

00528
72



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

"PARTICIPACION DE GLICOSIDASAS DE PARED CELULAR
EN LA CALIDAD CULINARIA DEL FRIJOL".

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
LETICIA } PACHECO GONZALEZ



MEXICO, D.F.



2003

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

A



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Leticia Pacheco González
FECHA: 17-SEP-03
FIRMA: [Firma]

Jurado asignado:

Presidente: OLGA VELÁZQUEZ MADRAZO

Vocal: IRMA OFELIA BERNAL LUGO

Secretario: ARTURO NAVARRO OCAÑA

1er Suplente: ENRIQUE MARTÍNEZ MANRIQUE

2do. Suplente: ALFREDO SALAZAR ZAZUETA

Sitio donde se desarrolló el tema:
Laboratorio 104, Conjunto E. Facultad de Química. UNAM.

Nombre y firma del asesor:
IRMA OFELIA BERNAL LUGO

[Firma]

Nombre y firma del sustentante:
LETICIA PACHECO GONZÁLEZ

[Firma]

B

AGRADECIMIENTOS

- Gracias a Dios...
- A mi México. Por la fortuna de ser parte de éste bello y místico territorio...
- A la UNAM. Por el orgullo de pertenecer a ella, por ser mi segunda casa durante estos últimos años...
- A mis Profesores. Por crear en mí la necesidad de saber para crecer...
- A la Dra. Bernal. Por su asesoría, apoyo e interés en este proyecto y sobretodo por las tardes de "café"...
- A los sinodales asignados, por el tiempo e interés que dedicaron a mi trabajo...
- Al Dr. Felipe Cruz. Por sus consejos y "aventones"...
- A las Chicas y Chicos del 104. Por que en algún momento de mi estancia necesité y encontré apoyo en cada uno de ellos...
- A Don Enrique. Por su buen humor y disponibilidad...
- A Adriana Pastrana. Por sus palabras, ayuda y por su tiempo compartido...

DEDICATORIAS.

- A mí Mamá. Por todo tu empeño y sacrificio. Por lo dura que tuviste que ser ante la vida, por el poco tiempo que dejé para ti... Este trabajo es solo una parte de tu esfuerzo.
- A mí Papá, Ernesto. Por ser el mejor recuerdo de mi infancia.
- A Gaby. Por compartirme tu tiempo, tu casa y tu familia. Por apoyarnos cuando más lo necesitamos.
- A mis hermanos: Mary, Javier y Magda. Por que aún en el silencio en que hemos vivido, sé que siempre podré contar con ustedes. Los quiero mucho.
- A Magda. Por tu apoyo, paciencia, consejos y compañía. Por motivarme y encontrar en tí, a veces, un cómplice.
- A mis sobrinos: Arianna, Arturo y Vane y mis 3 chiquitos: Rodrigo, Alondra y Eric. Por el simple echo de existir.
- A Marce. Por encontrar en ti un tesoro: Mi mejor amiga.
- A mis grandes amigos: Luis y Héctor, Héctor y Luis. Con los que llevé a cabo las mejores aventuras de mi adolescencia (¡Gracias por cuidarme!).
- A Miguel. Por el amor y respeto que encontré en ti. Por tu disponibilidad y paciencia, por ser mi compañero y sobre todo mi amigo.
- A Dios quien ha puesto a cada uno de ustedes...

CON PERSEVERANCIA EL CARACOL LLEGÓ HASTA EL ARCA...

C.H. Spurgeon

ÍNDICE

| | |
|-------------------------------------------------|-----------|
| RESUMEN | 3 |
| INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| ANTECEDENTES | 7 |
| 1.1 GENERALIDADES..... | 7 |
| 1.2 PROCESAMIENTO DEL FRIJOL | 7 |
| 1.3 PROBLEMAS DE ALMACENAMIENTO..... | 8 |
| 1.3.1 ENDURECIMIENTO DEL FRIJOL (HTC)..... | 10 |
| 1.4 ESTRUCTURA DE LA SEMILLA | 12 |
| 1.4.1 PARED CELULAR | 13 |
| 1.5 PECTINA..... | 15 |
| 1.5.1 DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE LA PECTINA..... | 16 |
| ANTECEDENTES INMEDIATOS | 19 |
| HIPÓTESIS | 21 |
| OBJETIVO GENERAL | 21 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 21 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 22 |
| 1. MATERIAL BIOLÓGICO..... | 22 |
| 2. ENVEJECIMIENTO DE LA SEMILLA..... | 23 |
| 3. REMOJO DE LA SEMILLA..... | 23 |
| 4. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE COCCIÓN..... | 24 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5. OBTENCIÓN DE LOS COTILEDONES | 25 |
| 6. EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA | 26 |
| 7. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA | 27 |
| 8. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA..... | 27 |
| RESULTADOS..... | 29 |
| 1. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE COCCIÓN..... | 29 |
| 2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA | 30 |
| 3. EFECTO DEL REMOJO EN LA ACTIVIDAD GLICOSÍDICA DE PARED CELULAR EN FRIJOL FLOR DE MAYO..... | 31 |
| 4. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN LA ACTIVIDAD DE GLICOSIDASAS DE PARED CELULAR EN FRIJOL FLOR DE MAYO..... | 34 |
| 5. EFECTO DE GLICOSIDASAS SOBRE EL TIEMPO DE COCCIÓN DEL CULTIVAR FLOR DE MAYO ALMACENADO | 35 |
| DISCUSIÓN | 38 |
| CONCLUSIONES..... | 44 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 45 |

Resumen

Durante el almacenamiento en condiciones adversas y durante el remojo del frijol, las pectinas sufren modificaciones que alteran sus propiedades fisicoquímicas, y por tanto su velocidad de termosolubilización. Es por esto que los tratamientos anteriores afectan en forma favorable o desfavorable, el tiempo de cocción de la semilla. En otros sistemas se ha reportado que las propiedades fisicoquímicas de estos polisacáridos son modificadas por glicosidasas de pared celular, por lo que en este trabajo se exploró una posibilidad similar para explicar las modificaciones que este polímero sufre cuando la semilla de frijol se somete a los tratamientos antes mencionados.

Con la finalidad de demostrar si las glicosidasas contribuirían en las modificaciones de las propiedades fisicoquímicas de la pectina (solubilidad y peso molecular) antes descritas, se determinó la actividad de 4 glicosidasas de pared celular (α y β -galactosidasa, α y β -glucosidasa, α y β -xilosidasa y arabinosidasa α y β) en semillas frescas y almacenadas; tanto secas como remojadas. Los resultados mostraron que las 4 enzimas estuvieron presentes en el frijol fresco seco y que el remojo favoreció significativamente el aumento de la actividad de 3 de ellas: la β -galactosidasa, α -arabinosidasa y la β -arabinosidasa para los 3 cultivares ensayados: Flor de Mayo, 2626 y Bayo Mecentral, en éste último cultivar, el remojo favoreció junto con las enzimas anteriores, la actividad de la β -glucosidasa y de la α -xilosidasa. La actividad de las hidrolasas se vio disminuida significativamente por efecto del almacenamiento y en estas semillas a diferencia de la semilla fresca, el remojo en agua no tuvo efecto sobre la actividad de las glicosidasas. También se demostró que las semillas endurecidas sólo se

cuecen cuando se remojan en una solución de glicosidasas producidas por Aspergillus niger.

Los resultados anteriores sugieren que las glicosidasas de pared celular contribuyen a modificar las pectinas de frijol cuando las semillas se remojan, pero no parecen contribuir a los cambios que se observan en las pectinas cuando el frijol se almacena.

Introducción

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es el principal alimento en América Latina, sobre todo en los países de menores ingresos. Esta leguminosa provee cerca del 30% de la proteína de la dieta de las poblaciones rurales en México. También constituye una fuente importante de carbohidratos, de vitaminas, principalmente del complejo B por ejemplo niacina y riboflavina, de minerales como el calcio, el zinc, el magnesio, entre otros, además proporciona un alto contenido de lisina, el cual es un aminoácido indispensable para el hombre (Sousa, 1993).

México es el quinto país productor de frijol en el mundo, después de la India, Brasil, China y Estados Unidos. Los principales estados productores mexicanos son: Zacatecas, Durango, San Luis Potosí y Chihuahua en siembras de temporal, durante el ciclo primavera-verano, aportando el 65% de la producción nacional de la temporada; Sinaloa y Nayarit, con siembras de riego, principalmente, representan el 74% correspondiente al periodo otoño-invierno (FAO, 1998).

Para su consumo, el frijol generalmente, es sometido a un periodo de remojo de 12 a 18 horas previo al tratamiento térmico, favoreciendo de esta manera la disminución en el tiempo de cocción con respecto a la semilla sin remojo. Sin embargo, cuando la leguminosa ha sufrido un prolongado almacenamiento en condiciones no adecuadas (humedad relativa elevada y altas temperaturas) tiende a endurecerse provocando que el tratamiento térmico, aplicado para su cocción, aún después del remojo, sea prolongado (Méndez, 2003) y esto tenga como consecuencia un decremento nutrimental, pérdidas económicas y tomando en cuenta que en las poblaciones rurales, el combustible usado para la cocción es leña, se genera adicionalmente un daño ambiental. Las semillas endurecidas se caracterizan por resistirse a la suavización durante la cocción (Liu, 1995).

