reyes y Paredes, 1993, Graham y Ranalli 1997)

#### **4.4.1 EXTERIOR**

La testa es la capa que cubre a los cotiledones y al embrión protegiéndolos del exterior. Además en ésta se encuentran las características de color y diseño que caracterizan a las semillas de cada cultivar, estas características se forman durante el desarrollo de las semillas.

El hilo es una cicatriz ovalada que aparece en el lugar donde la semilla estaba unida al funículo.

El micropilo es una abertura pequeña por la cual penetró el polen al óvulo.

La lentilla, que son un grupo de células que rompen la testa y facilita el intercambio de gases, se especula que junto con la testa, el micropilo y el hilo forman un sistema integral de absorción de agua a la semilla (Reyes y Paredes, 1993; Liu, 1995) (Figura A).

#### **4.4.2 INTERIOR**

Los cotiledones se encuentran directamente por debajo de la testa y constituyen la mayor parte de la semilla (el 90%), en ellos se encuentran las sustancias de reserva (Proteínas, lípidos y carbohidratos), por la desecación que sufre la semilla al madurar, las células parenquimatosas de los cotiledones reducen los organelos celulares, solamente contienen gránulos de almidón, diseminados cuerpos proteicos y lipídicos (Tovar, 1997), los cotiledones se encuentran a los lados del epicotilo el cual dará origen al tallo que tendrá por sus dos primeras hojas a los cotiledones. El hipocotilo dará origen a la radícula, la cual posteriormente se transformara en la raíz de la planta (Reyes y Paredes, 1993) Figura B.

FIGURA A

EXTERIOR DE LA SEMILLA DE FRIJOL

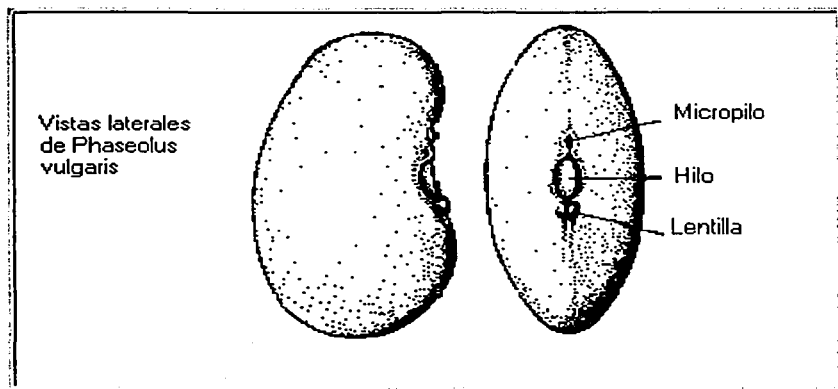
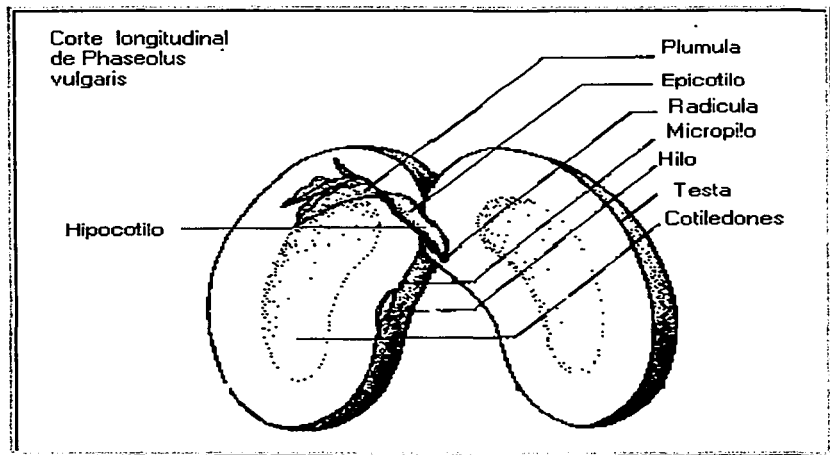


FIGURA B

INTERIOR DEL FRIJOL





#### 4.5 CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD DEL GRANO

La calidad del grano está asociada a factores tales como: valor alimenticio, características de remojo y tiempos de cocción.

Estos factores se encuentran afectados por las características genéticas de los granos e influencias ambientales (Hincks y Stanley, 1986, Kyriakidis y col 1997).

##### 4.5.1 VALOR ALIMENTICIO

Los frijoles comunes son una importante fuente de proteínas y una excelente fuente de carbohidratos. Aportan una importante cantidad de fibra soluble, la cual es particularmente efectiva en el control del colesterol en la sangre, además de agilizar la circulación de los alimentos a través del aparato circulatorio (McDougall y col 1996). Los frijoles comunes son bajos en sodio y una buena fuente de vitaminas tales como:

Tiamina o vitamina B<sub>1</sub>, Ribofabina, Niacina, Vitamina B<sub>6</sub> y ácido fólico y una gran cantidad de minerales tales como: Calcio, Hierro, Cobre, Zinc, Potasio, y Magnesio, además de aportar una gran cantidad de ácidos grasos poli insaturados tales como: Linoleico o vitamina F, y Linolenico. Además de tener todos estos nutrimentos, los frijoles se pueden almacenar por largos periodos de tiempo.

Pese a todas estas ventajas los frijoles presentan varios aspectos no deseables, inhibidores enzimáticos, producción de flatulencias y hemaglutininas. Todos estos factores indeseables pueden ser eliminados con una correcta preparación de los frijoles. (Reyes y Paredes, 1993).

Es importante mencionar que cuando los frijoles se endurecen se prolongan los tiempos de cocción lo cual repercute en la disminución de su valor nutritivo, pues se pierden proteínas y vitaminas termo sensibles (Martín y col, 1995).

#### **4.6 PREPARACION DE LOS GRANOS**

La preparación de los frijoles para su consumo es muy variada y depende en gran medida de las costumbre y gustos de cada región, pero en general se siguen dos pasos fundamentales, los cuales son: el remojo de las semillas durante periodos que van desde 18 a 24 horas y la cocción de los mismos en agua hirviendo, siendo el tiempo de cocción de los frijoles dependiente de las características propias del grano así como de las condiciones de almacenamiento (Reyes y Paredes; 1993).

##### **4.6.1 REMOJO DE LAS SEMILLAS**

En los frijoles frescos el remojo ayuda a ablandarlos, siendo este ablandamiento dependiente de la cantidad de agua absorbida y del tiempo de remojo (Nissreen; 1998)..

En las primeras etapas del remojo de los frijoles los cotiledones tienden a absorber agua rápidamente, seguida de una etapa en la cual la absorción de agua es lenta (Hincks y Stanley; 1986; Nissreen; 1998).

Como consecuencia del remojo de las semillas de frijol frescas ocurren una serie de cambios en los elementos que constituyen a las células:

- Los granos de almidón se hidratan e hinchan
- Lo cual ocasiona un aumento en el turgor de las células, que tiene como consecuencia una
- Disminución en la adhesión entre las células adyacentes.

#### **4.6.2 EL PROCESO DE COCCIÓN**

Durante el proceso de cocción de los frijoles frescos ocurren una serie de cambios estructurales y químicos en las semillas de frijol, pues el calor aplicado provoca la gelatinización de los gránulos de almidón, degradación y/o solubilización de las sustancias pecticas y la desnaturalización de las proteínas del citoplasma, estos cambios contribuyen de una manera fundamental en el ablandamiento de la semilla y la adquisición las características de palatabilidad deseadas.

#### **4.7 LA PARED CELULAR**

La concepción de la pared celular como celdas estáticas y rígidas desde los días de en que fueron observadas por primera vez por Roberto Hooke en 1661, comenzó a cambiar apenas hace un poco mas de 40 años, cuando en la década de 1960 los investigadores voltearon literalmente sus lentes para observarlas. Descubriendo que ellas tenían diferentes formas y funciones. Los químicos comenzaron a descubrir los componentes que las integraban, pero fue hasta el final de la década de 1980 cuando se comenzaron a formular los primeros modelos de las paredes celulares que fueran congruentes con las observaciones de las mismas durante el crecimiento de las células (Carpita y Gibeaut, 1993, García y Peña 1995).

La pared celular en los vegetales tiene múltiples funciones, pudiéndose reconocer al menos 3 fundamentales, las cuales son:

- Reconocimiento celular, pues es la capa más externa de las células vegetales
- Transporte de las macromoléculas y otras sustancias entre las células
- Otorga fuerza y rigidez a los tejidos vegetales (García y Peña 1995, Carpita y Gibeaut 1993)

La textura de los vegetales esta determinada en gran medida por la composición de las paredes celulares (Coimbra y col; 1996) y su anatomía celular (Tsutomu y Klaus; 1987).

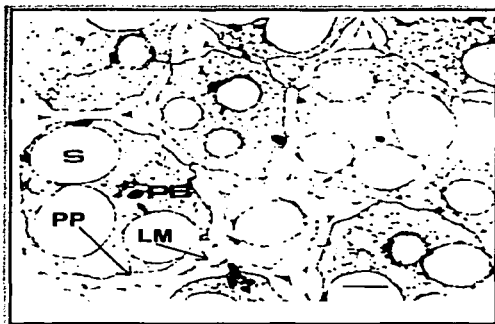
La pared celular de los cotiledones (Figura C) esta rodeada por la lamina media (Reyes y Paredes, 1993), esta no es una estructura estática, pues se está modificando continuamente durante el desarrollo de la semilla (Stolle y col, 1999), durante el almacenamiento de los granos maduros los cambios continúan, debido a diversos factores, como lo son: la temperatura, humedad, tiempo, etc. (Martin y col, 1995).

Las paredes celulares son químicamente complejas. La complejidad se incrementa si tomamos en cuenta la composición, organización y proporción se modifica durante el desarrollo de la semilla (Stolle y col, 1999) y la exposición de la misma a los factores ambientales (Carpita y Gibeaut, 1993).

En una forma general las paredes celulares están compuestas de proteínas y micro fibras de celulosa, embebidas en una matriz de pectinas y hemicelulosas (McDougall y col, 1996).

Figura C

Estructura de las células de los cotiledones de frijol común



Abrebiaturas: S: Granulos de almidón; PB: Cuerpos proteicos; PP: Pared primaria; LM: Lamina media. Tomada de (Reyes y Paredes, 1993),

#### 4.7.1 PROTEINAS

A pesar de que los componentes mayoritarios de la pared celular son los polisacáridos, se sabe desde hace tiempo de la presencia de proteínas, especialmente en las paredes primarias.

Todas las proteínas de pared analizadas en detalle han resultado ser glicoproteínas. Algunas de estas glicoproteínas de pared juegan un papel estructural importante, mientras que otras poseen funciones enzimáticas dentro del metabolismo de la pared celular (García y Peña: 1995).

