

00528
79



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

"EFECTO DEL ALMACENAMIENTO DEL FRIJOL EN LA
METILACION DE LA PECTINA Y LA ACTIVIDAD DE
PECTINMETILESTERASA"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
MARCELA YANEL (RIOS BARAJAS)



MEXICO, D.F.

2003

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.

Jurado asignado:

Presidente: IRMA OFELIA BERNAL LUGO
Vocal: ELPIDIO GARCÍA RAMÍREZ
Secretario: JOSÉ GUILLERMO DE J. AGUILAR OSORIO
1er. Suplente: GLORIA DÍAZ RUIZ
2do. Suplente: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMENEZ

Sitio donde se desarrolló el tema:
Laboratorio 104. Conjunto E. Facultad de Química. UNAM.
Laboratorio 101. Edificio B Sótano. Postgrado. Facultad de Química. UNAM


Asesor del tema:
IRMA OFELIA BERNAL LUGO


Supervisor técnico:
CARMEN LABASTIDA RUBIO


Sustentante:
MARCELA YANEL RÍOS BARAJAS

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por permitirme abrirme sus puertas y cumplir uno de mis sueños.

A la Facultad de Química por ser mi hogar por 5 años y ahí encontrar tanto los conocimientos y amistades que me hicieron crecer como persona.

A todos mis profesores que fueron una parte importante en mi formación académica.

A la Doctora Bernal por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por la paciencia que me demostró siempre al transmitirme sus conocimientos.

A mis compañeros del Laboratorio 104: Vanessa Maya, Adriana Camacho, Adriana Minaya, Karla, Grethel, Lluvia, Javier Andrés, Goyo, Yuridia y Andrea por ser la pastillita de buena vibra al llegar al laboratorio.

Y por ser parte de este laboratorio también al Sr. Enrique por apoyarme con mi material siempre limpio.

A mis compañeros del Laboratorio 101 de postgrado (Alejandra, Mario, Laura, Talina y Miguel) por apoyarme siempre en mis dudas y prestarme sus cosas.

A mis amigas inolvidables de la carrera: Hania, Fernanda, Jessica, Tere y Mayerlin. Por hacer algunos viernes y tareas inolvidables.

A Vero, Vanessa Alonso y Valeria que a pesar de las diferencias se que puedo contar con ustedes.

Al Sr. Pepe, Lic Rosales y el equipo completo de la "Negrita", por darme la oportunidad de pertenecer a su empresa y desarrollarme en mi área como Química de alimentos

Rodrigo Jasso por demostrarme a que a pesar del tiempo y la distancia una amistad puede perdurar.

A la M.C. Carmen Labastida por darme su asesoramiento en el laboratorio y por apoyarme a concluir este proyecto.

A mis sinodales M.C. Elpidio García y Dr. José G. Aguilar por su correcciones que ayudaron a mejorar mi trabajo.

Y a todos aquellos que no menciono pero que saben que están en mi memoria.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme concluir este proyecto y todos los demás que lleguen en este largo camino de la vida.

A mis papas:

Por darme mis manos y brazos para aprender a vivir.

Por darme su ejemplo y su perseverancia de concluir las cosas que inicies.

Por ser las únicas personas que estarán caminando junto conmigo y que pase lo que pase siempre harán el esfuerzo más grande con tal de que siempre estemos unidos como familia.

A mi hermana Faby por ser mi mejor apoyo en estos 26 años y más, por escucharme, entenderme y ser simplemente mi amiga incondicional de toda la vida.

Gracias por todo lo que has dado y comprender mi carácter que a veces es muy cambiante.

A Miguel A. Ginori R. Por que no existen mil palabras ni obsequio más caro para agradecerte todo lo bueno que me has brindado en este tiempo. Gracias.

A mi mejor amiga Lety por acompañarme en todo este tiempo y demostrarme que la verdadera amistad existe. Y a Miguel Armando por ser la sal y la pimienta en nuestro trío.

Hay una cualidad que uno debe poseer para ganar, y es determinación de propósito, el conocimiento de lo que uno quiere y un deseo ardiente de lograrlo.

Napoleón Hill

RESUMEN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1 Cultivo y Producción en México	4
1.2 Problemas de Almacenamiento	5
1.3 Procesamiento de la Semilla	6
1.4 Endurecimiento de la Semilla	7
1.5 Estructura de la Semilla	8
1.6 Pared Celular	9
1.7 Pectina	10
1.7.1 Estructura de la Pectina	11
1.8 Enzimas que Modifican la Estructura de la Pectina	13
1.8.1 Pectinmetilesterasa	14
1.9 Cromatografía de Gases	14
2. HIPÓTESIS	17
3. OBJETIVOS	19

4	METODOLOGÍA	20
4.1	Material Biológico	21
4.2	Condiciones del Almacenamiento Inadecuado	21
4.3	Remojo de la Semilla	21
4.4	Obtención de los Cotiledones	21
4.5	Preparación del Extracto Enzimático	22
4.6	Actividad Enzimática	22
4.7	Inhibición de la Enzima Pectinmetilesterasa con SDS	23
4.8	Cuantificación de Proteína	23
4.9	Obtención de Sólidos Insolubles en Etanol	24
4.10	Extracción de Pectinas	24
4.11	Determinación de la composición química de la pectina.....	25
4.11.1	Hidrólisis de Pectina con Trifluoroacético (TFA)	25
4.11.2	Determinación de Acido Urónico	26
4.11.3	Determinación de Azúcares Neutros	26
4.12	Cuantificación de Metanol por Cromatografía de Gases	27

5. RESULTADOS	29
5.1 Selección del Método de Extracción de Pectina	30
5.2 Efecto del Almacenamiento Inadecuado en la Solubilidad y composición Química de la Pectina	31
5.3 Optimización de la Técnica para Cuantificar el Grado de Metilación de la Pectina	33
5.4 Grado de Metilación de las Pectinas Aisladas de Frijol Almacenado en Condiciones Adecuadas e Inadecuadas	37
5.5 Optimización del pH de Pectinmetilesterasa	38
5.6 Efecto del Almacenamiento Inadecuado sobre la actividad de Pectinmetilesterasa	39
6. DISCUSION	41
7. CONCLUSIONES	48
8. BIBLIOGRAFIA	50

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1.	Contenido de aminoácidos en maíz y frijol	5
Tabla 2.	T _{C50} para frijol Flor de Mayo almacenado bajo diferentes Condiciones	7
Tabla 3.	Efecto del pH en la composición de la pectina del frijol.....	31
Tabla 4.	Solubilidad en CDTA de la pectina de frijol almacenado en condiciones óptimas e inadecuadas	31
Tabla 5.	Efecto del almacenamiento en la composición química de la pectina de frijol	32
Tabla 6.	Composición química de la pectina hidrolizada con TFA	32
Tabla 7.	Condiciones cromatográficas utilizadas en la optimización de la separación y cuantificación de metanol	34
Tabla 8.	Determinación del tiempo de retención del metanol y reproducibilidad en un sistema de Cromatografía de Gases	36
Tabla 9.	Eficiencia de hidrólisis del enlace ester galacturónico-metanol.....	36

Tabla 10.	Grado de metilación de pectina de frijol almacenado en condiciones adecuadas e inadecuadas	37
Tabla 11.	Efecto de la inhibición de la actividad de pectinmetilesterasa en el grado de metoxilación de la pectina	38
Tabla 12.	Efecto del almacenamiento y remojo sobre la actividad de Pectinmetilesterasa	40

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1.	Anatomía del frijol	8
Figura 2.	Pared celular	9
Figura 3.	Estructura de la pectina	11
Figura 4.	Región lisa del homogalacturonano esterificado en metanol (C6) y ácido acético (C2 y C3)	12
Figura 5.	Diagrama de Cromatógrafo de Gases	15
Figura 6.	Diagrama de fibra para Cromatógrafo de Gases	28
Figura 7.	Cromatogramas de las diferentes columnas para optimizar la técnica de cuantificación de metanol	35
Figura 8.	Actividad de pectinmetilesterasa a diferentes pH's	39

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

RESUMEN

La semilla de frijol se produce anualmente por lo que requiere de largos periodos de almacenamiento y dada la carencia de infraestructura almacenamiento se realiza inadecuadamente a temperatura y humedad relativa altas ($>30^{\circ}\text{C}$ 75% HR). Dichas condiciones provocan que el tiempo de cocción de la semilla se incremente, respecto al que presenta la semilla almacenada en condiciones óptimas (4°C y en nuestro país, este 50% HR). A este fenómeno de pérdida de la calidad se le denomina endurecimiento.

Estudios anteriores (Blancas, 2001 y Méndez, 2003) demuestran que la magnitud del tiempo de cocción depende de las características moleculares de la pectina, por lo que el incremento del tiempo de cocción del frijol endurecido respecto al control podría deberse a que durante el almacenamiento inadecuado ($>30^{\circ}\text{C}$ y 75% HR) de la semilla, la pectina se modifique de tal manera que fuese más difícil de termosolubilizar. Una de las modificaciones que la pectina puede sufrir durante el almacenamiento inadecuado de la semilla, y que resultaría en una menor facilidad de termosolubilización, es la hidrólisis enzimática de los grupos metilo que se encuentran esterificados en el ácido urónico. Esta desmetilación resultaría en un aumento de la capacidad de la pectina para interaccionar con calcio formando las estructuras de caja huevo que disminuirían la termosolubilización de la pectina.