La textura de los alimentos de origen vegetal depende primordialmente de los componentes de la pared celular. Se piensa que tanto los cambios deseables como indeseables en las propiedades de frutas y vegetales durante su almacenamiento y procesamiento, están relacionados con modificaciones químicas o enzimáticas en los componentes del polímero péctico (Brummell and Harpster, 2001).

Se ha reportado que el remojo y el almacenamiento inadecuado de la semilla induce modificaciones en las propiedades fisicoquímicas de las pectinas del frijol (Blancas, 2002, Méndez 2003), lo que resulta en cambios tanto deseables como indeseables en la textura y por tanto en las características del frijol. En este trabajo se exploró la participación de las glicosidasas de pared celular, en las modificaciones de las propiedades fisicoquímicas del polímero antes mencionado. Las glicosidasas de pared celular podrían remover los azúcares presentes en el ramnogalacturonano I; de esta manera durante el remojo, se favorece la susceptibilidad de la pectina a la acción de pectinasas, por lo que disminuye su peso molecular y se incrementa la termosolubilización.

Antecedentes

1.1 Generalidades

Dentro del grupo de las leguminosas, el frijol es una de las más importantes. Es una planta anual, herbácea intensamente cultivada desde la zona tropical hasta las templadas. Es originario de América y se le conoce con diferentes nombres: poroto, haricot, caraota, judía, alubia, habichuela y otros. Desde el punto de vista nutricional, el frijol es una fuente rica de proteínas e hidratos de carbono, además de ser una buena fuente de vitamina del complejo B como son la niacina, la riboflavina, el ácido fólico y la tiamina. Igualmente proporciona hierro, cobre, zinc, fósforo, potasio, magnesio y calcio y tiene un alto contenido en fibra. También es una excelente fuente de ácidos grasos polinsaturados.

De más de 1300 especies de leguminosas, solamente, alrededor 20 son consumidas por los humanos. Hasta ahora se conocen alrededor de 500 variedades de frijol común (Reyes-Moreno y Paredes, 1993).

Actualmente en nuestro país se siembran un poco más de 2 millones de hectáreas de frijol, produciéndose alrededor de un millón de toneladas al año. Los principales estados productores en México son: Chihuahua, Durango, Jalisco, Nayarit, Querétaro, Sinaloa y Zacatecas. De la producción de esta leguminosa dependen 450,000 productores y sus familias, por lo que además de apoyar la nutrición humana, el frijol tiene considerable importancia económica, generando ingresos para miles de pequeños agricultores.

1.2 Procesamiento del frijol

El procesamiento del frijol induce cambios en la microestructura de la semilla provocados inicialmente por la presencia de agua durante la etapa de remojo y

posteriormente por el efecto del calor usado en la cocción (Blancas, 2001). Es sabido que remojar las semillas secas, mejora su calidad de cocción que se detecta como una disminución en el tiempo del tratamiento térmico (Liu y Mc Watters, 1994; Liu *et al*, 1993; Blancas, 2001; Ríos, 2003) y si el remojo se realiza en soluciones salinas de hidróxido de sodio, carbonato de sodio o bicarbonato de sodio, se favorece la absorción de agua y se reduce drásticamente el tiempo de cocción (Hincks y Stanley, 1987). Como consecuencia del remojo de la semilla de frijol fresco, ocurren una serie de cambios en los elementos que constituyen a las células. Los componentes celulares se hidratan e hinchan lo cual ocasiona un aumento en la turgencia de la célula, que tiene como consecuencia disminuir la adhesión intercelular (Hincks y Stanley; 1986;). El calor aplicado durante la cocción fractura y solubiliza la lámina media (Shomer *et al* ,1990) con lo cual, las células se separan disminuyendo la rigidez de la semilla. En el citoplasma las proteínas se desnaturalizan (García Vela y Stanley, 1982), lo que facilita la gelatinización de los gránulos de almidón. Estos cambios fisicoquímicos inducidos por el calor se reflejan en la suavización de la semilla, la pérdida de toxicidad, la adquisición de sabor agradable y un aumento en la digestibilidad.

1.3 Problemas de almacenamiento

La conservación y protección de los granos almacenados constituye una necesidad alimentaria, social y económica. Desde que los seres humanos empezaron a acumular reservas de una manera organizada, particularmente las de tipo alimenticio, trataron de buscar los mejores medios para asegurar su subsistencia. Actualmente, el almacenaje se ha convertido en una práctica de elevado contenido técnico, gracias a la acumulación de experiencias a lo largo de miles de años. Asociar el almacenaje con la política actual de

implantar reservas reguladoras debe llevar a conservar científicamente los granos y a solucionar múltiples problemas físicos, químicos y biológicos que se encuentran íntimamente conectados con esta compleja actividad.

La cosecha en la época adecuada, la limpieza, el secado, los almacenes adecuados en cuanto a ubicación, orientación y trayecto, los silos con sistemas de aeración, y la calidad del producto durante el período del almacenaje, determinan la conservación de los granos (Jamieson y Jobber, 1974).

La pérdida en granos se puede presentar durante la poscosecha, que comprende desde la cosecha, transporte, el almacenamiento y distribución, hasta llegar al consumidor.

Por diversas razones como la ausencia de almacenes apropiados, la escasez de material para limpieza y cribado o simplemente por la falta de información, la semilla producida se somete a un almacenamiento bajo condiciones inapropiadas. Está bien establecido que durante el almacenamiento de las semillas, sobre todo en condiciones de temperatura y humedad relativa altas, éstas pierden calidad, lo que se refleja en una disminución de la velocidad de germinación, en la pérdida de viabilidad así como en el endurecimiento del grano (Molina et al., 1974, Sefa-Dedeh et al., 1980). Este último defecto se observa principalmente en las semillas que deben recibir un tratamiento térmico previo a su consumo.

Existen dos tipos de pérdidas durante el almacenamiento de semillas que se pueden diferenciar claramente, la pérdida cuantitativa a la que por lo general se le da mayor importancia, ya que se manifiesta como una disminución de peso en la semilla almacenada, lo que genera una pérdida económica directa. A la cualitativa se le da menor importancia ya que solamente se manifiesta como disminución en la calidad. Como ejemplo de ésta última podemos mencionar el fenómeno de endurecimiento en frijol, que

se caracteriza por la prolongación del tiempo de cocción para la suavización de la semilla durante su procesamiento.

Por otra parte, el Tratado de Libre Comercio (TLC) ha resultado lesivo para el sector agropecuario y forestal mexicano ya que a través de este convenio nuestro país es importador neto de frijol, principalmente de los Estados Unidos de América. En el TLC se acordó su liberación a 15 años, fijándose una cuota anual de 50,000 toneladas con incrementos por año del 3%, libre de arancel. Esto obstaculiza la comercialización del frijol mexicano y propicia la acumulación de inventarios en donde la semilla sufre largos periodos de almacenamiento para poder ubicarlo en el mercado (Blancas, 2001). Para mayo del 2000 existían 230,000 toneladas de frijol en los estados productores sin comercializarse, malbaratándose y perdiendo su valor nutricional a causa de un almacenamiento inapropiado a alta temperatura y alta humedad relativa, provocando que un 30% de la cosecha se pierda por el endurecimiento de la semilla (SAGARPA, 2002b).

1.3.1 Endurecimiento del frijol (HTC)

El endurecimiento del frijol, tiene importantes implicaciones prácticas. A nivel de consumidor, el tiempo de cocción, es decir el tiempo de tratamiento térmico que la semilla requiere para alcanzar las propiedades de textura y palatabilidad exigidas para el consumidor, es una de las características principales para su aceptación en el mercado ya que si éste se prolonga, representa pérdidas de energéticos (gas, leña y electricidad) y de tiempo; por otro lado, sus características organolépticas y culinarias se ven afectadas ya que no se llegan a obtener la textura y sabor normales del grano; como consecuencia baja la aceptabilidad del grano por el consumidor. Los consumidores requieren cultivares de frijol que presenten tiempos de cocción en olla abierta y a nivel del mar de 40 a 60

minutos. Sin embargo, la magnitud de este parámetro se incrementa cuando las semillas se almacenan en condiciones de humedad y temperaturas altas. El frijol que ha modificado su tiempo de cocción a causa de un almacenamiento inadecuado, se denomina frijol endurecido o frijol envejecido, este defecto es conocido como HTC por sus siglas en inglés *Hard-To-Cook*. Las semillas con el defecto HTC se caracterizan por resistirse al ablandamiento durante la cocción (Liu, 1995, Jons and Boulter, 1983) ya que requieren un tiempo prolongado de cocción para lograr la suavidad apropiada. Actualmente el defecto HTC se refiere a la calidad de cocción más que a un estado físico. En general, entre mayor sea el contenido de agua del grano, la temperatura y el tiempo de almacenamiento, mayor es el tiempo de tratamiento térmico.