Entre las proteínas de la pared celular podemos contar: Pectín metilesterasa, poligalacturonasas, peroxidasa, glicosidasa, y pectinasas (Stolle y col, 1999, García y Peña, 1995).

Estas enzimas son muy activas en las primeras fases del desarrollo de las paredes celulares de los cotiledones, manteniéndose relativamente elevada su actividad al final del desarrollo de las semillas (Stolle y col, 1999), pero la facilidad con que estas pueden ser extraídas de las paredes celulares disminuye con el deterioro (Martin y col, 1995), lo cual es un indicio de que estas van perdiendo su actividad, pues ya no pueden actuar tan fácilmente sobre sus sustratos (Hincks y Stanley; 1986)

#### 4.7.2 CELULOSA

La celulosa es una molécula lineal constituida por unidades de  $\beta$  - D - Glucosa, unidas con enlaces glucosídicos en posición  $\beta$  1  $\rightarrow$  4 (Figura D). En la pared celular un número variable de cadenas, o moléculas individuales, de celulosa se unen y forman agregados, dando origen a estructuras llamadas microfibrillas (Figura E), estas dan origen a lo que se conoce como fase microfibrilar de la pared celular. Las microfibrillas de celulosa tienen dos formas de organización, pueden organizarse en regiones donde los grupos hidroxilo (-OH) de los azúcares que las constituyen tienen un arreglo simétrico preciso (región cristalina), el cual le confiere notable resistencia a la tensión, y en regiones menos ordenadas (región paracristalina), organizadas por la presencia de moléculas de agua y residuos de polisacáridos no hemicelulíticos, ubicados en el exterior del eje de simetría de las microfibrillas (García y Peña, 1995).

Figura D

Molécula de celulosa

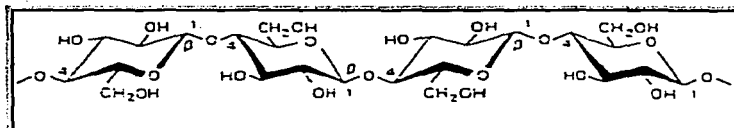
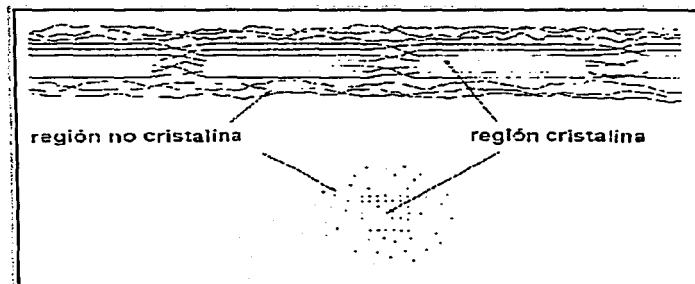


Figura E

Organización de las microfibrillas de celulosa



Tomado de Gracia y Peña 1995

#### 4.7.3 Hemicelulosas

Las hemicelulosas son un grupo heterogéneo de polisacáridos, cuya composición colectiva varía mucho, caracterizadas por ser insolubles en agua caliente o fría. ser insolubles en agentes quelantes o soluciones ácidas diluidas, pero que se pueden solubilizar en álcalis

fueres. Una vez extraídas de la pared celular, la mayoría pasa a ser soluble en agua (McDougall y col, 1996; Redgwell y Hansen, 2000). Este requerimiento de soluciones alcalinas fuertes para su extracción de las paredes, se debe a la existencia de numerosos puentes de hidrogeno entre las hemicelulosas y las fibras de celulosa (Carpita y Gibeaut, 1993) como se muestra en la figura F.

Las interacciones entre las hemicelulosas y las fibras de celulosa tienen por finalidad el crear un balance entre la resistencia y la flexibilidad de las paredes celulares (Whitney y col, 1999).

Las hemicelulosas tienen tres grandes subgrupos, los cuales son: a) Xilanas, que incluyen a las Arabinoxilanas y a los Xiloglucanos; b) Mananas que incluyen a las Glucomananas, Glucuromananas, entre otras; y c) Galactanas en las que se localiza a las Galactomananas y Arabinogalactanas (Gracia y Peña, 1995)

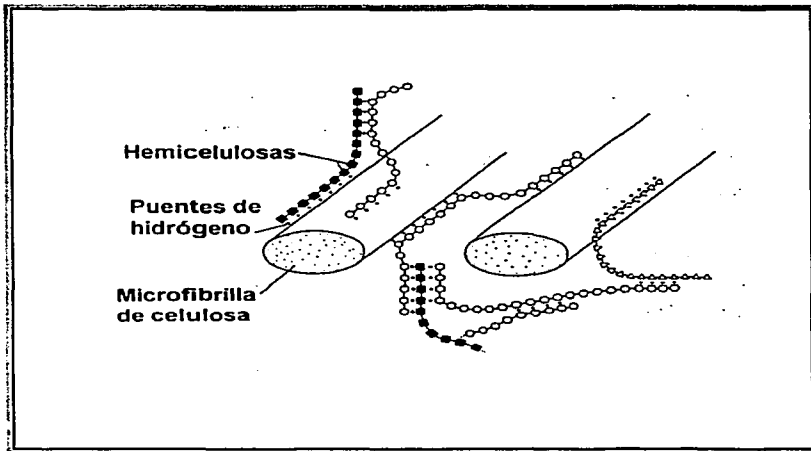
#### 4.7.4 XILOGLUCANOS

Las moléculas de xiloglucanos constituyen del 20 al 25% de la materia seca de las paredes primarias de los dicotiledones, encontrándose también presentes en la lamina media (García y Peña, 1995), estos son también conocidos como amiloides, ya que pueden teñir con yodo (Rodríguez y col, 1998). Los xiloglucanos (figura G) son una hemicelulosa neutra, formada por unidades de glucosa con uniones  $\beta - 1 \rightarrow 4$  y sustituyentes de xilosa o fructosa (Thompson y Fry, 2000).



Figura F

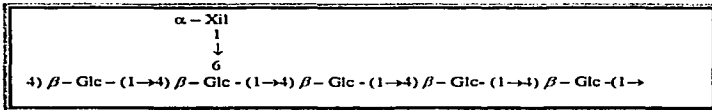
Microfibras de celulosa ínter actuando con hemicelulosas



Tomado de Gracia y Peña 1995

Figura G

Estructura de una Xiloglucana



Abreviaturas: Glc: glucosa; Xil: Xilosa

#### 4.7.5 PECTINAS

Las pectinas o sustancias pecticas constituyen un grupo de polisacáridos ricos en ácido galacturónico y, en menor medida, ramnosa, arabinosa y galactosa. Al igual que en otros grupos de polisacáridos de la pared celular, la definición de pectinas es operativa y se basa en la extracción de las mismas, con soluciones acuosas de un agente quelante o bien, extracción con una solución ácida diluida (Rodríguez y col; 1998).

Las pectinas tienen un papel esencial en la estabilidad de la pared celular, pues existe evidencia de que estas están unidas a otros componentes de la pared celular por medio de puentes de hidrogeno con otras pectinas e iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Carpita y Gibeau, 1993), enlaces covalentes con xiloglucanas (Thompson y Fry, 2000), participando de esta manera en la estabilidad de las paredes celulares.

Con base en la composición de su cadena principal, las pectinas se han clasificado en cuatro tipos de estructuras, las cuales son:

- a) Homogalacturonanas, que es una cadena lineal de  $\alpha$  - 1-4 ácido galacturónico, las cuales tienen insertadas a las Ramnogalacturonanas
- b) Ramnogalacturonanas I que son el componente más abundante de la pared primaria y lamina media de las dicotiledóneas y estas están constituidas por una cadena principal de  $\alpha$  - 1,4 ácido galacturónico con uniones  $\alpha$  - 1,2 ramnosa.
- c) Ramnogalacturonanas II: Caracterizadas por un alto grado de polimerización y estructura compleja que incluye como substituyentes ácido acético, apiosa y otros.
- d) Arabinanas las cuales están constituidas por una cadena principal de  $\alpha$  - 1-4 arabinosa altamente ramificada con residuos laterales de  $\alpha$  - 1-2 o  $\alpha$  - 1-3 arabinosa.

#### 4.8 MODELO DE LA PARED CELULAR

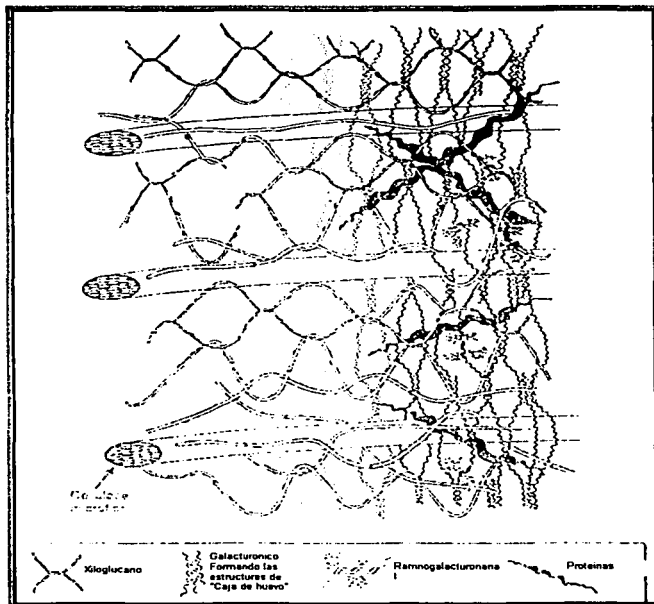
Carpita y Gibeaut (Carpita y Gibeaut, 1993) proponen un modelo de la pared celular en el cual se pueden observar las interacciones de cada uno de los componentes de la pared celular antes mencionados. (Figura H).

En una primera fase estructural se encuentran las microfibras de celulosa, las cuales en su superficie tienen unidas a las hemicelulosas. Esta interacción proporciona a las paredes celulares resistencia y flexibilidad (Whitney y col:1999), en un tercer plano estructural encontramos a las pectinas, las cuales están unidas a las hemicelulosas por medio de puentes de hidrogeno y enlaces covalentes, sirviendo así, no solamente como elementos de relleno sino además participando en la firmeza de la pared celular.

Finalmente se encuentran las proteínas, las cuales juegan un papel fundamental en el desarrollo de las paredes celulares, pues estas son las encargadas de organizar a los polisacáridos durante el crecimiento y desarrollo de las paredes celulares.