En este trabajo se analizó el grado de metilación de las pectinas extraídas de tres cultivares de frijol almacenado en condiciones adecuadas e inadecuadas así como la actividad de pectinmetilesterasa (PME), enzima que cataliza la desmetilación de la pectina. La pectina extraída de frijol almacenado en condiciones inadecuadas presentó un grado de metilación

ligeramente menor que la extraída de frijol almacenado en condiciones adecuadas. Mientras que la actividad de PME se incrementó en dos de los cultivares, Bayo Mecentral y Flor de Mayo, durante el almacenamiento inadecuado de la semilla. Estos resultados sugieren que al menos en estos cultivares durante el almacenamiento del frijol la pectina se desmetila por efecto de la PME y que esta pectina desmetilada es capaz de interaccionar fuertemente con calcio. Aparentemente, esta interacción evita la despolimerización de la misma.

ANTECEDENTES

1.1 Cultivo y producción en México

La semilla de frijol es de gran importancia en México, debido a que el frijol constituye un alimento básico en la dieta del mexicano. De la superficie total cultivable del país, el 30% se destina al cultivo del frijol.

Esta leguminosa se cultiva en climas tropicales, templados y fríos, en suelos neutros o ligeramente alcalinos y su adaptación varía entre los 50 hasta los 2300 metros sobre el nivel del mar. En la República Mexicana, existen múltiples variedades de frijol, las cuales se diferencian en cuanto a: características físicas, rendimiento por hectárea, resistencia a plagas y a enfermedades (Reyes-Moreno et 1993).

Esta semilla provee del 20 al 50% de la proteína total a las poblaciones de todos los niveles económicos. La proteína del frijol es rica en lisina, pero pobre en aminoácidos azufrados. Para tener una dieta adecuada en cuanto a los aminoácidos esenciales es necesario consumir una combinación con cereales como maíz, trigo, etc. En la tabla 1 se puede observar la diferencia de aminoácidos esenciales entre las dos semillas básicas de la dieta del pueblo mexicano, el maíz y el frijol.

Tabla 1. Contenido de aminoácidos esenciales en maíz y frijol.

AMINOÁCIDO	CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES EN MAÍZ Y FRIJOL	
	MAÍZ (mg de aminoácido/ gramo de Nitrógeno Total)	FRIJOL
Lisina	2.84	7.39
Isoleucina	4.43	5.43
Treonina	3.90	4.28
Valina	5.06	5.82
Leucina	12.84	8.43
Triptófano	0.62	0.93
Metionina	1.02	1.87
Fenilalanina	4.60	5.47
Cisteína	97.00	53.00

FAO Roma 1970

1.2 Problemas de almacenamiento

Debido a la falta de infraestructura en el manejo de la semilla durante el proceso post-cosecha, el frijol se almacena en condiciones inadecuadas provocando que la semilla pierda su calidad. Una de las manifestaciones de esta pérdida de calidad es el incremento en el tiempo de cocción que la semilla requiere para obtener la suavidad que el consumidor demanda. Esto incrementa el consumo de combustible y decrementa el valor nutrimental de la semilla.

Estas características de la semilla almacenada en condiciones inadecuadas hacen que el frijol endurecido no sea aceptado por los comerciantes ni por las amas de casa, teniendo que venderse en un 50% menor a su precio real

(www.infoagro.com/hortalizas/judia.htm).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.3 Procesamiento de la semilla

La cocción es probablemente el procedimiento más antiguo de preparación de frijoles para consumo humano, incluye el remojo del grano previo a un tiempo de ebullición determinado. Durante dicho proceso el frijol se suaviza, desarrolla un sabor y aroma agradables y pierde toxicidad, volviéndose digerible (Reyes 1993; Stanley y M.J. et 1986). En la primera fase (el remojo de la semilla a temperatura ambiente) los gránulos de almidón se hidratan y aumenta su volumen (Sefa-Dehed y Stanley 1979). Además la adhesión intercelular de la semilla disminuye a causa de hidratación de los polisacáridos de la pared celular (Kon 1967) lo que da como resultado la disminución en la dureza de la semilla. En la segunda fase (el tratamiento térmico que es necesario para la cocción), el calor aplicado induce en la semilla los cambios estructurales que conducen a su ablandamiento (García-Vela *et al*/1989) dichos cambios son: la gelatinización de los gránulos de almidón, que se realiza paulatinamente conforme se incrementa la temperatura hasta llegar al punto de ebullición; remoción parcial de los polifenoles y la **fractura y solubilización de la lamela media**, todo esto induce a la pérdida de rigidez y ablandamiento de la semilla.

En resumen, el proceso de cocción está relacionado a cambios en la microestructura de la semilla provocados inicialmente por la presencia de agua durante el periodo de remojo y, posteriormente por el efecto adicional del calor usado durante la etapa de cocción.

1.4 Endurecimiento de la semilla

El frijol al igual que otras semillas de leguminosas, presenta una tendencia natural a envejecer. Una de las manifestaciones del envejecimiento o deterioro es el incremento progresivo en la dureza del grano (**endurecimiento**) lo cual se hace evidente durante el proceso de cocción. La velocidad con que este deterioro se establece, depende tanto del tiempo del almacenamiento, como de la temperatura y humedad relativa de la atmósfera en que se encuentra almacenado. De tal forma que cuando el frijol se almacena en condiciones de alta humedad relativa y alta temperatura ($>30^{\circ}\text{C}$ y $>50\%$ HR) se deteriora o endurece muy rápidamente. Un frijol almacenado en condiciones inadecuadas es considerado endurecido cuando no logra su cocción o bien, el tiempo de ebullición que tarda en suavizarse es significativamente mayor comparado con el de un grano almacenado en condiciones adecuadas. En la tabla 2 se observa el efecto del almacenamiento y remojo en el (Tiempo de cocción medio) TC_{50} del cultivar Flor de mayo (Martínez 2003, Pacheco 2003). En ambas condiciones de almacenamiento, el remojo disminuyó de manera importante el TC_{50} , mientras que el almacenamiento inadecuado lo incrementó.

Tabla 2. TC_{50} para Flor de Mayo almacenado bajo diferentes condiciones.

TRATAMIENTO	TC_{50}	
	Sin remojo	Con remojo
50% HR/4°C	126 minutos	38 minutos
75% HR/30°C	>300 minutos	126 minutos

El endurecimiento de la semilla de frijol inducido por un almacenamiento inadecuado está acompañado de cambios tanto en su composición química como en su estructura (Keshun *et*

a/1995) especialmente en los componentes de la lamela media, estructura situada en la pared celular. Lo anterior sugiere que el aumento en el tiempo de cocción que presenta el frijol endurecido podría deberse a que durante el almacenamiento inadecuado de las semillas, la pectina polímero mayoritario de la lamela media, se modifica de tal forma que requiere de más tiempo de ebullición para solubilizarse.

15 Estructura de la semilla

El frijol es una vaina o legumbre colgante, recta o arqueada comprimida, que se abre en dos valvas, para dar lugar a las semillas que son de forma variable generalmente reuniforme mas o menos comprimidas y algunas veces redondeadas o esféricas. Según el color que presentan las semillas se distinguen numerosas variedades de frijol como amarillo, blanco, bayo, negro, etc (Graham 1997) . La semilla de frijol consta de las siguientes partes:

El embrión y la cubierta externa o testa. Ésta protege al eje embrionario (Figura 1).

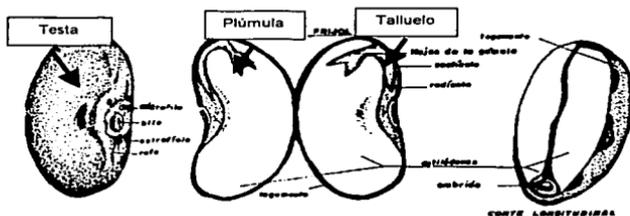


Figura 1. Anatomía del frijol

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Al retirar la testa de un frijol remojado lo que queda al descubierto es el embrión, el cual está formado por el hipocotilo o talluelo que tiene en un extremo la radícula y en el otro los cotiledones y la plúmula (Biladeris et 1981).

1.6 Pared celular

Esta microestructura determina en gran medida los atributos de calidad de frutas y vegetales, así como las características de procesamiento. La pared celular de las plantas es rígida y a través de ella se establece la interacción entre las diversas células por lo que el desarrollo y la morfogénesis de los organismos multicelulares están restringidos por las propiedades de las paredes celulares. Cada célula está asociada con sus células vecinas a través de una capa común limitante conocida como lamela media.

Desde el punto de vista químico las paredes celulares primarias (Figura 2) son normalmente suficientemente porosas para permitir el paso de agua y los solutos de peso molecular bajo del exterior de la célula hacia la membrana plasmática e interior celular. La pared celular consiste de microfibrillas celulósicas embebidas en una matriz de polisacáridos incluyendo hemicelulosas y pectina (Albersheim 1996).