Desde el punto de vista bioquímico se sabe que el endurecimiento del frijol va acompañado por cambios tanto en composición química como en microestructura del grano (Satnley y Aguilera, 1985). Algunos constituyentes químicos, sobre los que se ha reportado que modifican durante el almacenamiento y que afectan el proceso de cocción incluyen los fitatos (ácido fitico o fitina), pectatos, cationes divalentes como calcio y magnesio, ligninas y las enzimas pectinmetilesterasa, fitina y polifenol oxidasa.

Los aumentos en el tiempo de cocción del frijol provocan desde diferentes grados de pérdida de valor nutritivo lo cual, aunque es sumamente importante, pasa normalmente desapercibida para el consumidor, hasta la pérdida total del grano cuando su tiempo de cocción es tan prolongado que resulta totalmente inaceptable para cualquier uso. Grados intermedios de aumento en el tiempo de cocción provocan grandes cambios en la aceptación y precio de los granos.

1.4 Estructura de la Semilla

Tanto las prácticas que disminuyen el tiempo de cocción de la semilla de frijol (remojo) como los que lo incrementan (almacenamiento inadecuado) y así como la termosolubilización de la pectina (cocción), son el resultado de modificaciones en la estructura de la semilla, por lo que a continuación se describen las características estructurales de la semilla.

En la semilla de frijol, al igual que en otras leguminosas, se pueden distinguir dos regiones (Fig. 1): la cubierta de la semilla o testa y los cotiledones u hojas embrionarias. La testa es la capa que cubre a los cotiledones y al embrión protegiéndolo contra el exterior, además en ésta se encuentran las características de color y diseño que caracterizan a las semillas de cada cultivar.

Los cotiledones se encuentran directamente por debajo de la testa y constituyen la mayor parte de la semilla, en ellos se encuentran las sustancias de reserva (proteínas, lípidos y carbohidratos) están formados de células parenquimatosas, las cuales contienen distintas paredes celulares y organelos especializados conocidos como gránulos de almidón y cuerpos proteicos (Liu. 1995)

Entre los cotiledones se encuentra localizado el eje embrionario que dará lugar a la futura planta. En la superficie de la semilla se encuentra el hilio, que es la estructura que une al funículo, y el micropilo, un poro en la cubierta de la semilla que se localiza a un lado del hilio y que corresponde en el óvulo al orificio a través del cual penetra el tubo polínico durante la fertilización (Reyes y Paredes, 1993).

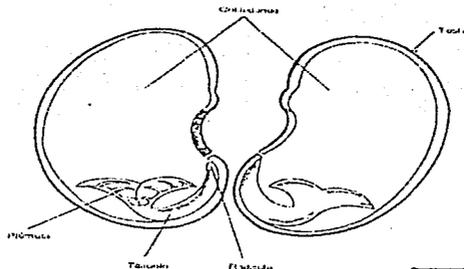


Figura 1. Anatomía de la semilla de frijol

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.4.1 Pared Celular

El ablandamiento de la semilla inducido por el remojo, el tratamiento térmico y el defecto de endurecimiento provocado por un almacenamiento inapropiado se manifiestan en la pared celular del cotiledón del frijol, por lo que es importante detallar su estructura y funcionalidad.

La pared celular es característica de las células vegetales, ésta proporciona rigidez, forma y delimita el tamaño (Thompson y Fry, 2000, McDougall et al. 1986). Muchos de los polisacáridos presentes en las plantas se encuentran en las paredes celulares. Esta estructura se subdivide en lámina media, pared celular primaria y en algunos casos, pero no en cotiledón de frijol, la pared celular secundaria como una extensión de la pared celular primaria. Carpita y Gibeaut (1993) plantean un modelo de pared celular primaria de dicotiledóneas donde proponen dos envolturas de distintas redes de polímeros: una red de celulosa-xiloglucano interaccionando por puentes de hidrógeno y una red de polisacáridos pécticos sostenidos por enlaces de calcio (Fig. 2).

La pared celular tiene cuatro componentes principales, éstos son celulosa, polisacáridos no celulósicos (pectina y hemicelulosas), polifenoles y proteínas. Todas las proteínas de pared analizadas en detalle han resultado ser glicoproteínas de las cuales, algunas 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 pared celular podemos encontrar: Pectin-Metil-Esterasa (PME), Poligalacturonasa (PG), Peroxidasas y Glicosidasas (Stoll and Smits, 1999, García y Peña, 1995).

La lámina media siendo la porción exterior de las células tiene un papel primario en la adhesión intercelular. La pectina al constituir gran parte de la pared celular y de la lámina media contribuyen a la fuerza mecánica de la pared y a la adhesión entre las células (Carpita y Gibeaut, 1993) por lo que las modificaciones que los vegetales sufren durante el ablandamiento están relacionadas con los cambios en las propiedades de las sustancias pécticas (Walter *et al*; 1992).

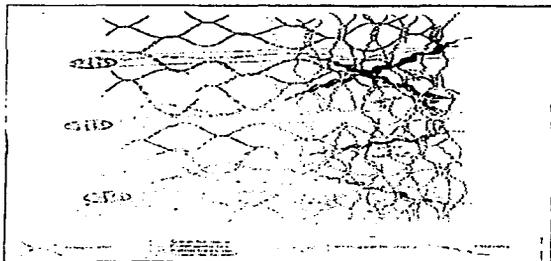


Fig. 2. modelo de la pared celular primaria para dicotiledóneas propuesto por Carpita and Gibeaut (1993).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.5 Pectina

Las pectinas están ampliamente distribuidas en todo el reino vegetal. Son un componente esencial de las paredes celulares de las plantas dicotiledóneas y también se hallan presentes, aunque en menor grado, en las monocotiledóneas. En las primeras, las pectinas constituyen el componente principal de la lámina media y de la pared celular primaria. La pectina está formada por un eje lineal de moléculas de ácido D-galacturónico unidas por enlaces $\alpha(1,4)$, algunos de cuyos grupos carboxílicos están esterificados ya sea con metanol (metoxilados) o con ácido acético (acetilados); contiene además, pequeñas cantidades de azúcares neutros como ramnosa, galactosa, arabinosa, xilosa, entre otros, que forman cadenas laterales en la estructura principal (Fig. *ura 3*) (Blancas, 2001). Este polímero cuenta con tres dominios característicos: Homogalacturonano (HGA), Ramnogalacturonano I (RI) y Ramnogalacturonano II (RII). Se cree que estos tres dominios se unen covalentemente formando una red péctica a través de la lámina media y pared celular primaria (Willats *et al*; 2001).

El HGA es un homopolímero lineal de ácido -D-galacturónico con uniones $\alpha - 1,4$, en algunos casos aproximadamente el 80% del ácido galacturónico se encuentra metil-esterificado (Willats *et al*; 2001). El ramnogalacturonano I (RGI) es la molécula más representativa y abundante del grupo, siendo el componente principal de las dicotiledóneas, presenta una estructura formada por la repetición del disacárido galacturónil-ramnosil del cual alrededor del 50% de la ramnosa presenta ramificaciones de azúcares entre los que predominan la galactosa y la arabinosa formando ya sea galactanos, arabinanos o arabinogalactanos (McNeil *et al*; 1984).

A pesar de su nombre, el RII no se relaciona estructuralmente con el RI. El RII es un dominio altamente conservado formado por un eje rico en ácido galacturónico con

cadenas laterales que contienen once diferentes azúcares. El RI abarca tanto la lámina media como la pared celular primaria, encontrándose en mayor abundancia en esta última estructura, mientras que el RII se localiza solamente en ésta última. La estructura del RI puede ser modificada por diversas enzimas, mientras que del RII no parece ser modificado de manera relevante (Willats *et al*; 2001).

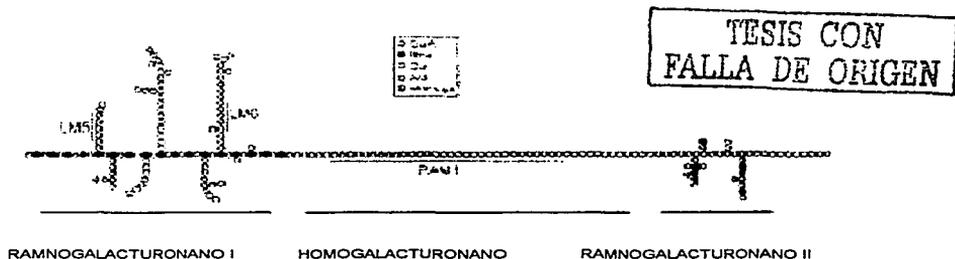


Figura 3. Estructura de la pectina

1.5.1 Degradación enzimática de la pectina

Generalmente para extraer los dominios pécticos se utilizan condiciones ácidas y posteriormente se saponifica con potasa para desesterificar a la pectina. Dichas condiciones posiblemente degradan gran parte del homogalacturonano conduciendo a subestimar el peso molecular evaluado y a no dar importancia al estudio del grado de acetilación y metilación. Estos inconvenientes pueden ser superados mediante la

degradación de la pectina con enzimas. Debido a la variedad de monómeros, sustituyentes y uniones, numerosas enzimas son requeridas para degradar a la pectina (Dolo, 2002).