Figura II

Modelo de la pared celular primaria



Propuesto por Carpita y Gibeaut (1993)

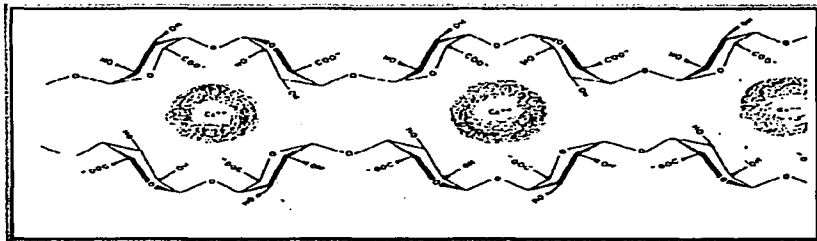
#### 4.9 LAMINA MEDIA

La lamina media es la primera región que se forma cuando la célula se divide y es por ello la frontera inicial entre las dos células hijas recién formadas (García y Peña; 1995), esta permanece entre las células y sirve para mantener unidas a las células adyacentes, pues cuando estas se termosolubilizan las células se separan, produciéndose así la cocción de los vegetales (Bernal y col, 1997).

Esta capacidad de “pegado” entre las pectinas esta dada principalmente por las interacciones entre las regiones de homogalacturonanos con los iones  $Ca^{++}$ , estas interacciones tienden a formar estructura conocidas como “cajas de huevo”, en las cuales los iones calcio son atrapados entre cadenas de homogalacturonanos, estabilizándose estas estructuras por interacciones iónicas (Figura I).

Figura I

Estructura conocida como “Caja de huevo”



## **5 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **5.1 HIPOTESIS**

Si solamente tras el remojo las semillas de frijol deteriorado logran cocerse, entonces durante el remojo, las pectinas de la lamina media de los cotiledones de los frijoles deteriorados sufren algún tipo de modificación, que favorece su termosolubilización.

### **5.2 OBJETIVO GENERAL**

El objetivo de este estudio, es conocer las modificaciones que sufren las pectinas de la lamina media de los cotiledones de los frijoles deteriorados durante el remojo de las semillas

#### **5.2.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar si existen diferencias en los tiempos de cocción de los frijoles deteriorados secos y remojados.
2. Determinar si existen variaciones en la composición de azúcares de las pectinas extraídas de las paredes celulares de los frijoles.
3. Determinar si existen cambios en los pesos moleculares de las pectinas de la lamina media de los cotiledones de los frijoles deteriorados durante el remojo de las semillas
4. Determinar si el remojo modifica la afinidad de las pectinas de la lamina media de los cotiledones de los frijoles deteriorados por los iones  $\text{Ca}^{++}$

## **6 MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 MATERIAL BIOLÓGICO**

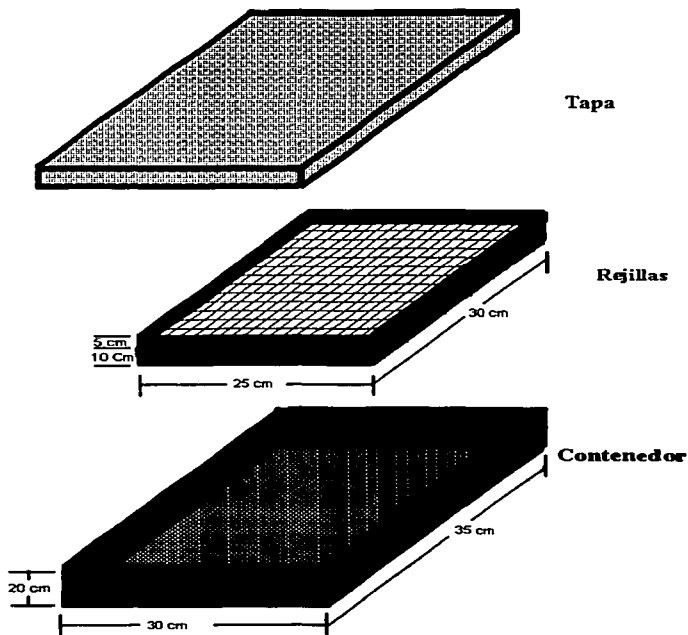
En este trabajo se emplearon dos variedades de frijol: Flor de mayo (FM) y Bayo Mecentral (BM) y una línea: 2626. Donadas por la doctora Carmen Jacinto de CEVAMEX, INIFAP

### **6.2 ENDURECIMIENTO DE LAS SEMILLAS**

Todos los experimentos fueron realizados con las semillas deterioradas de la siguiente manera: En un recipiente con cierre hermético y dos compartimentos con una separación física permeable a la humedad (Figura J), se colocó en la parte inferior una solución salina preparada con 39.2 g NaCl (J. T. Baker) en 100 ml de agua desionizada, la cual proporcionaba una humedad relativa de 75%. En el compartimento superior se colocaron las semillas cuidando de que estas no se mojaran con la solución salina.

Posteriormente se introdujo el recipiente herméticamente cerrado en un horno a 40 °C, durante 30 días.

Figura J  
CÁMARA DE DETERIORO



La cámara de deterioro esta conformada por un contenedor y tapa de plástico, la cual sella herméticamente y es impermeable a la humedad. La rejilla que proporciona la separación física entre las semillas y la solución salina también es de plástico laminado, la cual tiene en su superficie perforaciones de 3 mm cuadrados (las cuales la atraviesan de un lado a otro) separadas entre si por 2 mm.



### **6.3 REMOJO DE LAS SEMILLAS**

Se colocaron las semillas en un matraz con agua desionizada, durante 18 horas en una estufa a 32°C. Transcurrido este período se pesaron los cotiledones de las semillas. Por medio de la diferencia entre el peso de los cotiledones remojados y las semillas secas se determinó la cantidad de agua absorbida.

Debido a que tras el remojo de las semillas, éstas contenían una gran cantidad de agua entre el cotiledón y la testa, fue preciso eliminar esta última para determinar el agua absorbida, asumiendo que la testa conforma una mínima parte del peso total de la semilla seca, se considero que el error en la determinación gravimétrica causado por la eliminación de esta fue despreciable.

### **6.4 DETERMINACIÓN DE LOS TIEMPOS DE COCCIÓN**

El tiempo de cocción de las semillas fue determinado por medio del método de Mattson modificado (Jackson y Variano 1981). Este método permite medir cuantitativamente la cocción de los frijoles, siendo reproducible y sencillo.

El material empleado en este método consta de: 25 varillas, igual número de pesas (de 200 gramos cada una), una olla de aluminio, un capuchón de plástico para tapar la olla y tres platos sostenidos por medio de tornillos, el primero a 5 cm de el fondo de la olla, guardando una separación entre cada plato de 15 cm. Cada plato contiene perforaciones distribuidas uniformemente en su superficie de tal suerte que las perforaciones de cada uno de los platos coincide una sobre otra. El plato inferior cuenta además con zonas cóncavas en cuya parte más profunda se encuentra el agujero que atraviesa el plato (Figura K).

Este método consiste en colocar una semilla dentro de cada depresión del plato y sobre esta una varilla con una pesa (siendo la varilla sostenida verticalmente por las perforaciones de

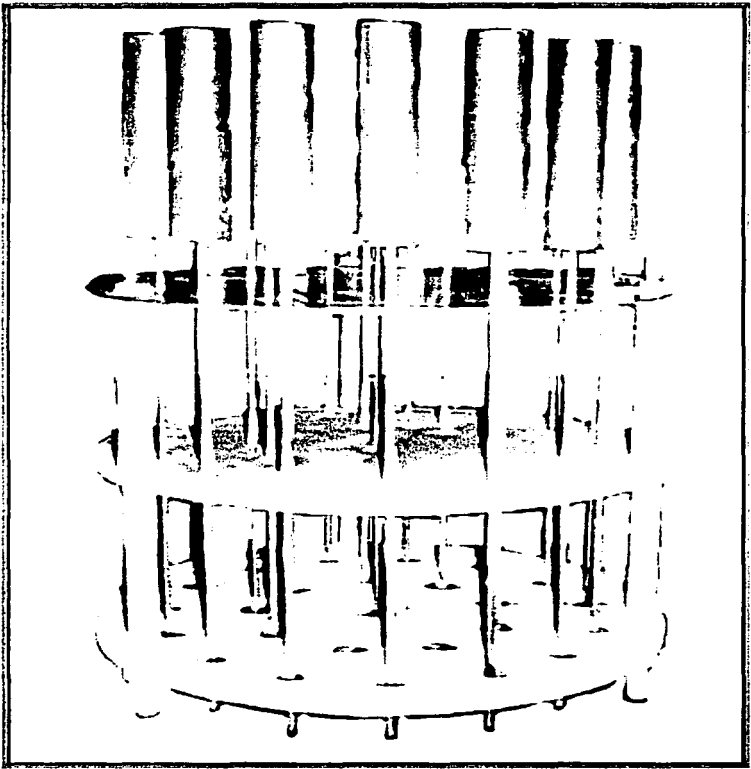
los dos platos superiores). Todo este sistema se coloca en la olla con agua hirviendo, cuidando que las semillas siempre se encuentren sumergidas en el agua en ebullición, posteriormente se tapa la olla. Cuando las semillas alcanzan cierta textura son atravesadas por las varillas.

Al realizar una gráfica de las semillas que han sido atravesadas por las varillas en un intervalo, se puede conocer el  $t_{50}$ , que representa el tiempo de ebullición en el cual la mitad de las semillas se ha suavizado.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura K

Cocedor de Frijoles Mattson



## **6.5 EXTRACCIÓN DE LAS PECTINAS DE LA PARED CELULAR DE LOS FRIJOLES DETERIORADOS, SECOS Y REMOJADOS**

Para preparar la harina se empleo una modificación de los métodos propuestos por Redgwell y Hansen (Redgwell y Hansen, 1999) y Coimbra y col (Coimbría y col 1996). Se colocaron los cotiledones de las semillas (2.5 gr) en un mortero y congelaron con nitrógeno líquido, posteriormente se molieron en el mismo, hasta obtener una harina fina.

Para inactivar las enzimas que aún pudiesen tener actividad, en los cotiledones deteriorados se empleo una modificación del método propuesto por Howard y col (Howard y col 1997). Se colocó la harina a ebullición con agitación en metanol (J. T. Baker) al 80%, manteniendo el volumen constante durante una hora. Cuando se atemperó esta mezcla fue centrifugada a 3000 rpm en una centrifuga media Sorvall T21 con un rotor SI 50T.

Para la extracción de la pectina se siguió una modificación del metodo de Coimbra (Coimbría y col 1996). El material insoluble en metanol fue transferido a un matraz con CDTA 50 mM (Sigma – Chemical 91H2629, el cual es un agente quelante empleado para atrapar el calcio y facilitar la solubilización de las pectinas) en una relación 1:4 (p / v) y se mantuvo en agitación constante durante 2 horas. Posteriormente la mezcla fue centrifugada a 3000 rpm en una centrifuga media Sorvall T21 con un rotor SI 50T (para facilitar la separación del material soluble e insoluble en CDTA). Se separó por decantación el material soluble en el CDTA y se guardó a 4° C.

El material insoluble se empleo para las siguientes extracciones que duraron 18, 2 y 2 horas, guardando en cada ocasión el material soluble a 4°C y empleando para las extracciones sucesivas el material insoluble en CDTA. Obteniéndose de esta manera los mejores rendimientos en la extracción de las pectinas.