Figura 2. Pared celular

1.7 Pectina

La pectina es una sustancia viscosa, coloidal, que se puede extraer de los tejidos vegetales por calentamiento y presión; su función es la de servir como cementante intercelular (Carpita et 1993, Doesburg 1965 y Jarvis 1988).

La capacidad de interacción de las sustancias pécticas depende principalmente de las regiones de ácido urónico, las cuales forman estructuras de caja de huevo con iones calcio.

Existen tres tipos de sustancias pecticas: El primero, polímero de alto peso molecular insoluble en agua, pero soluble en hexametáfosfato de sodio, los ácidos pectínicos o pectinas altamente metiladas solubles en agua y los ácidos pécticos o pectinas poco metiladas (pectatos) que pueden interactuar con iones y cuya solubilidad depende de la cantidad de cationes asociados con ellos (James 1999, Krall *et al*/1998 y Reginald 1988). De acuerdo a las características químicas las pectinas presentan diferentes propiedades de solubilidad y esta propiedad se explota para su extracción de la pared celular. Como disolventes se utilizan soluciones quelantes. Como quelantes se utilizan el ácido *trans*-1,2-diaminociclohexano N,N,N'-N' tetraacético (CDTA), etilendiaminotetracético (EDTA), y el Hexametáfosfato. También se pueden utilizar soluciones ligeramente alcalinas (Na_2CO_3). En el primero se solubilizan las pectinas altamente metiladas, en el segundo las pectinas de bajo metoxilo y que interactúan con cationes divalentes y en el tercero las pectinas de alto peso molecular (Stolle-S *et* 1999).

Una de las propiedades más notable de los compuestos pécticos es su capacidad para formar geles a bajas concentraciones, por lo cual son utilizadas comercialmente como agentes

gelificantes. Esa propiedad de las pectinas para formar geles depende de la longitud de las cadenas de ácido urónico y de su grado de metilación.

Las pectinas de alto metoxilo gelifican en presencia de agua y azúcar (65%) en un medio ácido ($\text{pH} = 2.9\text{-}3.2$). Los geles formados por este tipo de pectinas se caracterizan porque a altas temperaturas pueden ablandarse pero no se derriten.

Las pectinas de bajo metoxilo forman geles en presencia de calcio. Las propiedades de estos geles está determinado por la concentración de calcio, pH , fuerza iónica y temperatura a la que se induzca la gelificación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.7.1 Estructura de la pectina

El principal constituyente de la pectina es una cadena de ácido urónico unido con enlaces $\alpha(1-4)$, formando la cadena principal de los tres posibles dominios de la pectina: homogalacturonano, ramnogalacturonano I y ramnogalacturonano II (Fig. 3).

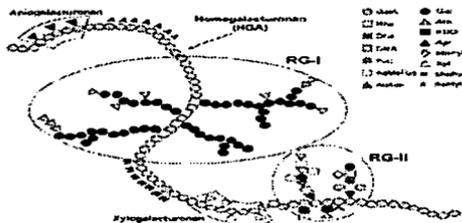


Figura 3. Estructura de la pectina.

Se cree que estos dominios se encuentran covalentemente unidos entre sí para formar la red pectínica (Albersheim *et al*/1996, O'Neill 1994 y Vennigerholz y Walles 1987).

El homogalacturonano es un homopolímero lineal del ácido urónico con uniones α (1-4). Este dominio es abundante y extenso en la pectina. Entre el 70 al 80% de residuos de ácido urónico se encuentran metilsterificados en el C6. Además, los monómeros de ácido urónico pueden esterificarse con ácido acético en los C2 y C3 (Figura 4). Los residuos del ácido urónico que no están metilados se asocian con calcio.

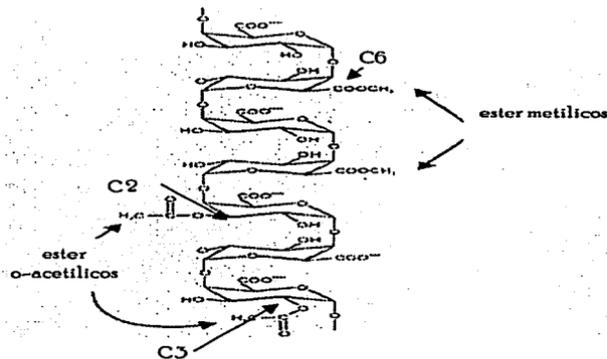


Figura 4 Región lisa del homogalacturonano esterificado en metanol (C6) y ácido acético (C2 y C3)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El ramnogalacturonano I es un polímero heterogéneo, formado por una cadena de dímeros de ramnosa y galacturónico unidos por enlaces glucosídicos. Este polímero presenta ramificaciones de azúcares neutros que se sustituyen en el C4.

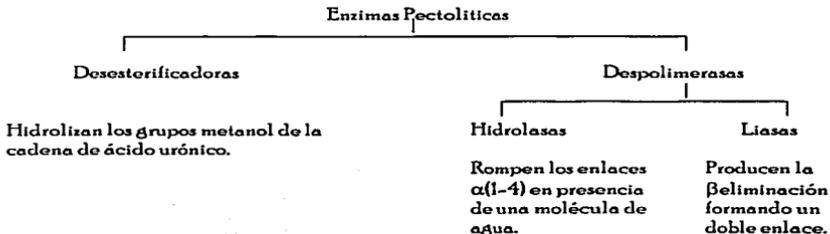
Debido a la naturaleza altamente ramificada del ramnogalacturonano, se le conoce como la región melenuda de la pectina, en contraste a los dominios del y sus cadenas laterales contienen once homogalacturonano que se conocen como la región lisa. El ramnogalacturonano II no se relaciona estructuralmente con el ramnogalacturonano I, este es un dominio ramificado de la pectina que tiene en su espina dorsal homogalacturonano diversos azúcares

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.8 Enzimas que modifican la estructura de la pectina

Las enzimas pectolíticas rompen y debilitan la pectina de la pared celular reduciendo la viscosidad e incrementando la solubilidad de éstas.

Las enzimas pectolíticas son usualmente clasificadas en 2 grandes grupos (Kertesz 1951 y Kinsella 1991):



1.8.1 Pectinmetilesterasa (PME)

Pectinmetilesterasa es sintetizada por plantas particularmente en vegetales y cítricos, hongos y bacterias. Solamente algunas levaduras han reportado su producción, está no es sintetizada por los animales. El metanol es el producto mayoritario de la acción de PME. La especificidad de la enzima es con los grupos metilester.

Se ha visto que la actividad de pectinmetilesterasa esta presente antes de cualquier actividad de poligalacturonasa, la actividad de estas enzimas es sinérgica (Ketsa *et* 1999)

1.9 Cromatografía de Gases

La cromatografía de gases es un método físico de separación basado en la distribución de la muestra entre dos fases. Una fase es el lecho estacionario de extensa superficie empacada en una columna. En esta fase se adsorbe la mezcla a separar. La otra fase consiste en un gas o líquido que esta sobre la fase estacionaria denominándose fase móvil.

En la cromatografía de gases, la fase móvil se denomina gas portador, ya que es un gas inerte cuya finalidad es transportar las moléculas de la muestra a través de la columna.

En cromatografía de gases, la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna de cromatografía. La elusión se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte, y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna (Douglas 1999).

La cromatografía es un método sensible para determinar compuestos volátiles como el metanol que se produce en la desmetilación de la pectina (R.F. Mcfeeters 1984).

La figura 5 representa el esquema de un sistema tipo para cromatografía de gases. Las partes básicas son: 1) cilindro del gas portador 2) control de caudal de gas 3) entrada de la muestra 4) columna 5) detector y 6) registro de gráfico.

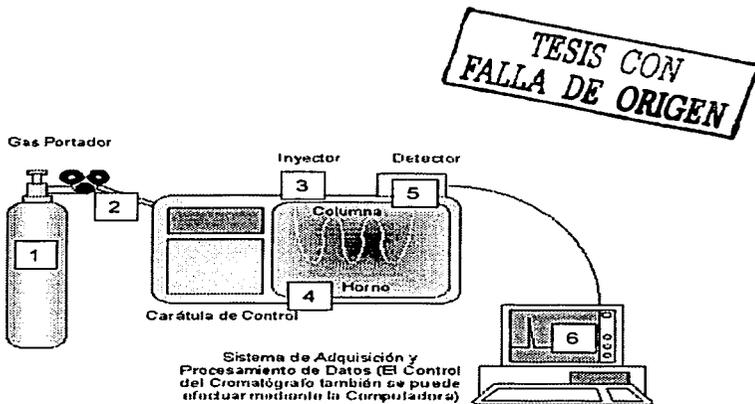


Figura 5. Diagrama de cromatógrafo de gases.

HIPOTESIS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Si durante el almacenamiento inadecuado de la semilla de frijol la enzima pectinmetilesterasa modifica a la pectina, el efecto de su acción se detectará como una disminución del grado de metilación de éste polímero.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la contribución de la enzima pectinmetilesterasa en la pérdida de calidad culinaria del frijol cuando se almacena en diferentes condiciones.