Tabla 1. Enzimas participantes en la degradación del homogalacturonano

| ENZIMA | SUSTRATO | MECANISMO |
|----------------------|------------------------------|--------------------------------------------|
| POLIGALACTURONASA | Pectinas desmetiladas | Hidrólisis del enlace $\alpha(1-4)$ |
| PECTATO LIASA | Pectinas de bajo metoxilo | Trans-eliminación del enlace $\alpha(1-4)$ |
| PECTINMETIL ESTERASA | Pectinas metil-esterificadas | Hidrólisis de metilenos |

La pectinmetil-esterasa (PME) al eliminar los grupos metilos en C-6 de los residuos de ácido galacturónico de las pectinas permite que el polímero aumente su carga negativa, posibilitando la formación de nuevos puentes de calcio entre ellas (Fry, 1988). Otros autores apuntan a que el aumento de carga puede forzar la separación de las cadenas pécticas, aumentando la relajación de las capas de polisacáridos, y la accesibilidad de las enzimas a sus sustratos (Carpita *et al*; 1979). De esta forma la pectinmetilesterasa puede jugar un papel importante en la accesibilidad a la degradación de las pectinas por las poligalacturonasas (Koch *et al*; 1989). Otro punto importante es que

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

presenta un pH óptimo neutro o, incluso, algo básico (Moustacas *et al*; 1986), frente a los pHs óptimos ácidos de la mayoría de las enzimas de pared. Por lo tanto, se supone que esta enzima actúa en primer lugar, generando un descenso del pH, que causará una disminución de su actividad y un aumento del resto de las enzimas, entre ellas la poligalacturonasa (Rexová *et al*; 1976).

Por otra parte, existen glicosidasas de pared celular las cuales se cree que pueden hidrolizar el dominio péctico denominado ramnogalacturonano. La mayoría de los azúcares neutros presentes en la pectina se encuentran en las cadenas laterales del ramnogalacturonano las cuales podrían ser removidas por glicosidasas de pared celular (Wallner *et al*; 1975). Al remover las cadenas laterales de azúcares neutros se puede llevar a la solubilización y despolimerización de la pectina o simplemente aumentar la susceptibilidad de ésta para ser atacada por pectinasas (Kinsella, 1991).

Antecedentes Inmediatos

Las pectinas son un grupo de heteropolisacáridos complejos presentes en la pared celular en dicotiledóneas. Se concentran en lámina media y decrecen (Redwell *et al*; 1997) gradualmente hacia la pared celular primaria. Las sustancias pécticas contribuyen tanto a la adhesión intercelular como a la fuerza mecánica de la pared celular (Jarvis, 1984).

Estudios en frijol muestran que al ser remojado, la pectina sufre por lo menos tres tipos de modificaciones: a) disminución en el peso molecular de las pectinas b) incremento en la solubilización de pectinas ricas en galactosa y c) disminución en la fuerza de interacción intermolecular (Blancas, 2001). Los tres tipos de modificaciones son inducidos por el remojo en frijol fresco (Blancas, 2001) pero sólo la disminución en la fuerza de interacción se induce en frijol endurecido (Méndez, 2002). Se ha observado que al someter el frijol a un almacenamiento adverso (condiciones de temperatura y humedad relativa altas), el contenido de pectina de alto peso molecular (mayor a 2×10^6 Daltones) se incrementó con respecto a lo observado en frijol fresco (Méndez, 2002).

La solubilización de la pectina y por consecuencia la separación celular durante la cocción de cultivares frescos podría ser resultado de la acción conjunta de pectinasas y glicosidasas de pared celular durante la etapa de remojo de la semilla. Estas enzimas se activarían actuando sobre las cadenas laterales de azúcares con lo que se favorecería la acción de la pectinasa y se incrementaría así la despolimerización de la pectina y por lo tanto un decremento en el tiempo de cocción. Mientras que en el almacenamiento adverso, estas enzimas se activarían removiendo las cadenas laterales de azúcares, permitiendo una mayor fuerza de interacción entre los componentes de la lámina media; o bien, el almacenamiento inadecuado de la semilla resultaría en la inactivación de las enzimas glicosídicas provocando que la pectina del frijol almacenado no modificara su

peso molecular durante el remojo y por lo tanto no se diera la separación celular durante la cocción.

Por lo anterior en este trabajo, se cuantificó la actividad de glicosidasas en pared celular de frijoles frescos y endurecidos, remojados o no y se discute la asociación de este evento con la facilidad de cocción de los frijoles y por tanto de la termosolubilización de la pectina.

Hipótesis

- Si en frijol fresco, la disminución del peso molecular de la pectina inducido por el remojo de la semilla se realiza con la participación de glicosidasas de pared celular, entonces, estas enzimas deberán estar presentes en la semilla de frijol y activarse durante el remojo.
- Si la disminución en la velocidad de termosolubilización de la pectina en semilla almacenada se debe a la acción de glicosidasas, entonces, éstas deberán de estar presentes en las semillas y activarse durante el almacenamiento para realizar su acción *in muro*.

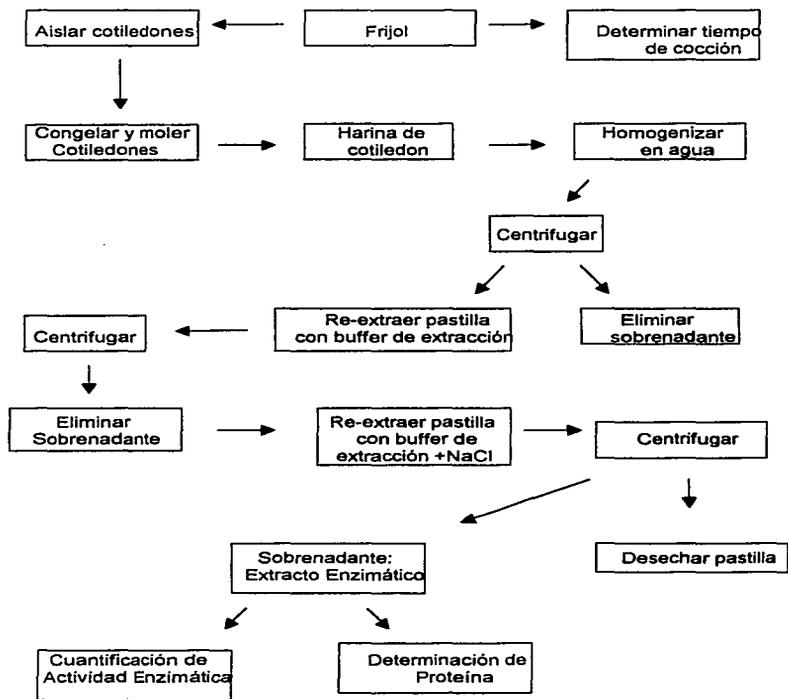
Objetivo General.

- Verificar la posible participación de glicosidasas de pared celular en las modificaciones de la pectina y por lo tanto en el tiempo de cocción del frijol durante el almacenamiento inadecuado y en el remojo.

Objetivos Específicos.

- Determinar el tiempo de cocción de frijol fresco y endurecido.
- Explorar la presencia de glicosidasas de pared celular en tres cultivares de frijol fresco.
- Determinar si el remojo de la semilla afecta a la actividad glicosídica.
- Verificar el efecto del almacenamiento inapropiado del frijol sobre la actividad de las enzimas glicosídicas.

DIAGRAMA DE FLUJO



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

1. Material biológico.

Se utilizaron tres cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris*): Flor de Mayo cosecha 1999, frijol Bayo Mecedral cosecha 1996 y frijol 2626 cosecha 1996. La semilla se mantuvo en un frasco herméticamente cerrado el cual contenía una gasa con silica gel para evitar la humedad en el frasco y se almacenó a 5°C hasta el momento de su análisis.

2. Envejecimiento de la semilla.

En una cámara de envejecimiento subdividida en 18 compartimentos, se colocaron por compartimento 25 semillas de frijol (cultivar Flor de Mayo) y se almacenó a dos condiciones adversas: a 30°C y con una HR del 75% dada por una solución saturada de NaCl durante 2 meses y a 40°C, con una HR del 75% por 30 días. Los cultivares Bayo Mecedral y 2626 se ensayaron solo en estado fresco.

3. Remojo de la semilla.

Se colocaron 25 frijoles en un matraz Erlenmeyer de 125mL el cual contenía agua destilada hasta la mitad de su capacidad. El matraz se guardó a 30 °C durante 18 horas. Posteriormente, el agua contenida en el matraz se decantó y la semilla remojada se utilizó para la determinación del tiempo de cocción y para la cuantificación de la actividad enzimática.

4. Determinación del Tiempo de Cocción.

El Tiempo de Cocción se determinó usando una adaptación del aparato conocido como "cocinador Mattson" (Fig. 4). Consiste de una olla con agua hirviendo, en la que se introdujo el cocinador que contenía un frijol por perforación (25 perforaciones), a cada frijol se le colocó una varilla con una pesa de 200g. La olla se tapó con un capuchón de plástico y se mantuvo en ebullición durante 300 minutos o antes si todas las semillas fueron perforadas. Se anotó el tiempo de perforación de cada semilla. El Tiempo Medio de Cocción (TC_{50}) se determinó cuando el 50% de las varillas atravesaron los frijoles, lo que indica su cocción. Las pruebas de cocción se realizaron por triplicado para cada tratamiento; frijol fresco (seco y remojado) y frijol almacenado (seco y remojado).