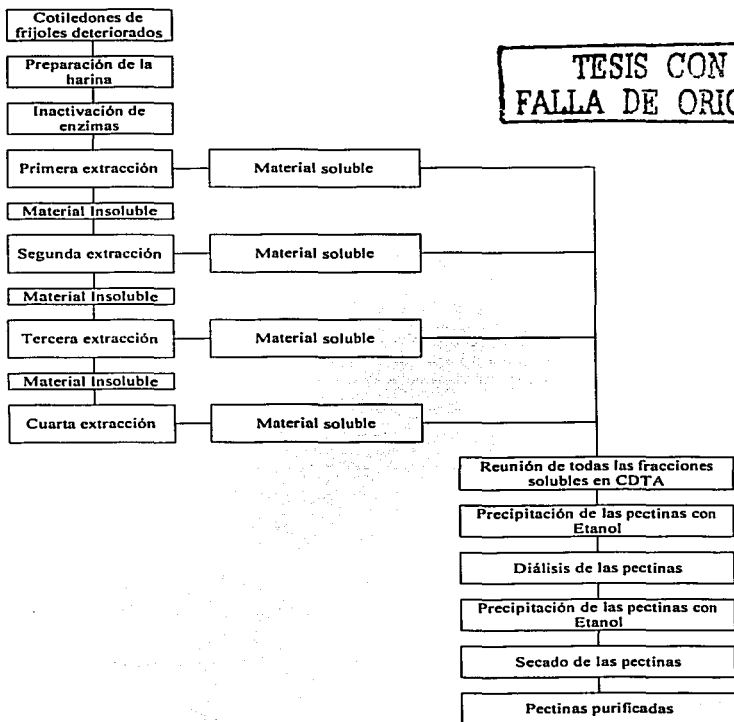
Se juntaron todas las fracciones solubles en CDTA y se centrifugaron a 55000 rpm, durante 30 minutos a 4°C en una ultra centrifuga Beckman XL 100 K con un rotor 60ti, cuantificando en el sobrenadante los azúcares totales y el ácido urónico por medio de los métodos de Dubois (Dubois y col 1956) y Blumenkrantz (Blumenkrantz y Asboe, 1973) respectivamente.

Coimbra y col (Coimbra y col 1996) ajustan el pH con ácido acético, pero también es muy común ajustar el pH o realizar las extracciones con ácido clorhídrico (Carmejo y col 1996, Bellido 1992 y Sharma y col 1998), por lo cual se empleo este para ajustar el pH a un valor de 6.5 con HCl (J. T. Baker) 2M para precipitarlo con etanol industrial al 85% en un baño de hielo durante una hora, pues se observo que de esta manera aumentaba el rendimiento. La suspensión se centrifugó a 12000 rpm en la centrifuga media Sorvall T21 con un rotor S1 50T 5 minutos a temperatura ambiente.

La pastilla se resuspendió en la menor cantidad de agua posible y se dializó con membranas de celulosa (Spectrum 25221 - 698), terminándose la diálisis cuando la conductividad eléctrica del agua no cambiaba en un periodo de 2 horas. La pectina dializada se precipitó nuevamente con cuatro volúmenes de etanol al 85% en un baño de hielo durante 1 hora. Para facilitar la separación de las pectinas del etanol se centrifugo a 12000 rpm durante 5 minutos en una centrifuga media Sorvall T21 con un rotor S1 50T a temperatura ambiente.

La pastilla se secó al vacío en cajas de Petri hasta alcanzar peso constante. Las muestras secas fueron cuantificadas químicamente para obtener el rendimiento final, por medio de los métodos de Blumenkrantz (Blumenkrantz y Asboe, 1973) para Ácido urónico y el de Dubois (Dubois y col 1956) para los azúcares totales (Diagrama 1).

**Diagrama 1**  
Extracción de las pectinas de la pared celular de los cotiledones de los frijoles deteriorados, secos y remojados



## **6.6 DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO URÓNICO Y AZÚCARES TOTALES POR MÉTODOS QUÍMICOS**

Las pectinas fueron cuantificadas químicamente por medio de los métodos de Blumenkrantz (Blumenkrantz y Asboe, 1973) para ácido urónico y el de Dubois (Dubois y col 1956) para los azúcares totales.

Dado que en un experimento anterior, se observó que no era posible el cuantificar el 100% de los azúcares totales y ácido urónico en las pectinas cítricas por medio de estos métodos (es decir los resultados obtenidos no coincidían con los del análisis proximal de las pectinas cítricas), se realizaron las siguientes correcciones:

- a) Para obtener el ácido urónico total la cantidad de ácido urónico determinada fue multiplicada por 100/67.
  - b) Para obtener los azúcares totales a la cantidad determinada, se le sumó la mitad del ácido urónico total.
  - c) Los azúcares neutros se obtuvieron restando a los azúcares totales el ácido urónico total. Obteniéndose de esta manera los resultados reportados en la etiqueta de la pectina cítrica.
- También se observó que el solvente en que se encontraban disueltas las pectinas influía en la determinación de los azúcares totales y ácido urónico, por lo cual se realizaron las curvas patrón requeridas para cada determinación con el solvente en el cual se encontraban disueltas las pectinas en ese experimento

### **6.6.1 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO URÓNICO**

El método de Blumenkrantz para Ácido urónico consta de los siguientes pasos:

De las soluciones de pectina se tomaron en tubos de ensaye alicuotas, agregándoles agua suficiente para completar 400 $\mu$ l, los tubos fueron colocados en baños de hielo 1 minuto, tras éste periodo, se les adicionó 2.4 ml de una solución de ácido sulfúrico (Mallinckrod)/ tetraborato (Carloerba) 0.0125 M, agitando los tubos tras la adición y dejarlos reposar otro minuto en el baño de hielo, posteriormente, las muestras fueron colocadas en un baño de agua hirviendo 5 minutos, tras lo cual fueron enfriadas en agua helada: un minuto, posteriormente se les adiciono una solución de O - hidroxifenil (Aldrich) al 0.15% (p/v), dejando incubar los tubos a temperatura ambiente 30 minutos, agitando esporádicamente. Al finalizar la incubación las muestras fueron leídas a 520 nm en un espectrofotometro sequoia turner modelo 340. Interpolándose los resultados en una curva patrón de ácido galacturónico (Sigma - Chemical) de 0 a 90  $\mu$ g.

### **6.6.2 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES TOTALES**

Los azúcares totales fueron cuantificados por el método de Dubois (Dubois y col. 1956), el cual consiste en tomar en tubos de ensaye alicuotas de la solución de pectina, agregándole agua suficiente para completar 500  $\mu$ l, posteriormente se le agrego 0.3 ml de fenol (Baker) acuoso al 5% (p/v) y 1.8 ml de ácido sulfúrico (Mallinckrodt) concentrado, dejándolos incubar 10 minutos. Para finalmente ser leídas las absorbancias de las muestras en un espectrofotometro sequoia turner modelo 340 a 485 nm.

Interpolando los resultados en una curva patrón de glucosa (Sigma - Chemical) de 0 a 50  $\mu$ g



## **6.7 SEPARACION DE LAS PECTINAS EN UNA COLUMNA DE INTERCAMBIO IONICO**

Se preparo una columna de intercambio ionico como se muestra en el anexo 1 y posteriormente fue filtrada en la misma 1 ml de una solución de pectina que contenía de 1 mg de pectina / ml de bufer de fosfatos pH 6.5 (cuantificada químicamente como azúcares totales).

La columna se eluyo con un bufer de fosfatos pH 6.5 con las siguientes concentraciones de cloruro de sodio: 0.00, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 y 2.00 M modificando la concentración de NaCl cada 25 ml para crear el gradiente salino, recolectándose fracciones de 2.5 ml en un colector de fracciones (Biorrad modelo 2110). En las pectinas filtradas se cuantificaron ácido urónico y azúcares totales por medio de los métodos de Blumenkrantz (Blumenkrantz y Asboe, 1973) y Dubois (Dubois y col 1956) en cada una de las fracciones.

## **6.8 DETERMINACIÓN DE PESOS MOLECULARES**

Se preparo la columna de pesos moleculares como se muestra en el anexo 2 y posteriormente, se preparó una solución de las pectinas extraídas en un bufer de acetato de amonio (pH 5), de 1.5 mg de pectina/ ml de bufer de acetatos (cuantificada químicamente como azúcares totales).

La solución de pectina (3 ml) fue separada en la columna de pesos moleculares sephacryl s 400, empleando como eluyente el mismo bufer de ácidos, con una velocidad de flujo de 0.747 ml/min, recolectando fracciones de 2.5 ml en un colector de fracciones (Biorrad modelo 2110), cuantificando el ácido urónico y azúcares totales de las pectinas por medio

de los métodos de Blumenkrantz (Blumenkrantz y Asboe, 1973) y Dubois (Dubois y col 1956) en cada una de las fracciones.

Los marcadores de pesos moleculares empleados fueron: azul de dextran de peso molecular superior a  $2 \times 10^6$  y dextranas con pesos moleculares de  $5 \times 10^5$ ,  $7 \times 10^4$  y  $6 \times 10^3$  donadas por el doctor en biotecnología Agustín López - Munguía Canales, investigador del instituto de biotecnología de la UNAM.

## **6.9 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN**

### **6.9.1 HIDRÓLISIS DE LAS PECTINAS**

Se pesaron alrededor de 5 mg de pectina en un vial limpio, a las cuales se le agregó 850  $\mu$ l de agua desionizada para disolverlas, posteriormente se agregaron 2.5 mg de mioinositol (J. T. Baker), una vez que todo esto se disolvió se agregaron 150  $\mu$ l de ácido trifluoro acético 2M, las muestras fueron colocadas en un block de calentamiento y cuando este alcanzó 121°C se mantuvieron a esta temperatura durante dos horas. una vez frías las muestras se eliminó el ácido mediante circulación forzada de nitrógeno gas. Para eliminar todo el ácido se realizaron lavados con 1 ml de alcohol isopropílico hasta que este alcanzó un pH entre 4 y 5, eliminando el alcohol por medio de la circulación forzada del nitrógeno, en ese momento las muestras fueron resuspendidas en 300  $\mu$ l de agua desionizada, cuantificando ácido urónico y azúcares totales por medio de los métodos de Blumenkrantz (Blumenkrantz y Asboe, 1973) y Dubois (Dubois y col 1956).

### **6.9.2 COMPOSICIÓN PORCENTUAL DE AZÚCARES NEUTROS DE LAS PECTINAS**

El análisis de los azúcares neutros de las pectinas, fue realizado por duplicado mediante una separación cromatográfica en un sistema de líquidos de alta presión (HPLC) waters 60F. Equipado con una columna (4.6 mm x 25 cm) de fase estacionaria de supercrossil LC-NH<sub>2</sub> (5 micrones). Los azúcares se eluyeron con una fase isocrática de acetonitrilo: agua (85:15) a temperatura de 35 a 40°C y con un flujo de 1.2 ml/min. Se utilizó un detector de índice de refracción Waters 410.