OBJETIVOS PARTICULARES

Para probar la hipótesis anterior, se realizaron los siguientes sub-objetivos:

- Optimizar la metodología.
- Determinar el efecto del almacenamiento inadecuado de la semilla en la solubilidad y composición química de la pectina.
- Cuantificar el grado de metilación de las pectinas aisladas de frijol almacenado en condiciones adecuadas e inadecuadas.
- Cuantificar la actividad de pectinmetilesterasa en frijol almacenado en condiciones adecuadas e inadecuadas.

METODOLOGIA

4.1 Material biológico

Se utilizaron tres cultivares de *Phaseolus vulgaris*: Flor de Mayo (FM) cosecha 1999, Bayo Mecentral (BM) cosecha 1996 y 2626 cosecha 1996. Las semillas de estos cultivares se mantuvieron almacenados en frascos herméticamente cerrados con una muñeca de sílica gel para evitar la humedad a una temperatura constante de 4°C.

4.2 Condiciones del almacenamiento inadecuado de la semilla

En una cámara con 18 subdivisiones en forma de rejilla, con capacidad para 25 frijoles cada una, se colocaron semillas de cada uno de los tres cultivares. Las cámaras de deterioro se almacenaron durante tres meses en una incubadora a una temperatura constante de 30°C y una humedad relativa de 75% (almacenamiento inadecuado). Esta última se logró con la ayuda de una solución saturada de NaCl (Keshun *et al* 1992 y Varriano-Marstonet *et al* 1981).

4.3 Remojo de la semilla

En un matraz Erlenmeyer llenado a la mitad de su capacidad con agua destilada se le añadió 25 frijoles. El matraz se colocó en una incubadora por 18 horas a 30°C. Después del tiempo transcurrido se decantó el agua, deséchándose. El frijol remojado se utilizó para las pruebas de determinación enzimática y aislamiento de pectinas.

4.4 Obtención de los cotiledones

Con la ayuda de una navaja se partió la semilla seca en forma longitudinal extrayéndose el eje embrionario y quitándose la testa, que es el tejido que cubre a la semilla exteriormente.

Los cotiledones se guardaron en frascos herméticos a 4°C hasta el momento de su análisis. En el caso de los frijoles remojados después de decantar el agua del remojo, se retiró la testa de la semilla y el eje embrionario. Los cotiledones obtenidos de semillas remojadas se utilizaron de inmediato.

4.5 Preparación del extracto enzimático.

Para la semilla almacenada en condiciones adecuadas e inadecuadas se peso 1 g de cotiledón descascarado y se colocó en un mortero. Se añadió nitrógeno líquido para congelar el y evitar la desnaturalización de la enzima. Con la ayuda del pistilo la semilla se homogenizó hasta obtener una harina fina. La harina se transfirió a un matraz y se le agregaron 10 ml de una solución de NaCl al 8.8% e inhibidores de proteasas: 10 µl de PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro) 100µl de leupeptina y 10µl de aprotinina a una concentración de 10 mM cada una. Se dejó agitando 24 horas a 4°C. Se centrifugó a 50,000 rpm / 10 min. / 4°C en una ultracentrífuga Beckman TLX con un rotor SI 50T. El sobrenadante obtenido se utilizó como fuente de la enzima, el paquete se desechó. Para los cultivares remojados almacenados en condiciones adecuadas e inadecuadas, se utilizaron 10 cotiledones de semilla de frijol (Ann 1986).

4.6 Actividad enzimática.

La actividad de la PME fue determinada usando un ensayo continuo espectrofotométrico con azul de bromotimol que es un indicador de pH (Monique 1996). La mezcla de reacción

contenía Pectina cítrica al 0.5%, 0.01% de azul de bromotímol, a un pH de 7.5. La mezcla de reacción se inició añadiendo 200 µl del extracto, la reacción se siguió por la disminución en la absorbancia a 615 nm. Los ensayos espectrofotométricos se realizaron a 25°C en un UV-Visible SHIMADZU.

La actividad de la PME se expresó como nmol ácido úrico / minuto / mg de proteína. El equipo se calibró con agua (Fabienne 2001).

4.7 Inhibición de la enzima pectinmetilesterasa con SDS.

Se agregaron 5 g de sólidos insolubles en 50ml etanol del frijol control Flor de Mayo almacenado en condiciones adecuadas. Se prepararon 20 ml de una solución de SDS al 0.1% agregándose 5 ml a la harina dejándose agitar 1 hora para después centrifugar a 50000 rpm durante 15 minutos en una ultracentrífuga Beckman TLX con un rotor SI 50T repitiéndose esta operación por triplicado enjuagándose la pastilla por duplicado con agua destilada para después extraer la pectina con CDTA pH 6.5.

4.8 Cuantificación de proteína.

La proteína se cuantificó por el método colorimétrico de Lowry (Lowry et al 1951).

Se preparó una solución A de Na_2CO_3 2%, NaOH 0.4%, tartrato de potasio 0.165% y SDS 1%.

Solución B de sulfato de cobre al 4%.

Folin 1:1 con agua destilada.

La solución C fue una mezcla de A+B (100:1)

En tubos de ensayo limpios se añadió 1 ml de la solución C, 350 µl de agua y 1.5 µl de extracto de cotiledón, se mezcló, y se dejó reposar 10 minutos. Luego se agregaron 100 µl de Folin, la mezcla se agitó y se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente. Las lecturas se realizaron espectrofotométricamente a 660 nm. El blanco utilizado fue elaborado de la misma manera, pero en ausencia del extracto enzimático.

4.9 Obtención de sólidos insolubles en etanol.

Se pesaron 5 g de harina de frijol, a la cual se le agregó 100 ml de etanol al 80%. Se centrifugó la mezcla a 3000 rpm en una centrifuga media Sorvall Super T21 con un rotor SL-50T. Se decantó y la pastilla obtenida se colocó en un desecador durante 2 días hasta peso constante.

4.10 Extracción de pectinas.

A la harina de cotiledón de frijol (5 g) se le agregaron 50 ml de una mezcla de buffer 50mM de acetato de sodio con 50 mM de CDTA a pH 6.5. La suspensión se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Después del tiempo transcurrido, la mezcla se centrifugó 5 minutos a 10000 rpm a 4°C. El sobrenadante se separó y el paquete se resuspendió en 50 ml de agua destilada volviendo a centrifugar. Se juntaron los sobrenadantes y se desechó la pastilla.

Diálisis

Se utilizaron tubos de diálisis de 500 Daltons, de 10 cm de longitud. Previo a su utilización se sumergieron en un vaso de precipitado con agua destilada para que se hidrataran y facilitara el despegarlos. Los tubos de diálisis conteniendo el extracto enzimático, se colocaron en un vaso de precipitado con 4 litros de agua destilada conteniendo 0.02% de mertiolate. La diálisis se realizó a una temperatura de 4°C, cambiándose el agua cada 2 horas. Se consideró el fin de la diálisis cuando el agua de diálisis presentó la misma conductividad eléctrica que el agua bidestilada.

Liofilización

En los vasos especiales para liofilizar se vació el líquido contenido en los tubos de la diálisis y se congeló con nitrógeno líquido, después se conectó el vaso al aparato de liofilización, se liofilizó hasta sequedad. Se siguió la misma metodología para los cultivos almacenados en condiciones adecuadas e inadecuadas.

4.11 Determinación de la Composición Química

4.11.1 Hidrólisis de pectina con ácido trifluoroacético (TFA).

Se pesaron 5 mg de pectina extraída de los cultivos almacenados con CDTA pH 6.5 en los viales de fondo cóncavo se agregó 850 µl de agua destilada y 150 µl de TFA se dejó esta mezcla en una estufa a 110°C durante 4 horas. Cuantificándose los ácidos urónicos y azúcares neutros por el método colorimétrico.

4.112 Determinación de Ácido Úrónico.

El ácido úrico se cuantificó por un método colorimétrico por la formación de un complejo que se lee a 520 nm (Blumenkrantz y Asboe-Hansen 1973).

Se preparó una solución de tetraborato de sodio 0.0125 M en H_2SO_4 concentrado.

Se utilizaron alícuotas de 500 μ l de extracto tanto para frijol seco, remojado, y almacenado en condiciones adecuadas e inadecuadas. En tubos de ensayo limpios se añadió la muestra, 2.4ml de tetraborato y 100 μ l de agua desionizada. Se hirvieron los tubos durante 5 minutos para después enfriarse en agua de hielo durante 1 minuto añadiéndose a las muestras 40 μ l de o-hidroxidifenil (DFF) al 0.15% (p/v). Se dejaron reposando 30 minutos y posteriormente se leyó en el espectrofotómetro.

Se realizó una curva patrón a partir de una solución de ácido úrico a una concentración de 5 mg / ml utilizando alícuotas de 10, 20, 50, 100 y 200 μ l llevando a un volumen final de 400 μ l con agua desionizada.

El blanco utilizado fue elaborado de la misma manera sin la presencia de muestra agregándose 40 μ l de NaOH al 5% (p/v).

