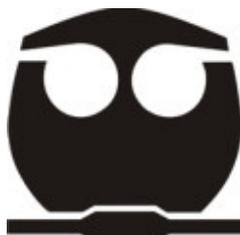




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**DETECCIÓN DE HEMICELULASAS Y SU PARTICIPACIÓN EN LA
CALIDAD CULINARIA DE LAS SEMILLAS DE FRÍJOL**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS
PRESENTA:
YAZMÍN IBÁÑEZ LEÓN



MEXICO, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

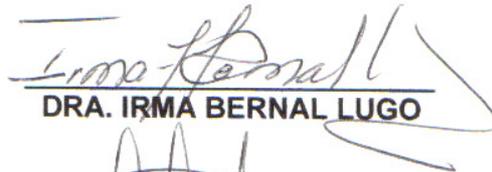
JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROF. IRMA OFELIA BERNAL LUGO
VOCAL: PROF. ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES
SECRETARIO: PROF. KARLA MERCEDES DÍAZ GUTIÉRREZ
1ER. SUPLENTE: PROF. ARMANDO CONCA TORRES
2° SUPLENTE: PROF. GILBERTO ALEPH PRIETO MORENO

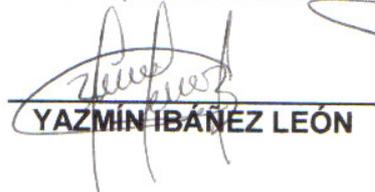
SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO 104, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA:


DRA. IRMA BERNAL LUGO

SUSTENTANTE:


YAZMIN IBÁÑEZ LEÓN

*A mis queridos padres que me han acompañado
incondicionalmente hasta esta etapa de mi camino...*

AGRADECIMIENTOS

A Dios y al buen destino que me guiaron al lugar y a las personas correctas para permitirme llegar hasta este momento de mi existencia.

A mis padres Paula y Adolfo por estar siempre conmigo, por su guía, por sus regaños, por todo. Gracias por estar ahí.

A mis hermanos Julio, Ulises y Gustavo por aguantar siempre a su linda hermanita, sobre todo en aquellos días de dificultades.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme dado la oportunidad de formarme profesionalmente entre sus aulas y así ser una pequeña parte de una de las instituciones más representativas de este país.

De manera particular, quiero agradecer a la Dra. Irma Bernal Lugo por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por todo el apoyo brindado tanto en recursos materiales como en su asesoría durante el desarrollo de este proyecto.

A las profesoras Rosario Muñoz Clares y Karla Díaz Gutiérrez, por el tiempo que se tomaron para la corrección de este trabajo.

A los profesores Armando Conca Torres y Gilberto Aleph Prieto Moreno, por su disposición para la conclusión de este trabajo.

Al Subprograma 127 "Formación Básica en Investigación" del Departamento de Superación Académica de la Facultad de Química. Periodo 2007-2008. Por el apoyo económico otorgado durante la realización del proyecto.

A mis queridísimos amigos Ana, Toño y Mario; pues no obstante la distancia, siempre estuvieron en mis pensamientos.

A mis amigos del laboratorio 104: Lorena, Jessica, Karla y Rodrigo por sus consejos, ayuda y su amena compañía durante aquellos largos días de trabajo en el laboratorio.

A los compañeros del laboratorio 105: Claudia, Natalia y Martín por su apoyo y compañía a lo largo del proyecto.

A la Q. Laurel Fábila Ibarra por el apoyo técnico brindado durante la realización de este trabajo.