En estas condiciones la glucosa y la galactosa no se pueden separar, por lo cual se reportan agrupadas. Puesto que el ácido urónico no se detecta con el detector de índice de refracción Waters 410, este fue determinado químicamente por el método de Bulmenkrantz (Bulmenkrantz y Asboe, 1973).

## **7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **7.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS MODIFICACIONES QUE SUFRE LA PECTINA DURANTE EL REMOJO DE LA SEMILLA**

La cocción del frijol ocurre debido a la termosolubilización de las pectinas (Moscoso y col. 1984; Shomer y col 1990). Lo que indica que las pectinas de frijol deteriorado remojado (condición en que el frijol almacenado en condiciones adversas, se cuece), son termosolubles y las del seco no (cuadro 2). Lo anterior sugiere que durante el remojo, la pectina se modificó y que esta modificación incrementó su solubilidad térmica. Para definir esta(s) modificación(es) se analizo el efecto del remojo de la semilla en la composición de azúcares neutros de las pectinas, su peso molecular y de manera indirecta la fuerza de interacción pectina – catión.

Los resultados se describen a continuación.

### **7.2 ABSORCIÓN DE AGUA, DETERMINACIÓN DE TIEMPO DE COCCIÓN DE LAS SEMILLAS DE FRIJOL, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE PECTINAS**

#### **7.2.1 ABSORCIÓN DE AGUA**

Tras el remojo, los frijoles contenían una gran cantidad de agua entre el cotiledón y la testa, por lo que para cuantificar el agua absorbida por los cotiledones se tuvo que eliminar la testa. Todos los cultivares absorbieron agua en la misma proporción (Cuadro 1). El hecho de que hubiese agua atrapada entre el cotiledón y la testa sugirió que el fenómeno que se

estableció durante el almacenamiento del frijol no fue el de testa dura ("hard - shell"), además, el hecho de que la cantidad de agua absorbida por los cotiledones fuese similar entre los diferentes cultivares indicó que el fenómeno que presentan los frijoles fue el de dureza a la cocción "hard - to - cook" (Liu, 1995), Hincks y Stanley (Hincks y Stanley; 1986) han reportado que en este fenómeno los cotiledones si se hidratan.

**Cuadro 1**

Agua absorbida por los cotiledones de los frijoles deteriorados tras ser remojados durante 18 horas a 32 °C	
Variedad	(mg H <sub>2</sub> O/g cotiledón)
2626	402.707
Flor de Mayo	467.580
Bayo Mecentral	485.099

### 7.2.2 TIEMPO DE COCCIÓN DE LOS FRIJOLES

Los frijoles endurecidos secos presentaron tiempos de cocción superiores a 300 minutos, por lo cual se considero que ya no se cuecen (Jackson y Variano 1981), mientras que después del remojo los frijoles si se cocieron, obteniéndose tiempos de cocción similares para la variedad Flor de Mayo y la línea 2626, los cuales presentaron tiempos de cocción inferiores a los de la variedad Bayo Mecentral (Cuadro 2). Se ha reportado que el termoablandamiento de la semilla de frijol se debe a que las pectinas de la lamina media se solubilizan y que la magnitud del tiempo de cocción depende de la velocidad de termosolubilización de estos azúcares (Bernal y col 1997). Lo anterior sugiere que las pectinas de las semillas que no fueron previamente remojadas no se termosolubilizaron y que durante el remojo los componentes de la lamina media se modificaron de tal manera que aumentaron su velocidad de termosolubilización.

**Cuadro 2**

Tiempos de cocción		
Variedad	Tiempo (min)	
	Seco	Remojado
2626	>300	137
Flor de Mayo	>300	141
Bayo Mecentral	>300	245

### 7.2.3 EXTRACCIÓN DE PECTINAS

Con excepción de la variedad Bayo Mecentral, el remojo dificultó la extracción de las pectinas cuantificadas como azúcares totales en el sobrenadante de CDTA (Cuadro 3). Un resultado sorprendente lo constituyó el hecho de que solo una fracción del material extraído con CDTA precipitó como pectina (comparar cuadros 3 y 4).

**Cuadro 3**

Pectinas extraídas con CDTA		
Variedad	Frijoles Secos	Frijoles Remojados
	(mg/g de cotiledón)	(mg/g de cotiledón)
2626	<i>59.083</i>	30.546
Flor de Mayo	<i>54.201</i>	40.052
Bayo Mecentral	35.569	32.889

Los datos mostrados en cursiva son el promedio de dos experimentos cuantificados por triplicado, el resto son el promedio de tres determinaciones.  
Todos los resultados son en base seca

**Cuadro 4**

Pectinas precipitadas con etanol		
Variedad	Frijoles Secos	Frijoles Remojados
	(mg/g de cotiledón)	(mg/g de cotiledón)
2626	36.60	9.12
Flor de Mayo	26.28	17.92
Bayo Mecentral	8.44	12.40

Los datos mostrados en cursiva son el promedio de dos experimentos cuantificados por triplicado, el resto son el promedio de tres determinaciones

Los resultados anteriores se pueden explicar asumiendo que todos los azúcares que se extrajeron con CDTA son pectinas, pero una fracción tiene pesos moleculares pequeños y no es precipitable por etanol, o bien, que solo una fracción de los azúcares presentes en la fracción de CDTA son pectinas. Desgraciadamente no se realizaron experimentos posteriores para aclarar estas dos posibilidades.

De la comparación de la relación de azúcares neutros / ácido urónico de cada una de las fracciones (cuadros 5 y 6) se puede observar que durante la precipitación se pierden ambos tipos de moléculas pero se pierden más azúcares neutros, que ácidos urónicos, por esto la relación de Azúcares neutros / Ácidos urónicos, fue menor en las pectinas precipitadas en etanol que las solubilizadas en el CDTA.

**Cuadro 5**

Variedad	Pectinas extraídas con CDTA cuantificadas químicamente					
	Frijoles Secos			Frijoles Remojados		
	(mg/g de cotiledón)			(mg/g de cotiledón)		
	AU	AN	AN/AU	AU	AN	AN/AU
2626	12.598	46.485	3.690	7.284	23.262	3.194
Flor de Mayo	11.945	42.252	3.537	8.870	31.181	3.515
Bayo Mccentral	7.360	29.291	3.980	7.100	25.789	3.632

Los datos mostrados en cursiva son el promedio de dos experimentos cuantificados por triplicado, el resto es el promedio de tres determinaciones

**Cuadro 6**

Variedad	Pectinas precipitadas con etanol cuantificadas químicamente					
	Frijoles Secos			Frijoles Remojados		
	(mg/g de cotiledón)			(mg/g de cotiledón)		
	AU	AN	AN/AU	AU	AN	AN/AU
2626	5.312	12.194	2.296	1.937	4.131	2.132
Flor de Mayo	4.507	9.597	2.129	3.373	7.727	2.291
Bayo Mccentral	0.655	1.451	2.215	2.669	5.910	2.214

Los datos mostrados en cursiva son el promedio de dos experimentos cuantificados por triplicado, el resto es el promedio de tres determinaciones

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Curiosamente cuando las pectinas precipitadas con etanol son cuantificadas como azúcares totales se encontró (cuadro 7) que el peso total de la pectina no era recuperado como azúcares. Lo que hizo suponer que en el CDTA se estaban disolviendo otros componentes del citoplasma como las proteínas Sin embargo, esta posibilidad no fue evaluada.

**Cuadro 7**

Variedad	En peso		Azúcares Totales	
	Frijoles Secos (mg/g de cotiledón)	Frijoles Remojados (mg/g de cotiledón)	Frijoles Secos (mg/g de cotiledón)	Frijoles Remojados (mg/g de cotiledón)
2626	<i>36.60</i>	<i>9.12</i>	<i>17.51</i>	<i>6.07</i>
Flor de Mayo	<i>26.28</i>	<i>17.92</i>	<i>14.10</i>	<i>11.10</i>
Bayo Mecentral	<i>8.44</i>	<i>12.40</i>	<i>2.11</i>	<i>8.58</i>

Los datos mostrados en cursiva son el promedio de dos experimentos cuantificados por triplicado, el resto es el promedio de tres determinaciones

#### 7.2.4 COMPOSICIÓN PORCENTUAL DE AZÚCARES NEUTROS EN LAS PECTINAS

Las pectinas de los cultivares: Bayo Mecentral y 2626 secos o remojados, presentaron una abundancia similar de ramnosa, aunque entre cultivares, el contenido de este azúcar fue mayor en Bayo Mecentral ( $\approx 37$  a  $43\%$ ) que para 2626 ( $\approx 32$ ). En contraste en Flor de Mayo solo las pectinas extraídas de los cotiledones remojados contienen este azúcar ( $\approx 13\%$ ) y en menor proporción que los otros cultivares. La abundancia de Xilosa en 2626 y FM fue mayor en pectinas extraídas de cotiledones remojados ( $\approx 27$  a  $33\%$ ) que del cotiledón seco ( $\approx 20$  a  $23\%$ ). Mientras que en Bayo Mecentral, el remojo no disminuyó la abundancia de esta pentosa ( $\approx 20$  a  $18\%$ ). En el caso de la arabinosa, su abundancia disminuyó en todos los cultivares remojados. Con excepción de pectina extraída de Bayo

Mecentral remojado que presento aproximadamente 5% las otras muestras no contenian glucosa y / o galactosa (Cuadro 8).

**Cuadro 8**

Composición porcentual de los monosacáridos en las pectinas precipitadas con etanol al 85 %				
Muestras	Ramnosa	Xilosa	Arabinosa	Glu - Gal
2626s	32.37	20.49	47.14	0.00
2626r	31.79	33.04	35.16	0.00
FMs	0.00	23.75	76.25	0.00
FMr	12.76	27.13	60.11	0.00
BMs	37.50	20.32	42.18	0.00
BMr	43.48	18.00	33.72	4.80

Abreviaturas: 2626s: 2626 seco; 2626r: 2626 remojado; FMs: Flor de mayo seco; FMr: Flor de mayo remojado; BMs: Bayome central seco; BMr: Bayome central remojado.

En las pectinas se puede distinguir al menos dos tipos de dominios, los homogalacturonanos formados por polímeros de ácido galacturónico y los ramnogalacturonanos que contienen ramnosa y ácido galacturónico de forma dispersa (García y Peña, 1995). La ramnosa sirve como punto de ramificación en la molécula de pectina y a ella se unen los polímeros de azúcares neutros como cadenas laterales. (Carpita y Gibeaut, 1993). Se piensa que estos dominios están covalentemente unidos. Formando una maya de pectinas a través de la lamina media y de la pared celular primaria.

El dominio de homogalacturonanos es más abundante en la lamina media y el de ramnogalacturonano en la pared primaria. Uno de los factores que evita o retarda la termosolubilización es su fuerza de unión con calcio.