4.113 Determinación de azúcares neutros.

Los azúcares neutros se cuantificaron por un método colorimétrico por la formación de un complejo que se lee a 485 nm (Dubois *et al* 1956).

Se utilizaron alícuotas de 100 μ l de extracto tanto para frijol seco, remojado, y almacenado en condiciones adecuadas e inadecuadas. En tubos de ensayo limpios se añadió 100 μ l de

muestra con 1.8 ml de ácido sulfúrico concentrado y 300 μ l de fenol acuoso al 5% (p/v) y 900 μ l de agua desionizada. Se dejaron reposando 10 minutos y posteriormente se leyó en el espectrofotómetro.

El blanco utilizado fue elaborado de la misma manera sin la presencia de muestra.

Se realizó una curva patrón a partir de una solución de glucosa a una concentración de 200 μ g / ml utilizando alícuotas de 50, 75, 100, 125 y 150 μ l llevando a un volumen final de 1 ml con agua desionizada.

4.12 Cuantificación de metanol por cromatografía de gases.

La pectina extraída de los cotiledones (50 mg / 3.5 ml) se le adicionó 200 μ l de KOH al 50% y se incubó por 1 hora / 80°C. Posteriormente se ajustó el pH a 5.0 con HCl al 10% y se adicionó finalmente NaCl sólido para que la concentración final fuera del 10%. Esto último aumentó la fuerza iónica y facilitó la liberación del metanol de las cadenas de homogalacturonano. Como estándar interno, se utilizó propanol al 5%.

Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard con una columna SP™ 1000 30 mts, 0.32 mm, 0.25 μ m. La columna fue operada a una temperatura máxima de 220°C con helio como gas acarreador a 20°C / min. El detector y el inyector se utilizaron a 220°C.

Se utilizó una fibra de polidimetilsiloxano / divinilbenceno (Figura 6) para absorber el compuesto volátil y se inyectó en el cromatógrafo de gases.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

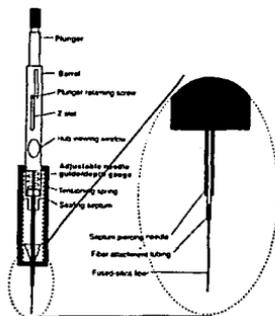


Figura 6. Diagrama de Fibra para cromatógrafo de gases

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

35.1 Selección del método de extracción de pectina

Dos de los dímeros distinguibles en la pectina lo constituye el homogalacturonano y el ramnogalacturonano el primero está formado principalmente por residuos de ácido urónico parcialmente metilados y el segundo altamente ramificado formado por dímeros de ramosil-galacturonil; donde las ramificaciones formadas de azúcares neutros se unen a la posición cuatro del residuo de ramosa (Bonnie 2002). La interacción intermolecular formada por estos dos dominios también es diferente. En el dominio lineal la interacción intermolecular se establece con iones calcio, mientras que en el segundo las interacciones son principalmente de puentes de hidrógeno. Para lograr el objetivo planteado en este trabajo se requiere de estudiar el efecto del almacenamiento inadecuado en el dominio lineal de la estructura de la pectina y por lo tanto se debe emplear un método que solubilice principalmente este dominio.

Con esta finalidad se compararon dos métodos para extraer las pectinas del frijol. La diferencia entre ellos fue el pH del solvente de extracción que en este caso fue CDTA.

La cantidad de azúcares neutros fue tres veces mayor en pectinas aisladas a pH 8.0 que en pectinas aisladas a pH 6.5 (Tabla 3). Por lo que la abundancia de ácido urónico fue mayor en pectina aislada a pH 6.5 que a pH 8.0. Lo anterior sugiere que a pH 6.5 se aísla una mayor proporción de la región de homogalacturonanos de la pectina. Por lo que 6.5 fue el pH del CDTA que se utilizó como solvente para aislar las pectinas en los experimentos subsecuentes.

Tabla 3. Efecto del pH en la composición de la pectina del cotiledón del frijol.

pH	Composición Química (p/p)	
	Azúcares Neutros (%)	Ácido Uónico (%)
6.5	4.40	90.4
8.0	13.2	84.0

5.2 Efecto del almacenamiento inadecuado en la solubilidad y composición química de la pectina

Con la finalidad de detectar si el almacenamiento inadecuado de la semilla inducía cambios en la solubilidad y composición química de las pectinas lo que se hizo fue comparar la cantidad de pectina soluble en CDTA, presente en frijoles almacenados en ambas condiciones (Tabla 4). Se observó que con excepción de Flor de Mayo, en los otros cultivares, el almacenamiento inadecuado aumentó de manera importante la cantidad de pectina extraída con CDTA.

Tabla 4. Solubilidad en CDTA de la pectina de frijol almacenado en condiciones adecuadas e inadecuadas.

ALMACENAMIENTO CULTIVAR	ADECUADO	INADECUADO
	Pectina (%) p/p	
Flor de Mayo	11	12
Bayo Mecentral	7	19
2626	10	17

El efecto del almacenamiento inadecuado en la composición química de la pectina se determinó cuantificando la abundancia de azúcares y ácido urónico en la fracción de pectinas aisladas. En la tabla 5 se muestra el resultado de estos experimentos. En frijoles

almacenados adecuadamente, la concordancia entre la cuantificación química y la gravimétrica fue de entre 86 a 95%, mientras que en frijol almacenado inadecuadamente solo fue de entre 52 y el 68%.

Tabla 5. Efecto del almacenamiento en la composición química de la pectina de frijol.

TRATAMIENTO CULTIVAR	ADECUADO $\mu\text{g}/\text{mg}$ pectina			INADECUADO $\mu\text{g}/\text{mg}$ pectina		
	AN	AU	AU/AN*	AN	AU	AU/AN*
Flor de Mayo	44	904	20	96	597	6
Bayo Mecentral	162	806	5	185	343	2
2626	46	817	18	182	337	2

AN = Azúcares neutros, AU = Acido urónico

* Cantidad relativa de ácido urónico en la fracción de pectina.

Estos resultados podrían deberse a que la fracción de pectinas aisladas de frijol almacenado inadecuadamente estuviera contaminada con otros componentes o a que las condiciones de hidrólisis de esta fracción no fueron adecuadas. Para distinguir entre estas posibilidades lo que se hizo fue hidrolizar la pectina aislada de frijol almacenado inadecuadamente, previo a su determinación química (Tabla 6).

Tabla 6. Composición química de pectina hidrolizada con ácido trifluoroacético

CULTIVAR	ALMACENADO INADECUADAMENTE $\mu\text{g}/\text{mg}$ pectina		
	AN	AU	AU/AN*
Flor de Mayo	254	837	3.3
Bayo Mecentral	236	777	3.3
2626	318	860	2.7

AN = Azúcares neutros, AU = Acido urónico

* Cantidad relativa de ácido urónico en la fracción de pectina.

En estas condiciones se observó que la cantidad de pectina cuantificada químicamente fue similar a la cuantificada gravimétricamente. Se observó que en los cultivares 2626 y Flor de Mayo la abundancia de ácido urónico (Tabla 5) en la pectina del frijol almacenado en condiciones óptimas fue de 4 a 5 veces mayor que la abundancia de este compuesto en pectina aislada de frijol almacenado en condiciones inadecuadas (Tabla 6). Sorprendentemente en el cultivar Bayo Mecentral el almacenamiento inadecuado no modificó de manera importante esta relación la cual en frijol almacenado en condiciones óptimas fue mucho menor que para los otros cultivares.

5.3 Optimización de la técnica para cuantificar el grado de metilación de la pectina

El metanol de las pectinas se encuentra formado un enlace éster en los residuos de galacturonil. Para determinar su abundancia, el metanol se debe liberar de este enlace covalente, separar, identificar y finalmente cuantificar. En la hidrólisis del enlace éster se pueden utilizar, la enzima pectinmetilesterasa o la hidrólisis química con NaOH o KOH.

La técnica utilizada para separar, identificar y cuantificar al metanol fue la cromatografía de gases. Con la finalidad de obtener la mejor separación del metanol y los otros posibles componentes volátiles que pueden estar presentes en la pectina se utilizaron tres tipos de columnas. Las condiciones de operación para cada una de ellas fueron las recomendadas por el fabricante (Tabla 7).

La composición química de la columna SE-54 30 (no polar) fue una base Poli(5% difenil / 94% dimetil / 1% vinilsiloxano) obteniendo tiempos de retención muy extensos (Figura 7

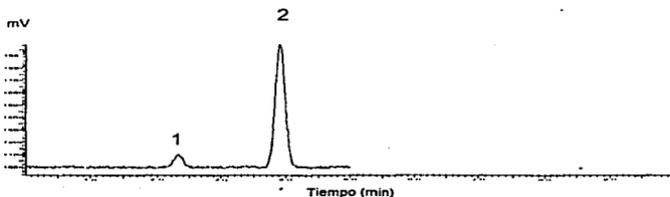
A). La columna carbowax, es utilizada para analizar la pureza de los compuestos polares siendo su fase polietilenglicol, no alcanzándose una buena elusión del compuesto a separar (Figura 7B).