Al M. en C. Enrique Martínez Manrique por su apoyo técnico durante el montaje de la metodología para la identificación de azúcares por HPLC.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	5
El fríjol.....	5
Generalidades.....	5
Estructura de la semilla de fríjol.....	6
Consumo de la semilla de fríjol.....	8
Inconvenientes para el consumo de la semilla.....	9
Procesamiento de la semilla de fríjol.....	10
Proceso de remojo.....	10
Proceso de cocción.....	11
Tiempo de cocción	12
Textura en alimentos de origen vegetal.....	12
La pared celular.....	13
Función.....	13
Organización y composición.....	13
Principales polisacáridos de pared celular.....	14
Celulosa	15
Pectinas.....	15
Hemicelulosas.....	18
Sustancias aromáticas.....	21
Proteínas.....	22
Enzimas involucradas en la degradación de polisacáridos de pared celular.....	23
OBJETIVOS	26
HIPÓTESIS	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Determinación de tiempo de cocción.....	27
Aislamiento de pared celular.....	28
Fraccionamiento de pared celular.....	29
Identificación de los azúcares presentes en la fracción de hemicelulosa por (HPLC).....	30
.....	30
Determinación de ácidos urónicos.....	31
Separación de la testa y el eje embrionario.....	32
Extracción de hidrolasas de pared celular.....	32

Cuantificación de las proteínas de pared celular.....	33
Método de Lowry.....	33
Preparación de los ensayos enzimáticos para la identificación y cuantificación de actividades de hemicelulasas presentes en la pared celular de diversos cultivares de fríjol.....	34
Actividad de endo hemicelulasas.....	35
Determinación de azúcares reductores por el método de Nelson-Somogyi.....	36
Cromatografía de filtración en gel de hemicelulosas.....	38
Cuantificación de azúcares totales.....	39
RESULTADOS	42
Determinación del tiempo de cocción.....	42
Identificación de los polisacáridos de hemicelulosas.....	42
Extracción y cuantificación de proteínas de pared celular.....	44
Identificación de actividades enzimáticas presentes en la pared celular de diversos cultivares de fríjol.....	45
Actividad de endo hemicelulasas.....	47
Patrón de distribución de pesos moleculares de la hemicelulosa.....	47
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIONES	55
PERSPECTIVAS	56
BIBLIOGRAFÍA	57

RESUMEN

La semilla de frijol junto con el maíz constituye la base de la alimentación en México, por lo que los estudios referentes a la comprensión de los mecanismos moleculares que ayuden a la obtención de cultivares de semillas con cualidades óptimas cobra gran importancia.

El remojo, previo a la cocción de la semilla de frijol, es un proceso que contribuye a disminuir su tiempo de cocción, lo que sugiere que durante la hidratación se realizan modificaciones estructurales en la semilla que facilitan su cocción. Con la finalidad de establecer lo anterior, y tomando en cuenta que el cambio en textura de diversos productos vegetales, se deben a la modificación enzimática de los polisacáridos estructurales de la pared celular, se hipotetizó que el remojo de la semilla de frijol previo a su cocción induce la activación de enzimas de pared celular que facilitan la transición térmica orden-desorden de los polisacáridos de pared celular, y por tanto la disminución de su tiempo de cocción. En estudios previos se ha demostrado que la hipótesis anterior se cumple para el caso de las pectinas y de la celulosa, por lo que durante este trabajo se estudió la participación de las hemicelulasas y las hemicelulosas en la disminución del tiempo de cocción inducido por el remojo. Para ello se determinó el tiempo de cocción de ciertas variedades, con y sin remojo, por el método de Mattson; se aisló la hemicelulosa, se estimó la composición química del polímero por cromatografía líquida de alta resolución, se realizaron ensayos enzimáticos para determinar la presencia de hemicelulasas y para conocer el efecto de las enzimas "in muro" se

determinó la distribución de pesos moleculares del polímero por cromatografía de filtración en gel.

La actividad de hemicelulasas se detectó en semilla seca, y en algunos cultivares se incrementó tras el remojo. La fracción de hemicelulosa fue rica en arabinosa, xilosa y glucosa; mientras que su peso molecular disminuyó discretamente tras el remojo. Estos resultados sugieren que las hidrolasas de las hemicelulosas no participan de manera importante en el mecanismo por medio del cual el remojo disminuye el tiempo de cocción de la semilla de frijol, o bien que la estrategia experimental empleada no fue lo suficientemente sensible para detectar los cambios.