De acuerdo con lo anterior, la composición de azúcares neutros de las pectinas precipitadas con etanol (cuadro 6 y 8) es consistente con la presencia de homogalacturonano y

ramnogalacturonano en la pared celular de los cotiledones de los diversos cultivares. En diversos sistemas vegetales se ha demostrado que durante la elongación celular, la composición química de estos polímeros se modifica. Estas modificaciones permiten que la pared celular adquiera la plasticidad requerida para enfrentar los ciclos de elongación y reposo a que es sometida durante el crecimiento (García y Peña, 1995; Stolle y col. 1999). Durante el remojo de la semilla de frijol las células del cotiledón se hidratan e inician un proceso similar a la elongación por lo que el comportamiento a la cocción observado en las semillas remojadas y secas podría deberse a que en el frijol remojado, la interacción pectina calcio fuese menor que en el frijol seco y por tanto en el primer caso, la cocción termosolublece las pectinas y en el segundo no.

La mayor abundancia de xilosa en las pectinas aisladas de semillas remojadas de los cultivares Flor de Mayo y 2626 sugiere que la diferencia en la magnitud de la interacción pectina  $Ca^{++}$  podría ser consecuencia de un mayor grado de Xilosidación en el hidroxilo del carbono 3 del residuo de ácido urónico. Se ha demostrado que este tipo de modificación de la cadena principal en la pectina disminuye su fuerza de interacción con calcio (Le Goff y col. 2000). La validación de esta interpretación requiere demostrar que el residuo de ácido galacturónico de la cadena principal de pectina efectivamente se encuentra modificado. Para el caso del frijol Bayo Mecedental, la pectina se podría estar modificando a través de una acetilación del residuo de ácido urónico (Renard y Jarvis, 1999). El contenido de acetilos de las pectinas no fue determinado en este trabajo.

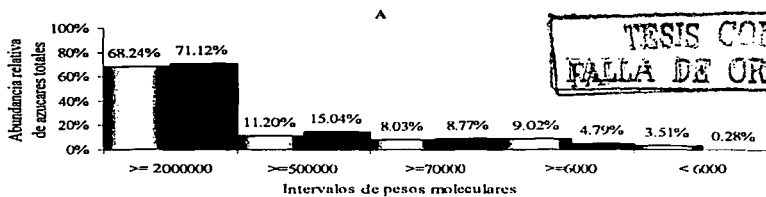
## **7.3 PESO MOLECULAR DE LAS PECTINAS Y FUERZA DE INTERACCIÓN DE LAS PECTINAS CON LOS IONES**

### **7.3.1 FILTRACIÓN EN GEL**

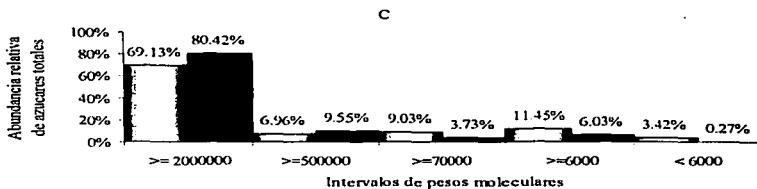
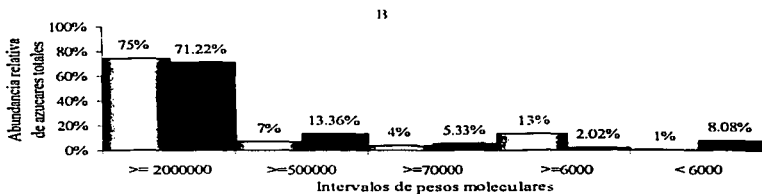
En los experimentos de filtración en gel, la recuperación de las pectinas fue en todos los casos mayor del 60% y en todos los casos este porcentaje de recuperación mejoró con el remojo (Figuras L y M). En ninguno de los cultivares el remojo modifico el peso molecular de las pectinas (Figuras L y M). Este resultado se observo cuantificando las pectinas como azúcares totales (Figura L) o como ácido urónico (Figura M).

En frijoles frescos, el remojo de la semilla de frijol resulta en una disminución del peso molecular de la pectina (Blancas, 2001). Se propone que estas modificaciones se deben a la acción de las enzimas presentes en la pared celular (datos no publicados, Martínez). Por lo que el hecho de que el peso molecular de las pectinas aisladas de frijoles endurecidos no haya disminuido durante el remojo sugiere que las hidrolasas de la pared celular se inactivaron durante el deterioro de la semilla o bien que durante el remojo la pectina se modificó y estas modificaciones disminuyeron la accesibilidad del sustrato al sitio activo de la enzima. Existe evidencia que apoya cualquiera de las propuestas descritas. Se ha demostrado que durante el deterioro la actividad enzimática disminuye (datos no publicados, Martínez, Pacheco y Ríos) además, la abundancia de xilosa en pectinas aisladas de frijoles endurecidos remojados fue mayor que las aisladas de frijoles secos (cuadro 8, este trabajo). En conjunto los resultados anteriores indican que el efecto benéfico del remojo en la cocción del frijol endurecido no se debe a cambios en el peso molecular de la pectina.

Figura L

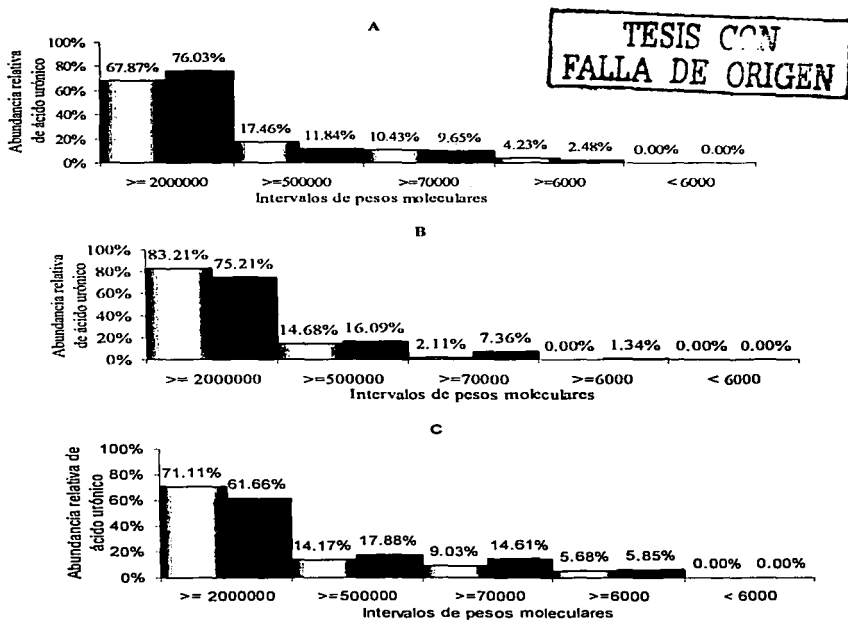


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Distribución porcentual de los pesos moleculares de las pectinas (Daltons), cuantificados como azúcares totales de las pectinas extraídas de frijoles secos □ y remojados ■ Cultivares: 2626 (A); Flor de Mayo (B) y Bayo Mccentral (C)

Figura M



Distribución porcentual de los pesos moleculares de las pectinas (Daltons), cuantificados como ácido urónico totales de las pectinas extraídas de frijoles secos □ y remojados ■ Cultivares:2626 (A); Flor de Mayo (B) y Bayo Mecentral (C)

### 7.3.2 FRACCIONAMIENTO DE LAS PECTINAS EN UNA COLUMNA DE INTERCAMBIO IONICO

Las pectinas extraídas tanto de cotiledones remojados como secos contenían dos fracciones:

1) Una que se unió tenazmente a la columna (obteniéndose este resultado por la diferencia entre las pectinas que se eluyeron y las cuantificadas en las fracciones recolectadas), la cual no eluyo ni con 2M de NaCl (Cuadro 9)

Aparentemente esta interacción es más evidente cuando las pectinas se expresan como ácido urónico. Sugiriendo que la región de homo galacturonanos presento mayor afinidad por la columna que la región de heterogalacturónico. En todos los tratamientos y para todos los cultivares se observo algo similar.

**Cuadro 9**

Azúcares totales y ácido urónico unidos tenazmente a la columna de intercambio ionico				
Variedad	*Azúcares totales (%)		**Acido urónico (%)	
	Secos	Remojados	Secos	Remojados
2626	36.78	52.83	78.99	67.13
FM	30.49	10.42	69.22	78.46
BM	30.94	41.21	69.70	58.23

Los datos mostrados en esta tabla son el promedio de dos experimentos

\*Fracción de azúcares totales no recuperados de la columna

\*\*Fracción de ácido urónico no recuperados de la columna

2) La otra fracción eluyo de la columna con el gradiente de NaCl utilizado (0.00 a 2.00M).

En el patrón de elución de pectina recuperada se observo una fracción de azúcares neutros que no contenía ácido galacturónico puesto que no se unió a la columna. El contenido de esta fracción fue cultivar dependiente, siendo mayor para Bayo Mécentral y menor para Flor de Mayo.

El remojo del cotiledón disminuyó la fuerza de unión de la pectina a la columna de DEAE - celulosa. En el caso de 2626 y Bayo Mecentral (figura NA y NC), el remojo del cotiledón

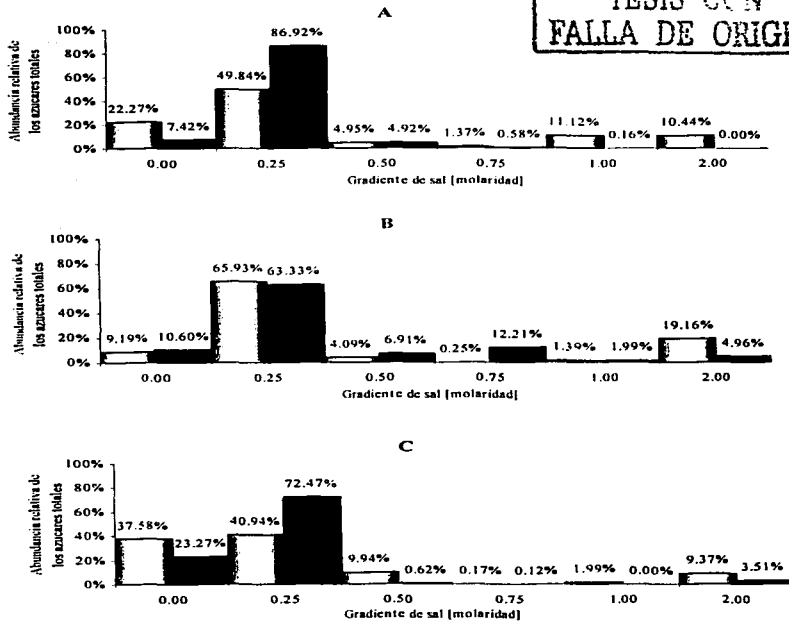
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

incremento la abundancia de la fracción débilmente unida a la columna (eluida con 0.25M de NaCl), mientras que en todos los cultivares (Figuras NA, NB y NC) el remojo disminuyo la fracción eluida con 2M de NaCl. En las figuras OA, OB y OC, se muestra el patrón de elución cuantificado como ácido urónico, en todos los casos se observó que la única fracción de urónico que se eluyó está débilmente unida a la columna, pues se eluyó con 0.25M de NaCl.