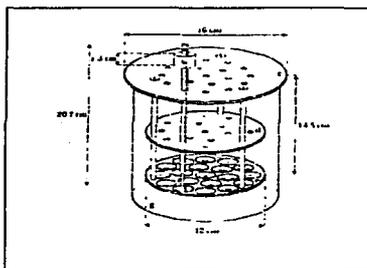


Figura 4. Cocinador Mattson

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se hizo un gráfico (Fig. 6) del cual se obtuvo el TC₅₀ determinado como los minutos en los que el 50% de las semillas de frijol se cuecen.

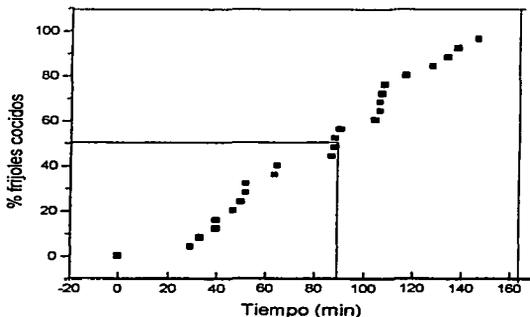


Figura 6. Cinética de cocción de de frijol Flor de Mayo. En la gráfica se indica el tiempo de cocción medio.

5. Obtención de los cotiledones

Frijol seco: Se retiraron la testa y el eje embrionario con ayuda de una navaja. Los cotiledones obtenidos se guardaron bajo condiciones de refrigeración (4°C) en un frasco de vidrio cerrado y etiquetado.

Frijol remojado: Después del periodo de remojo, la semilla se partió por la mitad, se retiraron la testa y el eje embrionario, obteniéndose de esta manera los cotiledones.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. Extracción enzimática.

La extracción enzimática para los tres cultivares se realizó de la siguiente manera:

Frijol seco: Los cotiledones se molieron a base de pulsos en una licuadora, la harina de cotiledón obtenida se tamizó.

En un mortero se colocaron 150 mg de la harina tamizada de cotiledón, se congeló con nitrógeno líquido y posteriormente la harina se trituró con la ayuda de un pistilo. A la harina triturada se le agregaron 3 mL de agua destilada, se homogenizó y la mezcla se pasó a un tubo Corex de 30 mL. Se centrifugó a 6500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se colocó en un tubo de ensayo en baño de hielo. A la pastilla resultante se le agregaron 3ml de agua destilada y se sometió a agitación magnética durante 30 minutos en un baño de hielo. Luego se centrifugó a 6500 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se colocó en el tubo que contenía el primer sobrenadante obteniéndose de esta manera el extracto enzimático de citoplasma de frijol. A la pastilla se le agregaron 3ml de buffer de extracción, citrato de sodio 0.1M conteniendo NaCl 1M, pH= 4.6 y se dejó en agitación magnética durante 30 minutos en un baño de hielo. Después de la agitación magnética, se centrifugó a 6500 rpm durante 10 minutos y se obtuvo el extracto enzimático de pared celular de frijol.

Frijol remojado: Los cotiledones de 5 frijoles remojados se colocaron en un mortero, se trituraron con ayuda de un pistilo y se prosiguió como en la metodología de extracción enzimática para frijol seco.

Los extractos enzimáticos para el frijol envejecido tanto seco como remojado se hicieron de la misma manera que en frijol fresco.

7. Actividad Enzimática.

La mezcla de reacción para la determinación de la actividad enzimática en frijol seco consistió en 0.14mL de citrato de sodio 0.1M, llevado al pH óptimo para cada enzima (pH 5.2 para la α -arabinosidasa y β -glucosidasa, 4.7 para la α -galactosidasa, β -arabinosidasa y α -glucosidasa, 4.1 para β -galactosidasa, 4.6 tanto para la α -xilosidasa como para la β -xilosidasa), 0.15mL de BSA al 0.1% (w/v) y 0.1mL 35 mM del p-Nitrofenil (sigma) correspondiente (β -D-galactopiranosido, α -D-galactopiranosido, β -D-glucopiranosido, α -D-glucopiranosido, β -D-xilopiranosido, α -D-xilopiranosido, β -D-xilopiranosido, α -D-xilopiranosido) como sustrato. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente se añadieron 0.05mL del extracto enzimático de frijol seco, se incubó a 37°C durante 15 minutos, para detener la reacción se agregó 0.7mL de Na_2CO_3 0.2M. La mezcla de reacción se diluyó con agua destilada a 1.3mL. El p-Nitrofenil formado fue determinado espectrofotométricamente a 415nm.

El ensayo de la actividad enzimática en frijol remojado se determinó de la misma manera, en este caso utilizando 0.01mL del extracto enzimático.

8. Determinación de Proteína.

Se determinó proteína por el método de Lowry *et al* (1978). En un tubo de ensaye se colocaron 0.01mL de extracto enzimático de frijol seco (0.002mL del extracto obtenido de frijol remojado), 1mL de solución C (que contiene Na_2CO_2 2%, NaOH 0.4% tartrato de potasio 0.16% y SDS 1%, adicionando $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4% en una proporción 100:1) y agua destilada c.b.p. 1.35mL. Después de 10 minutos se agregó 0.1mL de reactivo de Folin, se agitó y la mezcla de reacción se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente para desarrollar color. Se leyó a una longitud de onda de 660nm. Se utilizó una

curva patrón la cual se realizó con una solución estándar de seroalbúmina de bívino (SIGMA) en concentración de 0 - 100 μg / mL, siguiendo la técnica de Lowry para conocer los μg de proteína presentes en la muestra.

Resultados

1. Determinación del tiempo de cocción

Con la finalidad de conocer el efecto del remojo y del almacenamiento de la semilla sobre el tiempo de cocción se determinó con la ayuda del "cocinador Mattson" el tiempo de cocción medio (TC_{50}) del cultivar flor de mayo fresco y almacenado en dos condiciones inadecuadas, diferentes en la temperatura y en el tiempo de almacenamiento (tabla 2).

El frijol fresco se coció independientemente de que el tratamiento térmico se aplicara a la semilla con o sin remojo. El tiempo de cocción fue tres veces menor en el primer caso con respecto al segundo. El frijol almacenado en cualquiera de las condiciones presentó un tiempo de cocción superior a 300 minutos, por lo cual se considera que ya no se cuece (Jakcsón y Variano 1981). El remojo de la semilla almacenada indujo su cocción solo cuando el almacenamiento se realizó a temperaturas de 30°C.

Tabla 2. Efecto del remojo de la semilla en el tiempo de cocción medio (T_c 50) del cultivar Flor de mayo fresco y almacenado a diferentes condiciones adversas.

| TRATAMIENTO | TC 50 | |
|-------------------------|--------------|--------------|
| | Sin Remojo | Con Remojo |
| Control (Fresco) | 126 minutos | 38 minutos |
| 75% HR / 30°C / 60 días | >300 minutos | 126 minutos |
| 75% HR / 40°C / 30 días | >300 minutos | >300 minutos |

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. Actividad Enzimática

La actividad glicosídica se ensayó en la pared celular extraída con alta fuerza iónica de la fracción insoluble de los cotiledones, una vez que la semilla se sometió a diferentes tratamientos. Las glicosidasas ensayadas fueron: la glucosidasa, la galactosidasa, la xilosidasa y la arabinosidasa en sus dos modalidades, α y β , en cada caso. La presencia de las glicosidasas se detectó en la semilla fresca de los tres cultivares sin ningún tratamiento (Tabla 3). Los niveles de actividad para cada una de las enzimas fue cultivar dependiente. Las enzimas con mayor actividad fueron α -galactosidasa y la β -glucosidasa. En el caso de las actividades de las enzimas que reconocen pentosas: xilosidasa y arabinosidasa, la actividad para cada modalidad enzimática (α y β) fue similar con excepción de la actividad de xilosidasa presente en Bayo Mecentral donde la actividad de α -xilosidasa fue 5 veces mayor que la de β -xilosidasa (tabla 3).

Tabla 3. Actividad Específica de Glicosidasas de Pared Celular de 3 cultivares de frijol fresco

| ENZIMA | GALACTOSIDASA | | GLUCOSIDASA | | XILOSIDASA | | ARABINOSIDASA | |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------|----------|-------------|----------|------------|----------|---------------|----------|
| | β | α | β | α | β | α | β | α |
| ACTIVIDAD ENZIMATICA (nmol p-nitrofenol liberado/minuto/mg proteína) | | | | | | | | |
| Cultivar | | | | | | | | |
| Flor de Mayo | 5.5 | 27.2 | 21.3 | 9.5 | 6.4 | 6.5 | 2.4 | 2.4 |
| 2626 | 5.0 | 13.0 | 9.0 | 6.0 | 4.0 | 3.0 | 5.0 | 4.3 |
| Bayo Mecentral | 4.1 | 22.0 | 8.2 | 6.4 | 1.0 | 5.0 | 3.0 | 3.0 |

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

3. Efecto del remojo en la actividad glicosídica de pared celular en frijol Flor de Mayo

Con excepción de la α -galactosidasa y β -glucosidasa, cuyas actividades se mantuvieron al mismo nivel (Fig. 6) el remojo de la semilla resultó en modificaciones de la actividad del resto de las glicosidasas. La magnitud y sentido de este cambio fue enzima y cultivar dependiente.