La columna en la cual se obtuvo la mejor separación fue en SPTM 1000 que es de carácter polar para ácidos siendo su fase polietilenglicol modificado con ácido nitroterefalico con lo cual se tuvo una separación adecuada del metanol Figura 7C).

Como estándar interno se utilizó propanol. En la Figura 7 se muestran los cromatogramas obtenidos con mezclas de metanol y propanol. Se puede observar que la columna SPTM1000 operada a 220°C en el quemador y 220°C en el detector proporciona la mayor separación del metanol. Siendo estas las condiciones para continuar el proyecto.

Tabla 7. Condiciones utilizadas para la optimización de la separación y cuantificación de metanol.

COLUMNA	LONGITUD/ DIAMETRO	TEMPERATURA INYECTOR	TEMPERATURA DETECTOR	VELOCIDAD DE GAS
SE-54 30	30 mts/0.32 mm	200°C	200°C	ND
CARBOWAX 20M	30 mts/0.32mm	220°C	220°C	ND
SP TM 1000	30 mts/0.32 mm	220°C	220°C	35.5 ml/min



A) Columna SE-54 30 metros, 0.32 mm, 0.25 μ m

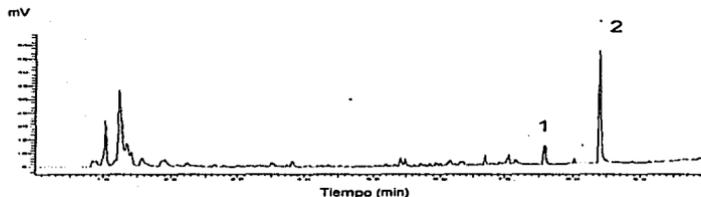
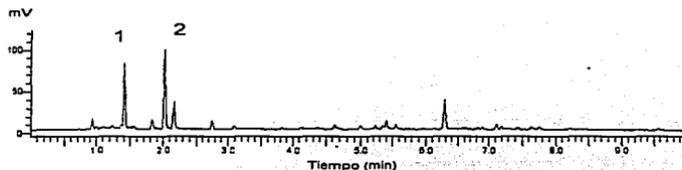
B) Columna Carbowax 20M 30 metros, 0,32 mm, 0,25 μ mC) SPTM1000 30 metros, 0,32 mm, 0,25 μ m

Figura 7 Cromatogramas de las diferentes columnas para optimizar la técnica de cuantificación de metanol (1 metanol, 2 Propanol).

También se evaluó la reproducibilidad de la determinación en cuanto a tiempo de retención y cuantificación. Con esta finalidad se inyectaron 5 veces el mismo volumen de una mezcla de metanol y propanol y se calculó el coeficiente de variación para cada parámetro. El coeficiente de variación para cada caso fue menos del 12% (Tabla 8). Una vez estandarizado el método de separación, identificación y cuantificación se utilizó para determinar la

eficiencia de los métodos de hidrólisis del enlace por el cual el metanol se encuentra esterificado al residuo de urónico. Se utilizó pectina comercial grado de metilación del 10%, la eficiencia de los métodos se cuantificó como porcentaje de recuperación (Tabla 9). Se observó que la eficiencia de la hidrólisis enzimática fue menor que la obtenida con los métodos químicos. Entre estos, la recuperación con potasa fue mejor que con sosa.

Tabla 8. Determinación del tiempo de retención del metanol en un sistema de Cromatografía de Gases.

INYECCION	VOLUMEN	TIEMPO DE RETENCION DEL METANOL	AREA
A	75 μ l	1.45	11281.00
B	75 μ l	1.45	14485.24
C	75 μ l	1.45	12361.00
D	75 μ l	1.45	11283.08
E	75 μ l	1.45	15263.00
			CV 12%

Tabla 9. Eficiencia de hidrólisis del enlace ester Galacturónico-Metanol.

MÉTODO DE HIDROLISIS	GM
Enzimático	6
NaOH	17
KOH	22

GM Grado de metoxilación

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.4 Grado de metilación de las pectinas aisladas de frijol almacenado en condiciones adecuadas e inadecuadas.

Una de las formas en que la pectina podría disminuir su solubilidad es la de incrementar su interacción molecular con iones calcio. Esto podría ser consecuencia de que el almacenamiento inadecuado de la semilla modificara el índice de metilación de la pectina. Para explorar esta posibilidad lo que se hizo fue determinar el índice de metilación de las pectinas aisladas de semillas almacenadas en condiciones óptimas e inadecuadas (Tabla 10). En general el índice de metilación de las pectinas de cualquiera de los cultivares fue del orden del 5% y el almacenamiento inadecuado disminuyó ligeramente este índice de metilación.

Tabla 10. Grado de metilación de pectina de frijol almacenado en condiciones adecuadas e inadecuadas.

CULTIVAR	FRIJOL ALMACENADO ADECUADAMENTE			FRIJOL ALMACENADO INADECUADAMENTE		
	AU	%METANOL	GM	AU	%METANOL	GM
Flor de Mayo	903.90	0.686	5.2	836.50	0.540	3.9
Bayo Mecentral	806.00	0.684	5.2	774.44	0.500	3.8
2626	817.40	0.650	4.7	859.77	0.515	3.5

AU = Acido urónico

GM = Grado de metoxilación

Dado que la enzima pectinmetilesterasa estaba activa en la semilla fresca, se exploró la posibilidad de que el grado de metoxilación (GM) de la pectina estuviese subestimada debido a que la enzima estuviera actuando durante el proceso de aislamiento de la pectina. Para inhibir la actividad de la enzima se utilizó un detergente, como el SDS. Cuando la actividad de la enzima se extrajo de residuos celulares lavados previamente con SDS, se

encontró que la actividad de la enzima disminuyó tres veces respecto a la determinada en extractos de residuos celulares que solo fueron lavados con agua. El grado de metoxilación de la pectina aislada de tejido con baja actividad de pectinmetilesterasa fue mayor al obtenido con alta actividad de la enzima (Tabla II).

Tabla II. Efecto de la inhibición de la actividad de pectinmetilesterasa en el grado de metoxilación de la pectina.

TRATAMIENTO DELOR RESIDUOS CELULARES	ACTIVIDAD nmol AG/min*mg proteína	%Metanol	GM
SDS 0.1%	2.32	1.80	14
H ₂ O	7.98	0.686	5

5.5 Optimización del pH de pectinmetilesterasa.

Para que durante el almacenamiento inadecuado la pectina modifique su grado de metoxilación se requiere la presencia de la enzima pectinmetilesterasa y estar activa o ser activada por efecto del almacenamiento inadecuado. Para evaluar si algo similar sucedía en el sistema aquí estudiado se determinó la actividad de pectinmetilesterasa en frijol almacenado en ambas condiciones, determinando previamente el pH óptimo para cuantificar dicha actividad.

Con el propósito de definir el pH óptimo de la actividad de la enzima pectinmetilesterasa de frijol, la actividad de la enzima se determinó a pH's. La enzima se extrajo del cotiledón del frijol con agua y el ensayo de la actividad se realizó en agua ajustada a diferentes pH's. Los resultados se muestran en la (Figura 8).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

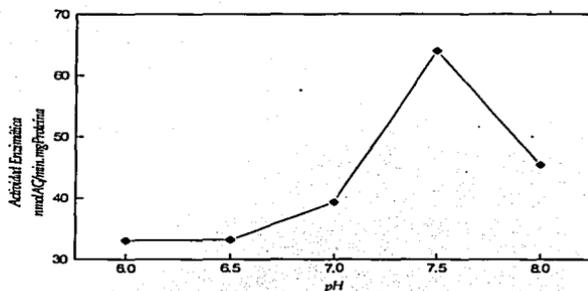


Figura 8. Actividad de Pectinmetilesterasa a diferentes pH's.

La actividad de la enzima fue constante en el rango de pH 6.0 a 6.5. La actividad de la enzima que se detectó en este rango de pH fue de solo el 50% de su actividad máxima detectada. El pH óptimo para esta enzima fue de 7.5 donde alcanzó la mayor actividad. A pH's más alcalinos disminuyó la actividad de la enzima.

5.6 Efecto del almacenamiento inadecuado sobre la actividad de pectinmetilesterasa.

El remojo de la semilla produjo efectos diferentes en la actividad de pectinmetilesterasa dependiendo de si la semilla fue almacenada en condiciones adecuadas o inadecuadas (Tabla 12).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el caso de los cultivares Flor de Mayo y Bayo mecentral, el remojo no modificó la actividad de pectinmetilesterasa en semillas almacenadas en condiciones adecuadas. Sin embargo en semillas almacenadas en condiciones inadecuadas, el remojo disminuyó la actividad de pectinmetilesterasa respecto a la semilla almacenada en estas mismas condiciones pero sin remojar. En el caso del cultivar 2626 el remojo de la semilla almacenada en condiciones adecuadas o inadecuadas incrementó la actividad de la pectinmetilesterasa respecto a su contraparte seca (Tabla 12).