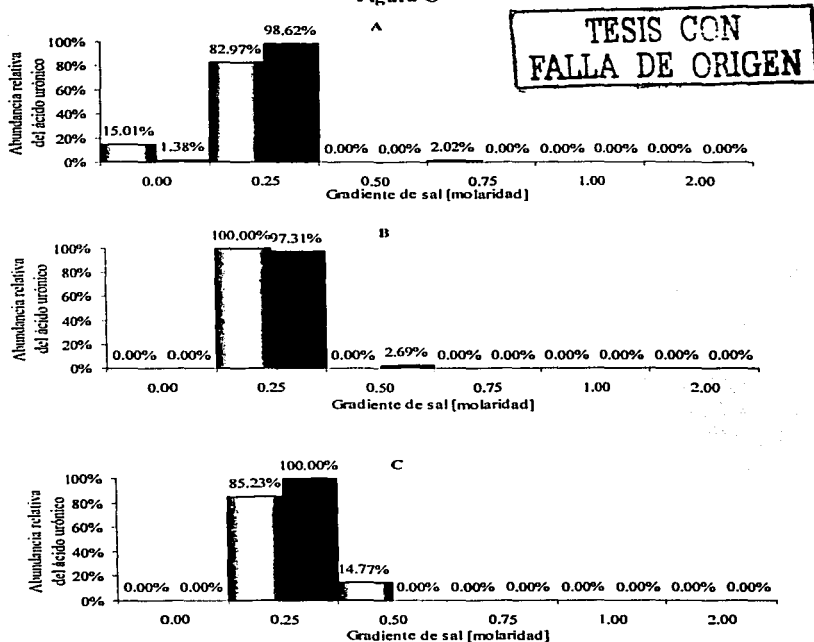
Figura N

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Distribución porcentual de los perfiles de elución, expresados como azúcares totales de las pectinas extraídas de frijoles secos □ y remojados ■  
Cultivares: 2626 (A); Flor de Mayo (B) y Bayo Mecental (C)

Figura O



Distribución porcentual de los perfiles de elución, expresados como ácido urónico totales de las pectinas extraídas de frijoles secos □ y remoñados ■ Cultivares :2626 (A); Flor de Mayo (B) y Bayo Mecentral (C)

En el cuadro 10 se muestra la abundancia de ácido urónico en las pectinas que se eluyeron de la columna y las que se quedaron unidas. Con excepción de la variedad Flor de mayo se puede observar que la abundancia de ácidos urónicos, fue mayor en las pectinas que no eluyeron de la columna. Lo anterior sugirió que las pectinas unidas fuertemente a la columna contienen regiones de homogalacturonano. La abundancia de este dominio representado por la pectina tenazmente unida fue similar para ambos lotes (cuadro 9) indicando que el remojo de la semilla no modificó este dominio y que por lo tanto, la cocción del frijol endurecido no involucra modificaciones en la región de homogalacturonano.

**Cuadro 10**

Variedad	Relación de azúcares neutros / ácido urónico de las pectinas separadas en la columna de intercambio iónico			
	Pectinas unidas tenazmente a la columna		Pectinas que eluyeron	
	Seco	Remojado	Seco	Remojado
2626	3.98	12.91	14.36	18.23
FM	3.08	6.64	10.48	11.49
BM	2.56	2.52	2.69	2.64

Por otro lado, la abundancia de azúcares neutros en las pectinas aisladas de frijol remojado, así como las aisladas de frijol seco y que eluyen en la columna de intercambio iónico, indica que estas fracciones contienen mayor contenido de un polímero altamente ramificado, por ejemplo ramnogalacturonano, semejante a los polímeros que se encuentran formando parte de la pared celular primaria (Redgwell y Selvendran, 1986). La fuerza de unión a la columna de este polímero ramificado fue menor cuando se aisló de frijol remojado que cuando provenía de frijol seco. Como ya se indicó una forma de disminuir la

fuerza de interacción pectina - cation divalente es a través de xilosidar o acetilar el hidroxilo del C-3 y C-2 respectivamente, del residuo de ácido urónico (Le Goff y col. 2000; Renard y Jarvis 1999). Los datos anteriores, al igual que los del cuadro 8 sugieren que una fracción de la pectina aislada del frijol remojado se modifica de forma tal que la interacción pectina catión divalente disminuye. Para demostrar la propuesta anterior se requiere cuantificar xilosa y acetato en estas fracciones.

Los datos anteriores se pueden integrar en el siguiente modelo: Estructuralmente se ha demostrado que la cocción del frijol resulta de la separación celular (Shomer y col. 1990). Lo cual parece ser consecuencia de la termosolubilización de la pectina y el termorelajamiento de la pared primaria que conlleva a un incremento en la presión de turgor con la consecuente separación celular.

Los datos mostrados en el trabajo sugieren que el remojo de la semilla favorece la xilosidación y/o acetilación de las pectinas presentes en la pared celular primaria dominios ramnagalacturonano, lo que resulta en una disminución de la fuerza de interacción pectina - calcio (cation abundante en la pared celular). Esto favorecería la termosolubilización de estos dominios pecticos arrastrando consigo los dominios covalentemente unidos de homogalacturonano presentes principalmente en la lamina media. Así la solubilización de la molécula de pectina resultaría en la solubilización de la lamina media y en la relajación de la pared primaria, lo que conduce al aumento de turgor y a la separación celular. En el caso del frijol seco; la termosolubilización de los dominios de ramnagalacturonano no se realiza debido a su fuerte interacción con calcio. Con lo cual no se produce la cascada de eventos que producen la cocción.

## 8 CONCLUSIONES

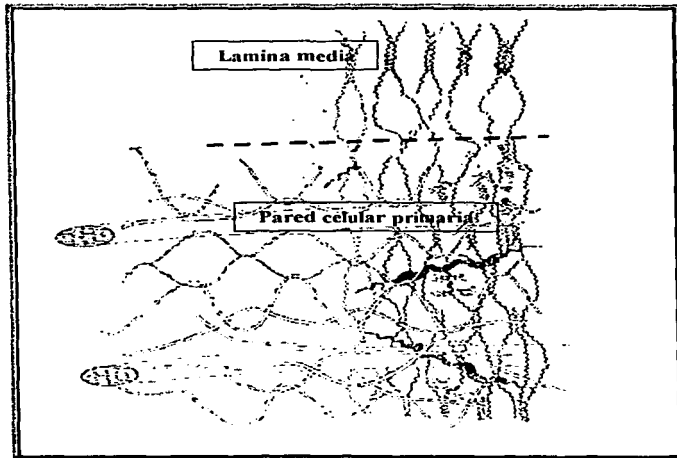
- La cantidad de agua absorbida por los cotiledones no es la responsable de que los frijoles deteriorados remojados puedan cocerse
- El remojo no modifica la relación de Azúcares neutros / Ácido urónico de las pectinas
- El remojo no modifica los pesos moleculares de las pectinas.
- El remojo disminuyó la fuerza de unión de las pectinas a la columna de intercambio iónico.
- El remojo sí modifica la composición de azúcares neutros de las pectinas. La cual es la responsable de una serie de eventos, cuya consecuencia final es la cocción de los frijoles.
- Sobre la base de los resultados obtenidos se propone el siguiente modelo

## 9 Modelo

Como ya se mencionó en los antecedentes la pared celular es la zona más externa de las células vegetales, en el caso de los cotiledones constituida por pared primaria y lamina media (Figura P), esta ultima sirve como cemento para mantener unidas a las células (Figura Q)

Figura P

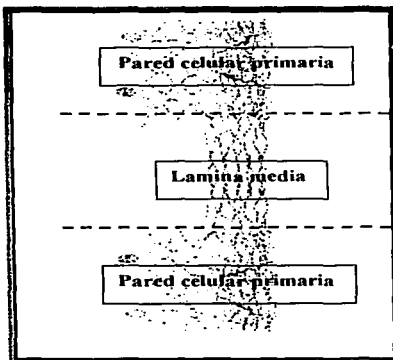
Pared celular con lamina media



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Figura Q**

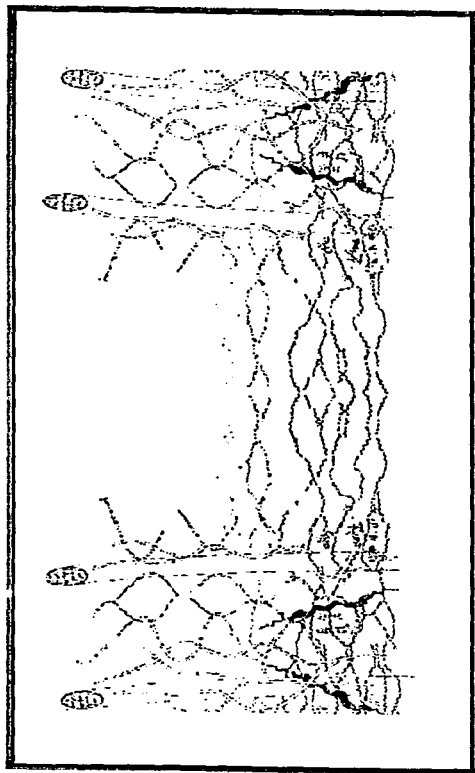
**Dos paredes celulares unidas por una lamina media**



TESIS 2004  
FALTA DE ORIGEN

Tras el remojo de los cotiledones de las semillas deterioradas las pectinas se xilosidan y/o acetilan, lo que se traduce como una pérdida en la fuerza de interacción de las pectinas con los iones calcio (Figura R) Esto favorecería la termosolubilización de estos dominios pepticos arrastrando consigo los dominios covalentemente unidos de homogalacturonano presentes principalmente en la lamina media. Así la solubilización de la molécula de pectina resultaría en la solubilización de la lamina media y en la relajación de la pared primaria, lo que conduce al aumento de turgor y a la separación celular (Figura S)