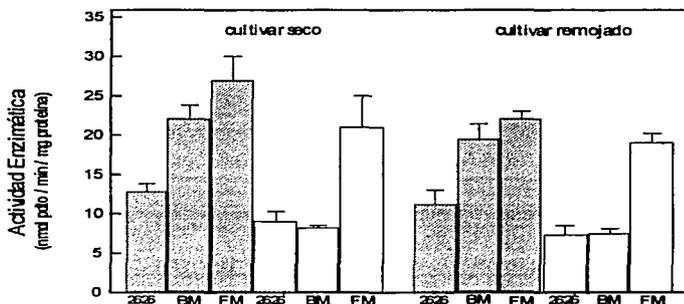


Figura 6. Efecto del remojo sobre la actividad enzimática de la α -galactosidasa (▨) y de la β -glucosidasa (□) en tres cultivares de frijol fresco: 2626, Bayo Mecentral (BM) y Flor de Mayo (FM).

El mejor ejemplo de esta aseveración lo constituye el comportamiento de la actividad de la α -glucosidasa (Fig. 7). En el cultivar Flor de Mayo, la actividad de ésta enzima no se modificó de manera significativa, en el cultivar 2626, la actividad de ésta

enzima disminuyó del orden de dos veces, mientras que en el cultivar Bayo Mecentral, la actividad de dicha enzima se incrementó por casi dos veces.

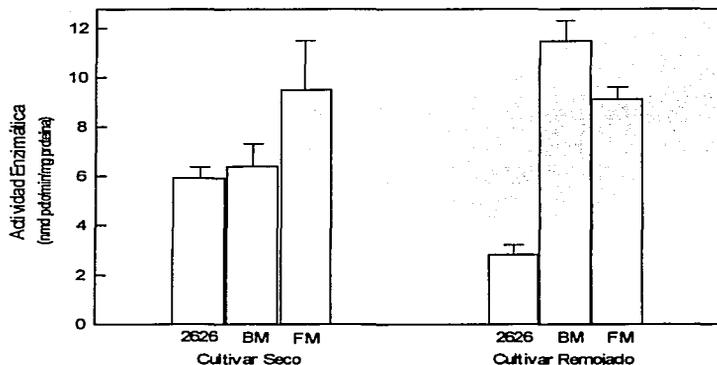
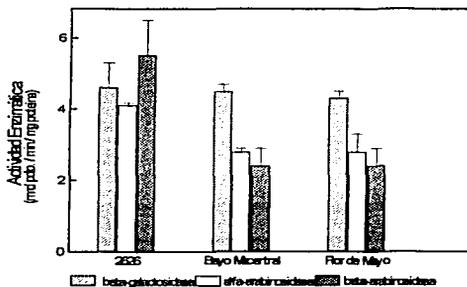


Figura 7. Efecto del remojo sobre la actividad de la α -glucosidasa en 3 cultivares de frijol fresco: 2626, Bayo Mecentral (BM) y Flor de Mayo (FM)

Entre las enzimas que incrementaron su actividad por efecto del remojo en los tres cultivares de frijol, están la β -galactosidasa, la α -arabinosidasa y la β -arabinosidasa (Fig. 8). Este incremento fue de dos veces para la primera glicosidasa y dependiendo del cultivar aumentaron de 1.5 a 3 veces para la actividad de las dos últimas.

FALLA DE ORIGEN

A) Cultivar Seco



B) Cultivar Remojado

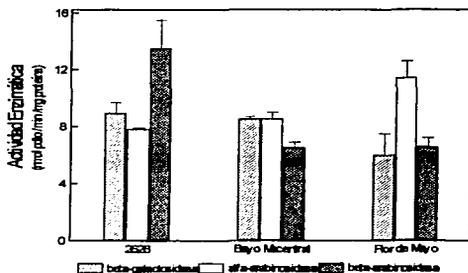


Figura 8. Incremento de la actividad glicosídica por efecto del remojo (B) en tres cultivares de frijol fresco: 2626, Bayo Micertral (BM) y Flor de Mayo (FM).

TRABAJOS CON
FALLA DE ORIGEN

4. Efecto del almacenamiento en la actividad de glicosidasas de pared celular en frijol Flor de Mayo.

El efecto del almacenamiento en la actividad glicosídica se determinó sólo en frijol Flor de Mayo almacenado a 30°C/ 75%HR durante 60 días. Se siguió exactamente la misma metodología utilizada en semillas frescas. La actividad se ensayó en frijoles almacenados con y sin remojo, siendo este último durante 18 horas a 37° C.

El almacenamiento de la semilla afectó negativamente la actividad de las glicosidasas ya que en todos los cultivares y para todas las enzimas ensayadas, la actividad fue menor en frijol almacenado que en frijol fresco (Fig. 9). El remojo del frijol almacenado, no modificó la magnitud de la actividad enzimática (Fig. 10).

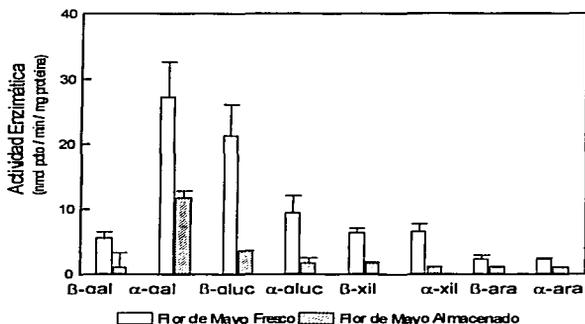


Figura 9. Efecto del Almacenamiento sobre la actividad de Glicosidasas de Pared Celular de Frijol Flor de Mayo fresco.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

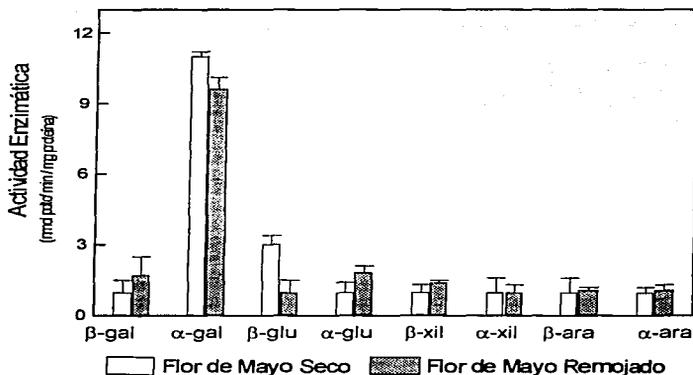


Figura 10. Efecto del Remojo sobre la actividad de Glicosidasas de Pared Celular de Frijol Flor de Mayo Almacenado.

5. Efecto de glicosidasas sobre el tiempo de cocción del cultivar Flor de Mayo almacenado

Para demostrar que las glicosidasas participaban en la modificación de las pectinas, se determinó el efecto de glicosidasas exógenas en el tiempo de cocción de un lote de frijol. Este lote lo constituyó el frijol Flor de Mayo almacenado por dos meses a 75% de humedad relativa y 40°C, el cual no se coció aún después de haberse remojado (Tabla 2).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Quando el frijol almacenado que no se cuece (almacenado a 40°C), se remojó en la solución enzimática durante 18 horas y luego se sometió al tratamiento térmico, el frijol se coció con un TC₅₀ ligeramente más alto que el presentado por el que se almacenó a 30°C. Sin embargo, el cultivar que no fue remojado en presencia del caldo enzimático no logró su cocción (Tabla 4).