Tabla 12. Efecto del almacenamiento y remojo sobre la actividad de pectinmetilesterasa

ALMACENAMIENTO	ACTIVIDAD DE PME			
	umol AG min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína			
	ADECUADO		INADECUADO	
CULTIVAR	SECO	REMOJADO	SECO	REMOJADO
Flor de mayo	8 ± 1.31	8 ± 2.69	12 ± 0.61	4 ± 0.74
Bayo mecentral	2 ± 0.41	2 ± 0.4	10 ± 1.06	7 ± 1.5
2626	17 ± 0.40	27 ± 3.12	1 ± 0.22	2 ± 0.17

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

La determinación del grado de metoxilación de la pectina requiere de una técnica que permita aislar principalmente la región de homogalacturonano, así como de una buena técnica de separación y detección de metanol. Ambos cometidos son difíciles de alcanzar porque la mayoría de los protocolos para aislar la pectina extraen una mezcla heterogénea de ambos dominios de la pectina. Además, el metanol es un alcohol de bajo peso molecular y por tanto volátil. Es por esto que este trabajo requirió de la optimización de la metodología para extraer homogalacturonano y la hidrólisis y cuantificación del metanol presente como éster metílico en los residuos de ácido urónico de la pectina.

En el dominio de homogalacturonano se distinguen dos regiones: La iónica y la metilada. En la primera, el grupo carboxilo del residuo de urónico interacciona con calcio, para formar las estructuras llamadas cajas de huevo (Johansson et al 2002) y en la segunda el grupo carboxilo se encuentra esterificado a un metanol. Es por esto que la interacción intramolecular del homogalacturonano en la lamela media se establece a través de enlaces iónicos y enlaces hidrofóbicos. Por lo que su solubilización requiere de un quelante de calcio como CDTA. Por otro lado la estabilidad del homogalacturonano es menor a un pH alcalino que a un pH ácido (Albersheim *et al*, 1996, O'Neill *et al*, 1994). La mayor eficiencia del CDTA a pH 6.0, respecto a la extracción con el mismo solvente pero a pH 8.0, en la extracción del homogalacturonano (Tabla 4) podría deberse a que en el primer caso la región del homogalacturonano fue más estable. Otra explicación podría ser que el pH ligeramente ácido facilita la escisión de la molécula de pectina justo en el umbral donde la

región de homogalacturonano y el ramnogalacturonano se unen y el pH 8.0 hidroliza en la región del ramnogalacturonano, ya que en primer caso la abundancia de azúcares neutros fue menor que en el segundo caso.

La otra metodología que se optimizó fue la hidrólisis de los grupos ésteres de la región metilada del homogalacturonano. De los métodos utilizados, la hidrólisis química fue mejor que la enzimática (Tabla 9). Esto puede deberse a que la estructura de la pectina a la concentración utilizada dificultó la accesibilidad de los grupos éster a la acción de la enzima o a que la enzima utilizada no fue efectiva en esta pectina. Se ha demostrado que la pectinmetilesterasa de cítricos, enzima utilizada en este caso, no es efectiva en pectina extraída de hongos (Rabel *et al*, 2003). La eficiencia de hidrólisis con las dos bases utilizadas en el tratamiento químico fue similar aunque la recuperación con KOH fue de 33% mayor que con NaOH (Tabla 9). No tenemos explicación para este resultado. En cuanto a las condiciones de separación, cuantificación y recuperación de metanol, el mejor adsorbente fue polietilenglicol para compuestos ácidos. En sistemas de elongación como coleoptilo de maíz (Howard 1999) o epicotilo de chicharo (Stepheson *et al* 1994), se ha reportado que el pH óptimo para la actividad de pectinmetilesterasa es entre 7.0 y 8.0. Sin embargo, en este trabajo se determinó el pH óptimo de la pectinmetilesterasa de frijol debido a que la enzima determinada en este trabajo debe haberse sintetizado y depositado en la pared celular durante la formación de la semilla (Stolle-Smits *et al* 1999) y se ha demostrado que en diferentes etapas del desarrollo se expresan diferentes isoenzimas (Caffe *et al* 1997) y el pH

óptimo de las isoenzimas no siempre coincide (Bordenave 1996). Encontramos que el pH óptimo de la PME del frijol fue de 7.5 (Figura 8) coincidiendo con lo reportado.

El principal objetivo de este trabajo fue demostrar la posible participación de la enzima pectinmetilesterasa en la disminución de la velocidad de termosolubilización de la pectina aislada de semilla de frijol almacenado en condiciones inadecuadas. La acción de esta enzima se detectaría como una disminución en el índice de metilación de las pectinas aisladas de frijol almacenado inadecuadamente respecto de las aisladas de semillas almacenadas en condiciones óptimas. La disminución en el índice de metilación incrementaría la posibilidad de formar estructuras de caja de huevo y disminuiría la β -despolimerización de la pectina, que se realiza espontáneamente cuando la pectina metilada se hidrata (Kon 1968). En ambos casos, la disminución del índice de metilación de la pectina se reflejaría en una disminución de la velocidad de termosolubilización de la pectina y por tanto en un aumento en el tiempo de cocción del frijol almacenado inadecuadamente respecto al del frijol almacenado en condiciones óptimas.

El grado de metilación de la pectina de frijol no pudo ser establecido con precisión ya que en las condiciones en que el polímero se aisló, la pectinmetilesterasa se encontraba activa. Incluso el tratamiento de la harina con SDS, un detergente que inactiva enzimas, solo inactivó el 70% de la actividad enzimática (Tabla 11). En cualquiera de estas condiciones la pectina de frijol fue de bajo grado de metilación y el almacenamiento inadecuado de la semilla lo disminuyó ligeramente, casi un 30% (Tabla 10 y 11). Esta disminución del grado de metilación podría deberse a la acción in situ de la pectinmetilesterasa presente en la

pared celular (Tabla 10). Se ha demostrado que la actividad de agua en que se almacenaron los frijoles ($A_w = 0.75$) es suficiente para que las hidrolasas se activen (Mckay 1981).

Con excepción de 2626 la actividad de PME se incrementó por efecto del almacenamiento inadecuado de la semilla (Tabla 12), esto podría ser el resultado de la inactivación de un posible inhibidor de esta enzima, presente en la pared celular, o bien a la disminución en solubilidad de las proteínas. Existe evidencia que apoya ambas propuestas (Hong-Wei, Zhou et al 2000). Es de llamar la atención el hecho de que con excepción de Flor de Mayo se extrajo más pectina de frijol almacenado inadecuadamente que de frijol en óptimo almacenamiento (Tabla 4). Aunque la composición química de la pectina para cada tratamiento fue diferente. La cantidad de azúcares neutros fue más abundante en la pectina aislada de frijol almacenado en condiciones inadecuadas que de frijol almacenamiento en condiciones óptimas (Tabla 5 y 6), sugiriendo que el almacenamiento permite la extracción de dominios de ramnogalacturonano unido a los de homogalacturonano. Como antes se mencionó en la pectina se localizan dos dominios, unidos muy probablemente por enlace covalente, químicamente diferente (Carpita y Gilbeaut 1993). El homogalacturonano y el ramnogalacturonano I. Bien podría ser que en frijol proveniente de un almacenamiento óptimo, el CDTA favoreciera la extracción de homogalacturonano, porque en el borde entre los dos dominios, se puede realizar una β -despolimerización controlada que permitiría la solubilización del homogalacturonano. Durante el almacenamiento se pierden grupos metilo, y por tanto la β -despolimerización no se establece o se realiza a menor velocidad, por lo que el CDTA arrastra juntos a los dos dominios de la cadena de pectina. También podría

ser que el frijol almacenado en condiciones óptimas, durante la extracción las glicosidasas presentes en la pared celular (Vennigerholi et al 1987) estén actuando e hidrolizan las cadenas laterales de azúcares de forma tal que no son extraídas durante el proceso de extracción de la pectina. En cambio en frijol almacenado inadecuadamente, donde las glicosidasas se han inactivado (Martínez 2003 y Pacheco 2003), el CDTA arrastra ambos dominios. En cualquiera de las propuestas anteriores, la abundancia de pectinas de alto peso molecular debería ser mayor en la pectina aislada de frijol almacenado inadecuadamente que de frijol almacenado óptimamente, en efecto se ha demostrado que este es el caso (Méndez 2003).

Otra evidencia que apoya la propuesta de que el almacenamiento inadecuado modifica la sensibilidad de la pectina a despolimerizarse, lo constituye el hecho de que la hidrólisis de la pectina aislada de frijol almacenado en condiciones inadecuadas solo se realizó efectivamente con tratamiento ácido a 120°C por 4 horas mientras que la pectina aislada de frijol almacenado en condiciones óptimas se hidrolizó en medio ácido a temperatura ambiente por 10 minutos. (Tabla 5 y 6). Desgraciadamente en este trabajo no generamos evidencia para apoyar la propuesta de un aumento en las estructuras de caja de huevo como consecuencia de la disminución en grado de metilación de las pectinas.

Lo anterior sugiere que la disminución de la velocidad de termosolubilización de las pectinas aisladas de frijol almacenado en condiciones inadecuadas se debe a que durante el almacenamiento se pierden los mecanismos que permiten la despolimerización de la pectina.