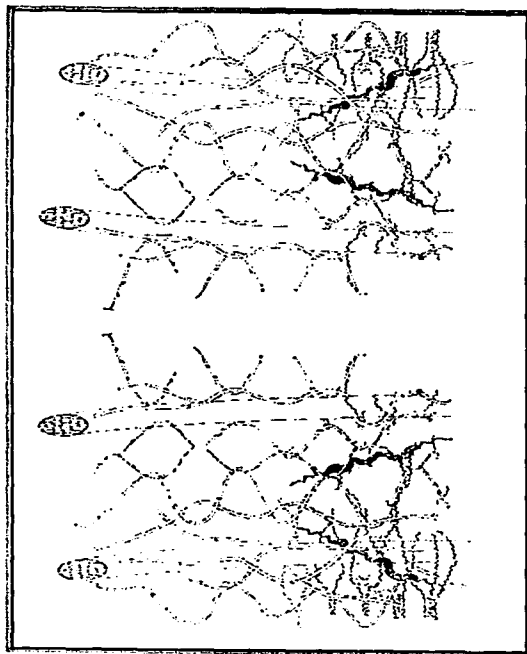
(Figura R)  
Perdida en la fuerza de interacción de las pectinas de la pared celular con los iones  $Ca^{2+}$



TESIS COM  
FALTA DE ORIGEN



**Figura S**  
**Paredes celulares sin pectina**



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## ANEXO 1

### PREPARACIÓN DE LA COLUMNA DE INTERCAMBIO IONICO

La resina DEAE celulosa (Sigma) fue remojada en agua desionizada 24 horas para permitir que esta se hidratara, para posteriormente realizarle 4 lavados con agua desionizada, agitando cuidadosamente con una varilla de vidrio y extrayendo la resina que no precipitaba después de 10 minutos (conocida como los finos) por medio de una trampa de vacío, tras los lavados, la resina fue colocada en una solución de hidróxido de sodio (Baker) 0.5 N, dejándola reposar 30 minutos, tras este periodo, la resina fue lavada con agua desionizada, hasta lograr un pH cercano a la neutralidad. Cuando esto se logró se colocó en una solución de ácido clorhídrico (Mallinckrodt) 0.5 N dejándola reposar 30 minutos, para finalmente ser empacada en una columna Biorrad de 1 cm de diámetro por 30 de alto, de la siguiente manera.

Se coloca la columna en posición vertical, y se llena hasta la mitad con HCl 0.5 N. Permitiendo el flujo del ácido por la parte inferior de la columna, se agregó lentamente la suspensión de la resina por la parte superior de la columna con la ayuda de una varilla de vidrio, cuidando siempre de que la resina no cayese de golpe en la columna ni que esta se secase en ningún momento. Cuando la columna se lleno fue equilibrada con el buffer de fosfatos, hasta que esta alcanza un pH de 6.5

## ANEXO 2

### PREPARACION DE LA COLUMNA DE PESOS MOLECULARES

Se colocó la resina SEPHACRYL S-400 en agua desionizada dentro de un matraz kitasato teniendo el cuidado de agregar el agua en una forma muy lenta por las paredes del recipiente con ayuda de un agitador, tras dejarla reposar 25 minutos se eliminó el agua de lavado con una trampa de vacío. Para eliminar el aire que se pudiese encontrar en la resina se tapo el matraz y se conecto al vacío durante 1 hora. La resina fue empacada en una columna Biorrad de 1.5 cm de diámetro por 40 cm de alto de la siguiente manera: se colocó la columna en posición vertical, y se lleno hasta la mitad con agua. Permitiendo el flujo del agua por la parte inferior de la columna, se agregó lentamente la suspensión de la resina por la parte superior de la columna con la ayuda de una varilla de vidrio, cuidando siempre de que la resina no cayese de golpe en la columna ni que esta se secase en ningún momento. Una vez empacada la columna, se equilibrio con 500 ml del bufer de acetatos 200 mM a pH 5 que se usara para separar las muestras.

Tras cada separación de una muestra la columna se lavó con 500 ml del bufer de acetatos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bellido Bernal Jorge Martin. (1992).** Variación del contenido de pectina en extractos pécticos de limón sutil (*Citrus Aurantifolia*). Tesis. Universidad nacional de San Agustín de Arequipa. Peru
- Bernal Lugo Irma, Parra Carmen, Portilla Margarita, Peña valdivia Celia B. y Moreno Ernesto. (1997).** Cotyledon thermal behavior and pectic solubility as related to cooking quality in common beans. *Plant foods for human nutrition*. 50: 141 – 150
- Blanco Morales Víctor Hugo. (2001).** Estudio de las modificaciones en la pectina que ocurren durante el remojo de las semillas de frijol (*Phaseolus Vulgaris*). Tesis. Departamento de Biorecología. Facultad de Química. UNAM. México. 50 paginas
- Blumenkrantz Nelly y Asboe Hansen Gustav. (1973).** New Method for quantitative determination of Uronic Acids. *Analytical Biochemistry*. 54: 484 – 489
- Carmejo de Aparicio Clara, Ferrer Alexis, De Ferrer Betzabé y Cedeño Milagros. (1996).** Extracción y caracterización de pectina de limones inertados de la region de Zuliana. *Facultad de Aragon (LUZ)*. 13: 641 – 645
- Carpita Nicholas C. y Gibeaut David. (1993).** Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The plant journal*. 3(1): 1 – 30
- Coimbra Manuel A., Waldrom Keith W., Delgadillo Ivon y Selvendran Robert R. (1996).** Effect of Processing on cell wall polysaccharides of green table olives. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2394 – 2401
- Dubois Michel, Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. y Smith Fred. (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28(3): 350-356
- García Hernández Edith del R., Peña Valdivia Cecilia Beatriz. (1995).** La pared celular componente fundamental de las células vegetales. Universidad Autónoma de Chapingo. 95 pp
- Graham P. H. y Ranalli P. (1997).** Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field crops research*. 53: 131 – 146
- Hincks M. J. y Stanley D. W. (1986).** Multiple Mechanisms of bean hardening. *Journal of food technology* 21: 731- 750

**Howard L. R., Burma P. y Wagner A. B. (1997).** Firmness and cell wall characteristics of pasteurized jalapeño pepper rings as affected by preheating and storage. *Journal of food science.* 62: 89 – 113

**INEGI. (1997).** Cultivos anuales de México VII Censo Agropecuario, INEGI. 195-204

**Jackson, G. M. Y Variano – Marston, E. (1981).** Hard to cook phenomenon in beans: effects of accelerated storage on water absorption and cooking time. *J. Food sci.* 46(3): 799

**Kacuráková Martha, Belton Peter s., Wilson Reginald H, Hirsch Ján y Ebringerova Anna. (1998).** Hydration properties of Xilan type structures: an FTIR study of Xylooligosaccharides. *J. Sci. Food Agric.* 77: 38 – 44

**Kiriakidis Nikolaos B., Apostolos Apostolidis, Lambros E. Papazoglou y Vailos T. Karathanos. (1997).** Physicochemical studies of hard to cook beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Sci. Food Agric.* 74: 186 192

**Le Goff A. Renard C. M. G. C. Bonnin E. y Thibault J. F. (2001).** Extraction, purification and characterisation of xylogalacturonans. *Carbohydrate Polimers.* 45: 325 – 334

**Liu Keshun. (1995).** Cellular, Biological and physicochemical basis for the hard to cook defect in legume seeds. *Critical reviews in food science and nutrition.* 35(4) : 263 – 298

**Martin Cabrejas Maria A. Esteban Rosa M., Waldron Keith W., Maina Gladys, Grant George, Bardocz Susan y Pusztai. (1995).** Hard to cook phenomenon in beans: Changes in anti nutritional factors and nitrogenous compounds during storage. *J. Sci. Food Agric.* 69: 429 – 435.

**McDougall Gordon J., Morrison Ian M., Stewart Derek y Hillman John R. (1996).** Plant Cell Walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. *J. Sci. Food Agric.* 70: 133 – 150.

**Mendoza Aguilar M. (1982).** Contribución de las pectinas a la calidad culinaria del frijol (*Phaseolus vulgaris*). Tesis. Facultad de Ciencias. UNAM. México Paginas 72.

**Moscoso W. Bourner C. Hood L.F. (1984).** Relationships between the hard to cook phenomenon in red kidney beans and water absorption, puncture force, pectin, phytic acid and minerals. *J. Food Sci.* 48: 1577 – 1583

**Nissreen Abu Ghannam (1998).** Modeling textural changes during the hydration process of red beans. *Journal of food engineering.* 38: 341 – 352

**Redgwell Robert J. y Hansen Carl E. (2000).** Isolation and characterization of cell wall polysaccharides from cocoa (*Theobroma cacao L.*) beans. *Planta.* 210: 823 – 830

**Redgwell Robert J. y Selvendran Robert R. (1996).** Structural features of cell wall polysaccharides of onion *Allium cepa*. Carbohydrate Research. 157: 183 – 199.

**Renard C. M. G. C. y Jarvis M. C. (1999).** Acetylation and methylation of homogalacturonans 2: effect on ion – binding properties and conformations. Carbohydrate Polymers. 39: 209 – 216

**Reyes Moreno Cuahutémoc y Paredes López Octavio. (1993).** Hard to cook phenomenon in common beans - a review. Food science and nutrition. 33(3): 227 – 286

**Rodríguez Palanzuela, García J. y de Blas C. (1998).** Fibra soluble y su implicación en nutrición animal: Enzimas y probióticos. XIV curso de especialización, Avances en nutrición y alimentación animal

**SAGARPA. (1997).** Producción de frijol en México: Diversidad y libre mercado, calidades agropecuarias. 3 – 27

**Sharama Shri K., Liptay Albert y Le Maguermarc. (1998).** Molecular characterization, physico chemical and functional properties of tomato fruit pectin. Food research international. 30(7): 543 – 547

**Shomer I. Paster N. Linder P. y Vasilver R. (1990).** The role of cell wall structure in hard to cook phenomenon in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Foods Structure 9: 139 – 149.

**Stolle Smits Trinette, Beekhuizen Jan Gerard, Kok Matthieu T. C., Pijnenburg Mary, Recourt Kees, Derksen Jean y Voragen Alphons G. J. (1999).** Changes in Cell Wall Polysaccharides of green bean pods during development. Plant Physiology. 121: 363 – 372

**Thompson James E. y Fry Stephen C. (2000).** Evidence for covalent linkage between xiloglucan and acidic pectins in suspension – cultured rose cells. Planta. 211: 275 – 286

**Tovar Martínez María Eugenia. (1997)** Determinación de los cambios estructurales relacionados con el fenómeno de la reversibilidad del endurecimiento en dos cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Tesis de doctorado, Facultad de ciencias UNAM. México Paginas

**Tsutomu Harada y Klaus Paolus. (1987).** Effects of cooking treatment on the texture of root vegetables. Agric. Biol. Chem. 51 (3): 837 – 844

**Vincken Jean Paul, Zabolna Olga A., Beldman Gerrit y Voragen Alphons G. J. (1998).** Xyloglucan endotransglycosylase activity in apples is ripening related: Implications for fruit juice processing. J. Sci. Food Agric. 78: 46 – 52

**Whitney Sarah E. C., Gothard Michelle G. E., Mitchell John T. Y Gidley Michel J. (1999).** Roles of cellulose and Xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls. Plant physiology. 121: 657 – 663