Tabla 4. Tiempo de cocción medio (TC₅₀) en frijol Flor de Mayo almacenado a 40°C/75%HR/30 días. Remojado en presencia y ausencia de enzimas de *Aspergillus niger*

| TRATAMIENTO | TIEMPO DE COCCIÓN MEDIO (TC ₅₀) |
|--------------------------------|---------------------------------------------|
| REMOJO EN PRESENCIA DE ENZIMAS | >300 minutos |
| REMOJO EN AUSENCIA DE ENZIMAS | 143 minutos |

El experimento consistió en remojar frijol escarificado del lote antes descrito en una solución de caldo enzimático producido por *Aspergillus niger*, conteniendo actividad de glicosidasas mayor a la existente en el cotiledón de frijol fresco. La composición cuantitativa de algunas de las enzimas en el caldo enzimático de *Aspergillus niger* se muestra en la tabla 5. La composición enzimática de este caldo fue muy rica en cantidad de β-arabinosidasa y en menor proporción (4 veces) están presentes la α y β-glucosidasa, así como la α-galactosidasa. El resto de las enzimas presentan una actividad similar pero por debajo de las ya mencionadas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 5. Actividad Enzimática de glicosidasas de pared celular en un caldo enzimático producido por *Aspergillus niger*.

| | ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (nmol p-nitrofenol liberado/ minuto/mg proteína) | |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------|---------|
| | α | β |
| GALACTOSIDASA | 45 | 23 |
| GLUCOSIDASA | 43 | 48 |
| XILOSIDASA | 26 | 24 |
| ARABINOSIDASA | 37 | 210 |

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

El tiempo de cocción del frijol constituye una de las características más importantes que determinan la aceptación de la semilla por el consumidor, sin embargo, el tiempo de cocción que presenta un lote de frijol depende de factores muy diversos, tales como condiciones de cultivo y de cosecha, manejo poscosecha de la semilla, cultivar de que se trate, condiciones de cocción, tiempo transcurrido desde la cosecha de la semilla, condiciones de almacenamiento, solo por nombrar algunos (Liu, 1995). Es por esto que en la ciencia de los alimentos hay toda un área de investigación dedicada a definir las bases moleculares de la cocción del frijol. En estos estudios se ha demostrado que la magnitud del tiempo de cocción de la semilla es reflejo de la velocidad con que se termosolubilizan las pectinas. A su vez, esta velocidad de termosolubilización está influida por el peso molecular de la pectina, por la fuerza de interacción intermolecular y de la asociación con el calcio. De lo antes dicho se puede concluir que las propiedades fisicoquímica de las pectinas determinan el tiempo de cocción del frijol. Se ha reportado que las propiedades fisicoquímicas de las pectinas también pueden modificarse *in mero* por la acción de diversas enzimas, entre ellas, glicosidasas de pared celular (Vennigerholz et al;1987).

Dos tratamientos que modifican el tiempo de cocción del frijol son el remojo de la semilla previo al tratamiento térmico (Blanca 2002, Martínez 2003) y el almacenamiento de la semilla en condiciones inadecuadas (HR >50% y T>15°C) (Ramírez, 1990). El primero disminuye el tiempo de cocción y el segundo lo incrementa. Ambos resultados sugieren que las propiedades fisicoquímicas de las pectinas se modificaron durante el tratamiento. En el primer tratamiento la modificación incrementó la velocidad de termosolubilización de la pectina y en el segundo la disminuyó, respecto de la que

presenta este polímero en el frijol fresco sin tratamiento alguno. Se ha demostrado que el peso molecular de la pectina es menor cuando se aísla de frijoles frescos remojados que cuando se utilizan semillas frescas sin remojar (Blancas, 2002). Esta disminución no se observó en frijol almacenado o endurecido (Méndez, 2003).

Tanto el remojo como el almacenamiento inadecuado del frijol resultan en la hidratación de la pared celular y por tanto de la lámina media. Por lo que sería posible que durante ambos eventos, algunas de las enzimas presentes se activaran y realizaran su acción *in muro* y por tanto serán las responsables de los cambios que sufren las pectinas, que resultan en la modificación del tiempo de cocción.

Las pectinas de dicotiledóneas están constituidas por cadenas laterales de arabinosa, xilosa, glucosa y galactosa, unidas a una cadena lineal formada por segmentos de homogalacturonano y de ramnogalacturonano (Willats *et al*; 2001). Los azúcares están unidos a la posición 4 de la ramnosa en el dominio del ramnogalacturonano (Oechslein *et al*; 2003). Por ello, en este trabajo sólo se exploró la presencia de las glicosidasas correspondientes en sus dos especificidades anoméricas: glucosidasa (α y β), arabinosidasa (α y β), xilosidasa (α y β) y galactosidasa (α y β). Todas estas glicosidasas se encuentran presentes en la semilla fresca y almacenada. Solo que en el primer caso la actividad detectada fue mayor que en el segundo. Esto sugiere que el almacenamiento inadecuado de la semilla modifica a la enzima. Esta modificación resulta en una disminución de la actividad enzimática. Entre las modificaciones que sufren las proteínas se encuentran la glicosilación, la proteólisis y la oxidación de grupos sulfhidrilos. La modificación no pudo ser debida a proteólisis pues la actividad de las glicosidasas no se modificó cuando la extracción de la enzima se realizó en presencia de inhibidores de proteasas (datos no mostrados). Para demostrar cualquiera de las otras dos posibilidades,

la enzima se debe aislar y purificar y posteriormente determinar el grado de oxidación de sulfhidrilos o de glicosilación.

El efecto del remojo en la actividad de estas glicosidasas dependió de si la semilla era fresca o almacenada. En el cultivar fresco la actividad se incrementó, en el almacenado no se modificó. Por otro lado se ha demostrado que en las semillas de trigo almacenado inadecuadamente, los procesos de traducción y transcripción de ácidos nucleicos se encuentran disminuidos (Blowers,1980), por lo que bien podría ser que durante el almacenamiento de frijol la actividad de estas glicosidasas no se incremente debido a que, al igual que en el trigo, los procesos de síntesis de macromoléculas se encuentren dañados.

Las enzimas aquí cuantificadas son glicosidasas de pared celular ya que su extracción se realizó con alta fuerza iónica del residuo celular después de haber eliminado las albúminas, proteínas solubles en buffers con baja fuerza iónica. En esta fracción se localizan las glicosidasas citoplásmicas las cuales también fueron eliminadas. Para evitar que la actividad de glicosídica de pared celular se contaminara con la de citoplasma, el residuo celular se lavó con buffer de baja fuerza iónica hasta no detectarse actividad glicosídica.

La actividad específica de las glicosidasas de pared celular, en su gran mayoría es menor que la reportada en semillas germinadas. Esto podría deberse al hecho de que si bien el residuo celular estaba libre de glicosidasas, las globulinas debido a que son solubles en alta fuerza iónica, se extrajeron junto con las glicosidasas de pared celular, de tal forma que la cantidad de proteína que no es de pared celular no es muy grande. La otra posibilidad para explicar esta baja actividad, podría ser que la enzima fuera una endoglicosidasa y no una exoglicosidasa. El primer tipo enzimático mostraría menor actividad por el sustrato utilizado y por lo tanto menor actividad enzimática. La distinción

entre los tipos enzimáticos no se pudo realizar debido a que para la actividad de endoglicosidasas se requiere equipo con el cual no contábamos en el laboratorio.

La semilla almacenada en condiciones adversas no se coció, independientemente de la temperatura de almacenamiento (30 y 40°C), esto indica que en ambas condiciones la pectina se modificó, esta modificación fue parcialmente reversible por el remojo en agua, sólo en el frijol almacenado a 30°C. Lo cual solo sería posible, si durante el almacenamiento a 30°C y 75% de HR, la interacción molecular de las pectinas se incrementara a través de disminuir el grado de metilación ya sea por que no se realiza la β -eliminación o bien porque se aumenta la fracción de galacturónico que interacciona con calcio. Esta modificación de las pectinas se revertiría durante el remojo, pues en esta condición hay escape de iones monovalentes y protones que podrían remover el calcio de sus sitios de unión, incrementando su termosolubilización respecto a la semilla sin remojar. El tiempo de cocción sería alto por que no hay modificaciones del polímero péctico a manos de las enzimas.

En el caso de la semilla almacenada a 40°C se realizarían las modificaciones ya descritas y además de la formación de enlaces covalentes intermoleculares, como es el caso de la formación de diferúlico o lignificación. Ambos procesos han sido documentados en frijol almacenado en condiciones adversas (Moscoso *et al*,1984; Aguilera *et al*,1985). Estas modificaciones covalentes podrían contribuir de manera muy importante a que el frijol en estas condiciones no se cociera. El hecho de que el frijol almacenado a 40°C se cueza cuando la semilla se remoja con enzimas de *Aspergillus niger*, indica que el efecto benéfico del remojo está mediado por la intervención de enzimas que participan en la despolimerización de la pectina, entre ellas, las glicosidasas ensayadas en nuestro estudio.

Los resultados obtenidos permiten postular dos modelos, uno para explicar el pefecto benéfico del remojo y otro para explicar el envejecimiento. En frijol fresco las pectinas son de alto peso molecular con alto grado de esterificación. Durante la cocción estos polímeros de alto peso molecular tardan más en termosolubilizarse que los de menor peso molecular. Cuando frijoles de este lote se remojan previo a la cocción, las glicosidasas remueven los azúcares laterales del dominio del ramnogalacturonano, la pectinmetilesterasa desmetila el homogalacturonano, lo que permitiría la actividad de la ramnogalacturonasa (no estudiada en éste trabajo) y de la poligalacturonasa. La acción conjunta de dichas enzimas resultaría en una disminución del peso molecular de la pectina con lo cual se incrementaría la velocidad de termosolubilización del polímero y la disminución en el tiempo de cocción del frijol.

El envejecimiento de la semilla involucra la pérdida de la capacidad de la semilla para biosintetizar glicosidasas. La actividad de la pectinmetilesterasa y de enzimas que sintetizan diferúlico que son de tipo de las peroxidadas, podrían estar actuando *in muro* debido a la alta temperatura y a la alta actividad de agua. Por efecto de la acción de estas enzimas las características de la pectina en frijol endurecido son diferentes a la que presentan las semillas frescas. En el primer caso, las pectinas son de alto peso molecular, con menor índice de metilación y con enlaces covalentes intermoleculares. Esto impide la termosolubilización de las pectinas, debido al incremento en la fuerza de interacción celular.