Estos mecanismos podrían ser el grado de metilación de la región del homopolisacárido y las glicosidasas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

- ❖ La actividad de Pectinmetilesterasa está presente en los cultivares ensayados.
- ❖ La cantidad de pectina extraída de los cultivares almacenados en condiciones inadecuadas fue mayor que la de los cultivares almacenados en condiciones óptimas.
- ❖ La composición química de la pectina se modificó durante el almacenamiento inadecuado.
- ❖ El grado de metilación de las pectinas aisladas de frijoles almacenadas inadecuadamente fue menor que el que presentaron las pectinas aisladas de semillas almacenadas en condiciones adecuadas.
- ❖ En condiciones de almacenamiento inadecuado la actividad de pectinmetilesterasa aumentó en los cultivares Flor de mayo y Bayo mecentral, sucediendo lo contrario en el cultivar 2626.
- ❖ La actividad de PME se incrementó por efecto del remojo en el cultivar 2626. En contraste en los cultivares Flor de mayo y Bayo mecentral disminuyó.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFIA

1. Academic Press, International union of biochemistry. (1979). Enzyme Nomenclature.
2. Albersheim, P., Darvill, A.G., O'Neill, M.A., Schol S., HA. and Voragen, A.G.J. (1996).
A hypothesis the same six polysaccharides are components of the primary cell wall
of all higher plants. Elsevier Science, Amsterdam 90.p.p 47-55.
3. Ann E. Hagerman (1986) .Continuous Spectrophotometric assay for plant
Pectinmethylesterase. J. Agric. Food 34:440-444
4. Bonnie, L, R. Loidice, A. Giovane, L. Quagliuolo, L. Servillo y D. Castaldo. (2002).
Thermostability of three pectinesterase isoenzymes in tomato fruit. 52: 415-418
5. Biliaderis, C.G., Grant, D.R. y Vose, J.R. (1981) Structural characterization of legume
starches I. Cereal Chem. 56: 496-452
6. 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.
UNAM, México DF. 52 páginas.
7. Blumenkrantz N. y Asboe-Hansen G. (1973) New method for quantitative
determination of uronic acids. Analytical Biochemistry 54:484-489.
8. Bordenave, M. (1996). Análisis de pectin methyl esterase. Plant cell analysis 17:165-
180.
9. Carpita, N.C. and Gilbeaut, D.M. (1993). Structural models of primary cell walls in
flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of
the walls during growth. Plant J. 3:1-30

10. Doesburg, J.J. (1965) Pectin substances in fresh and preserved fruits and vegetables. *J.Chem Phys* **3**:107-115
11. Douglas A. Skoog. (1999) *Análisis Instrumental*. 4ª edición, McGraw-Hill, Madrid, España.
12. Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substance. *Analytical Chemistry* **28**:350-356.
13. Fabienne M. (2001). Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *TRENDS in plant Science*. **6**: 414-419.
14. FAO (1970) Roma. Contenido de aminoácidos de los alimentos y datos biológicos sobre las proteínas.
15. Gaffe, J. et al (1997). Characterization and functional expression of a ubiquitously expressed tomato pectin methylesterase. *Plant Physiol* **114**:1547-1556.
16. Garcia-Vela LA, Stanley D.W. (1989) Protein denaturation and starch gelatinization in Hard-To-Cook beans. *J. Food Scie.* **54**:1030-1045
17. Graham, P.H. Ranalli, P. (1997). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Field Crops* **53**:131-146.
18. Hong-Wei Zhou, R. Ben-Arie, S.Lurie. (2000). Pectin esterase, polygalacturonase and gel formation in pea pectin fractions. *Phytochemistry*. **55**:191-195.
19. Howard Simons, Gregory A. Tucker. (1999). Simultaneous co-suppression of polygalacturonase and pectinesterase in tomato fruit: inheritance and effect on isoform profiles. *Phytochemistry*. **52**:1017-1022.

20. James L. Koch, Horbowicz M. y R. L. Obendorf (1999). Metanol, pectin and pectinesterase changes during soybean seed maturation. *Science Research* **9**: 311-320.
21. Jarvis, M.C., Forsyth, W. y Duncan, H.C. (1988). A survey of the pectin content of nonlignified monocot cell walls. *Plant Physiol.* **88**:309-314.
22. Johansson K., Musthapa E., Jorvall H. y Eklund H. (2002). Crystal structure of plant pectin methylesterase. *FEBS Letters* **514**:243-249.
23. Kertesz, Z.I. (1951) Pectic enzymes in the pectin substances. Ed., Interscience, New York, 353.
24. Keshun Liu y J. Hartz (1992). Cellular, biological and physicochemical basis for the Hard-To-Cook defect in legume seeds. *Critical Review in food science and nutrition*. **35**:265-298.
25. Keshun L., Phillips D. y Hung Yen-Con. (1995). Development of Hard-to Cook Defect in cowpeas: Role of Pectin methylesterase. *J. Agric. Food Chem* **40**: 949-952
26. Ketsa Saichol y Daengkanit Tira (1999). Firmness and activities of polygalacturonase, pectinesterase, β -galactosidase and cellulase in ripening harvested at different stages of maturity. *Sci. Horticulturae* **80**: 181-188
27. Kinsella J. (1991). *The Chemistry and Technology of Pectin*. Academic Press. New York, 273 pp.
28. Kon, S. (1968). Pectin Substances of Dry Beans and Their Possible Correlation With Cooking Time. *Journal of Food Sci.*, **33**, 437-450.

29. Krall, S., Redwell, R. (1998). Binding of divalent cations to oligomeric fragments of pectin. *Carbohydr. Res* **10**:343-350
30. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RL (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
31. M.J. Hincks y D.W. Stanley. (1986). Múltiple mechanisms of bean hardening. *J. of food Technology* **21**:731-750.
32. Martínez Silva A. V. 2003. Relación entre la actividad de poligalacturonasa y la calidad de cocción de frijol. Tesis Licenciatura, Facultad Química. UNAM, México D.F. 51 pag.
33. McKay J.E. (1981). The Behavior of Enzymes in Systems of Low Water Content. In *Water Activity. Influences of Food Quality*. Academic Press, N.Y., 1 pp 169-209.
34. Méndez Morales R. (2003). Influencia del Remojo en las Pectinas de la Lámina Media de los Dicotiledones de Frijol Deteriorados (*Phaseolus vulgaris*). Tesis. Fac. de Química. UNAM. México, D.F. pág. 63.
35. Monique EM, Ebbelaar, Gregory A. Tucker, Marjet M. Laats, Cees van Dijk, Trinette Stolle-Smits y Kess Recourt. (1996). Characterization of pectinases and pectin methylesterase cDNAs in pods of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant M. Biol* **31**:1141-1151.
36. O'Neill, Ma. (1994). Isolation and structural characterization of β -D-glucosyluronic acid and 4-O-methyl β -D-glucosyluronic acid containing. *Carbohydrate R.* **25** 230-243.

37. Pacheco González Leticia (2003) participación de glicosidasas de pared celular en la calidad culinaria del frijol. Tesis. Fac de Química. UNAM, México, D.F, pag 51
38. R.F. McFeeters y S.A. Armstrong. (1984). Measurement of pectin methylation in plant cell walls. *Analytical biochem.* **139**:212-217.
39. Rahel Oechslin, Marc V. Lutz, Renato Amado (2003). Pectic substances isolated from apple cellulosic residue: structural characterization of a new type of rhamnogalacturonan I. *Carbohydrate Polymers* **51** 301-310.
40. Reginald H. Walter (1988) Food science and technology, "The chemistry and technology of pectin". Academic Press Inc. Geneva, New York.
41. Reyes Moreno C., Paredes-López O. (1993). Hard-to-Cook phenomenon in common beans - A Review. *Critical reviews F. Scie. And Nut.* **33**: 227-286.
42. S.Krall y Roger F. McFeeters (1998). Pectin Hydrolysis: Effect of temperature, degree of methylation pH, and calcium on hydrolysis rates. *J. Agric Food Chem.* **46**:1311-1315
43. Sefa-Dedeh, S., Stanley, D.W., Voisey, P.W. (1979) Effect of storage time and conditions on the hard-to-cook defect in cowpeas (*Vigna unguiculata*). *J.Food Sci.* **44**:790-801
44. Stepheson, M.B. y Hawes, M.C.(1994) Correlation of pectin methylesterase activity in root caps of pea with root border cell separation. *Plant Physiol.* **106**: 739-745
45. Stanley W. y McDougall J. (1986) Chemical and structural determinants of texture of fabricated foods. *Food Technol.* **3**:65-69

46. Stolle-Smits, T., Boekhuizen, J., Pijnenburg M. y Voragen A (1999). Changes in cell wall polysaccharides of green bean pods during development. **121** 363-372
47. Varriano-Marston, E. y Jackson, G.M. (1981) Hard-to-cook phenomenon in beans. Structural changes during storage and inhibition. *J. Food Sci.* **46**:1379.
48. Vennigerholz, F., and Walles, B. (1987). Cytochemical Studies of Pectin Digestion in Epidermis With Specific Cell Separation Protoplasm. **140**:110-117.
49. www.infoagro.com/hortalizas/judia.htm