La acción de enzimas podría ser secuenciada o dependiendo de las condiciones en el almacén, la acción de algunas de ellas se facilitaría más que la de otras y así tendríamos semillas de frijol donde solo se haya disminuido el grado de metilación de la pectina y que al ser remojado, la velocidad de termosolubilización se mejore por efectos diferentes a la acción de glicosidasas, por ejemplo, intercambio iónico.

La sensibilidad de cada uno de estos eventos al deterioro en almacén es diferente, por ejemplo, el daño en el proceso de la biosíntesis de macromoléculas se efectúa a 30°C o a 40°C, la inactivación de glicosidasas se realiza de 30 a 40°C, la activación de la pectinmetilesterasa se lleva a cabo a 30°C, la activación de la peroxidasa se realiza de 30 a 40°C siendo a 40°C más rápida su acción. Se ha demostrado que en frijol almacenado a 30°C por 6 meses no se cuece cuando se remoja en agua, indicando una modificación irreversible de la pectina.

Conclusiones

- El remojo del grano incrementa la calidad de cocción tanto en la semilla fresca como en la parcialmente endurecida.
- Las glicosidasas de pared celular ensayadas estuvieron presentes en el frijol fresco.
- El remojo del grano fresco favorece la actividad de 4 glicosidasas: arabinosidasa (β y α), β -galactosidasa, β -xilosidasa y α -glucosidasa.
- El almacenamiento inadecuado del frijol induce la disminución de la actividad glicosídica.
- El remojo no favorece la actividad de las glicosidasas en el frijol endurecido como en un cultivar fresco.
- La adición de enzimas durante el remojo de un cultivar endurecido favorece la cocción de la semilla.

Bibliografía

- Aguilera, J. (1985). Dry processes to retard quality losses of bean (*Phaseolus vulgaris*) during storage. *Can Inst. Food Technol. J.* 18, 72-87.
- Blancas Morales V. (2001). Estudio de las modificaciones en la pectina que ocurren durante el remojo de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Tesis Fac. Química. U.N.A.M. México D.F. 52 páginas.
- Blowers, E., Stormonth D., Clifford M. (1980). Nucleic acid and protein synthesis and loss of vigour in germinating wheat embryos. *Planta.* 15, 19-25.
- Brummell, D. and Harpster, M. (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molec. Biol.* 41, 311-340.
- Carpita, N. and Gibeaut, D. (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.
- Dey, P., Brinson K. (1984). Cell wall and fruit ripening. *Adv. Carbohydr. Chem., biochem.* 42, 339-382.
- Dolo E. (2002). Pectin and cell wall metabolism. *Plant Physiol.* 103: 429-433.

- Fry, S. (1988). Cross-linking of matrix polymers of the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Rev. plant physiol.* 37, 165-168.
- García Hernández Edith, Peña Valdivia Cecilia (1995). La Pared Celular componente fundamental de las células vegetales. Universidad Autónoma de Chapingo. 95 páginas.
- García-Vela and Stanley D. (1982). Protein denaturation and starch gelatinization in hard-to-cook beans. *J. Food Sci.* 54, 1284-1289.
- Gaspar, T., Penel, C, Hedege, D. and Greppin, H. (1991). In Biochemical, molecular and physiological. Aspects of plant peroxidases. Imprimerie Nationale, University of Geneva, Geneva. 280 pp.
- Hincks, M., Stanley D.W. (1986). Multiple mechanisms of bean hardening. *J. of Food Technol.* 21, 731-750.
- Jacson, G. and Variano M. (1981). Hard -to-cock phenomenon in bean: effects of accelerated storage on water absorption and cooking time. *J. Food Sci*, 46 (3). 799-804.
- Jaimeson, M. y Jobber P. 1974: Vol 3. Prevención de pérdidas durante el almacenamiento. Editorial Pax-Mex. 397-564.

- Jarvis, M. (1984). The proportion of calcium-bound pectin in plant cell walls. *Planta*. 15, 344-346.
- Jones, P., Boulter, D. 1983. The cause of reduced cooking rate in *Phaseolus vulgaris* following adverse storage conditions. *J. Food Sci.* 48, 623-626.
- Kinsella, J. (1991). The chemistry and thecnology of pectin. Academic Press. N.Y. 273 pp.
- Koch, R. (1989). Binding of divalent cations to oligomeric fragments of pectin. *Carbohydr. Res.*, 10, 343-350.
- Kon, S. (1968). Pectin substances of dry beans and their possible correlation with cooking time. *J. Food Sci.*, 33, 437-444.
- Liu, K. (1995). Cellular, Biological and Physicochemical basis for the Hard To Cook defect in legum seeds. *Critical reviews in food science and nutrition*. 35, (4): 263-298.
- Liu, K., McWatters K., (1994). Intermolecular association in pectin solution. *J. Agric. Food Chem.* 40, 2483-2487.
- Liu, K., Phillips, D., McWaters, K. (1993). Mechanims of pectin changes during soaking and heating as related to Hard- to-Cook defect in cowpeas. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1476-1480.

- McNeil, A., Darvill, S. and Albersheim P. (1984). Structure and function of the primary cell walls of plantas. *Ann. Rev. Biochem.* 53, 625-632.
- McDougal, M. (1986). The and nutritional significance of bean hardening. *Arch. Latinoam. Nutr.* 32, 308-315.
- Martínez Silva A. (2003). Relación entre la actividad de la poligalacturonasa y la calidad de cocción del frijol. Tesis Fac. Química, U.N.A.M. México, D.F. 56 páginas.
- Méndez Morales R. (2003). Influencia del remojo en las pectinas de la lámina media de los cotiledones de frijol deteriorado (*Phaseolus vulgaris*). Tesis Fac. de Química. U.N.A.M. México, D.F. 63 páginas.
- Molina, M., De la Fuente, G. y Bressani, R. (1974). Interrelaciones entre tiempo de remojo, tiempo de cocción, valor nutritivo y otras características del frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* 32. (2): 469-480.
- Moscoso, W., Bourne, M. and Hood, L. (1984). Relationship between the hard-to cook phenomenon in red kidney beans in water absorption , puncture force, pectin, phytic acid, and minerals. *J. Food Sci.*, 49, 1577-1589.
- Moustacas, A., Nari, J. (1986). Electrostatics effects and dynamics of enzyme reaction at the surface of plant cells. *Journal of Food Biochem.* (155):116-120.

- Oechslin, R, Marc V. Lutz, Renato Amado. (2003) Pectin substances isolated from apple cellulosic residue: structural characterization of a new type of rhamnogalacturonan I. *Carbohydrate Polymers*. 51 (2): 301-310.
- Ramírez González J. (1990). Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el endurecimiento del grano de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Tesis. Fac. de Ciencias. U.N.A.M. México. D.F. 63 páginas.
- Redwell, R., Fischer M., Kendal E. (1997). Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta*. 203, 174-181.
- Reyes, Moreno C. y Paredes López, O. (1993). Hard to cook phenomen common beans a review. *Food science and nutrition*. 33 (3): 227-286.
- Rexová-Benkova, L. y Marcovick, O. (1976). Pectic enzymes. *In advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. Academic Press. N. Y. 323-385.
- Ríos Barajas Marcela Yanel. (2003). Efecto del grado de metilación en las pectinas de frijol. Tesis. Fac. de Química. U.N.A.M. México, D.F. 55 páginas.
- SAGARPA (2002b), producción de frijol en México: diversidad y libre mercado, Claridades Agropecuarias, 3-23.

- Sefa-Dedeh, 1980. Textural implications of the microstructure of legumes. *Food Technology*, 33: 77-83.
- Shomer, I. (1990). The role of cell wall structure en the hard to cook phenomen in beans (*Phaseolus vulgaris L.*), *Food struct.* 9, 139-146
- Sousa Rojano H. (1993) Estudio comparativo de la composición química de frijoles (*Phaseolus vulgaris*) silvestres y cultivados. Tesis Facultad de Química. U.A.N.A.M. México D.F. 93 páginas.
- Stanley, D. and Aguilera J. (1985). A reviw of textural defects in cooked reconstituted legumes the influence of structure and composition. *J. food Biochem.* 3, 227-236.
- Stoll S. (1999). Changes in cell wall polysacharides of green bean pods during development. *Plant Pysiol.*121: 257-266.
- Thompson E. and Fry C. (2000). Evidence for covalent linkage between xiliglucano acidics pectins in suspension-cultured rose cell. *Planta.* 211: 275-286.
- Vennigerholz, F., and Wales, B. (1987) Cytochemical studies of pectin digestion in epidermis with specific cell separation protoplasm. *Planta.*140: 110-117.
- Wallner, S. J., and Walker, J.E (1975). Glycosidases in cell-wall degrading extracts of ripening tomato fruits. *Plant physiol.* 55, 94-98.

- Walter, W. Fleming, H. and Mcfeeters, R. (1992). Firmness control of sweetpotato French frytype product by tissue acidification. *J. food Sci.* 57: 138-146.

- Willats G. (2001): Cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology.* 47: 9-27.