INTRODUCCIÓN

Uno de los atributos de la semilla de frijol, exigido por el consumidor doméstico o industrial, es que presente bajos tiempos de cocción, pues un menor tiempo de ebullición implica un menor gasto energético y por tanto un ahorro económico. Con la finalidad de disminuir el tiempo de cocción, la semilla se somete a un periodo de remojo previo a su tratamiento térmico. Se desconoce el mecanismo por medio del cual la hidratación de la semilla disminuye el tiempo de cocción. Sin embargo, durante el periodo de remojo se inicia la germinación y con ello la actividad de las hidrolasas de la pared celular. Por otro lado, en vegetales suculentos los cambios en textura se deben principalmente a la hidrólisis enzimática de los diversos componentes estructurales de la pared celular, con lo cual se modifica la fuerza de interacción entre ellos, resultando en una estructura más laxa de la pared.

Por lo anterior, en este proyecto se propuso que en la pared celular de la semilla de frijol están presentes diversas hemicelulasas, las cuales se activan al hidratarse la semilla durante el remojo e hidrolizan a las hemicelulosas, lo que permite el deslizamiento de las fibras de celulosa y por ende una pared celular más laxa. Ello se traduce en un menor tiempo de tratamiento térmico, para alcanzar la textura exigida por el consumidor. Con la finalidad de probar la propuesta anterior, en este trabajo se estudió si durante el remojo existió un incremento en la actividad de hemicelulasas y si éstas participan en cambios en la composición química de las hemicelulosas aisladas de semillas de tres variedades de frijol tanto secas como remojadas. Los resultados

indicaron que efectivamente las hemicelulasas se activaron durante el remojo de la semilla, pero su acción “in muro” no fue significativa, lo que sugiere que la participación de esta fracción de polisacáridos en el efecto benéfico del remojo sobre el tiempo de cocción podría ser marginal.

ANTECEDENTES

El fríjol

Generalidades

El fríjol común (*Phaseolus vulgaris L*); es una dicotiledónea miembro de la familia Leguminosae, familia Phaseoleae, cuyas plantas también son denominadas como frésoles, judías, porotos, caraotas, habichuelas o alubias en los distintos países de habla hispana. Son plantas por lo general anuales (pues su ciclo de vida dura una sola estación), aunque también las hay perennes, distribuidas por prácticamente todo el mundo pudiendo crecer en climas tanto tropicales como templados. Algunas de las plantas son de tipo trepadoras, arbustos y enredadera, con flores de tres colores variados cuyos pétalos recuerdan a las alas de mariposa, razón por la cual a la subfamilia, se le denomina también de las papilionáceas. El fruto es contenido en una vaina o legumbre alargada, recta o arqueada, en cuyo interior se disponen varias semillas de forma variable, generalmente arriñonadas (Graham y Ranalli, 1997).

Los fríjoles constituyen una de las principales plantas de huerta por el alto valor alimenticio de sus vainas y semillas. También es usada como forraje, y para enriquecer el suelo, pues permite su fertilización, ya que, gracias a unos pequeños nódulos de bacterias que poseen en sus raíces, tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y transformarlo posteriormente en compuestos que sirven para la nutrición del vegetal.

En general, el fríjol para su cultivo requiere temperaturas no excesivamente altas, así como suelos húmedos y bien aireados con abundantes elementos nutritivos.

En nuestro país existen alrededor de 150 especies, destacando sólo cuatro: éstas son *Phaseolus vulgaris* L. (fríjol común), *Phaseolus coccineus* L. (fríjol ayocote), *Phaseolus lunatus* L. (fríjol comba) y *Phaseolus acutifolius* Gray (fríjol tepari), siendo las dos primeras especies las de mayor importancia (SAGARPA, 2007).

Los principales estados productores de fríjol son Zacatecas, Durango, Chiapas, Sinaloa y Chihuahua, pues ellos representan el 63% de la superficie sembrada de fríjol y el 65% de la producción nacional, aunque el fríjol se cultiva en los 32 estados de la República de manera menos extensiva y con variedades que se adaptan a las diferentes condiciones climáticas del país (SAGARPA, 2007).

Estructura de la semilla de fríjol

Las semillas de fríjol suelen diferir en cuanto a forma, tamaño y color, pudiendo ser reniformes, redondas esféricas o cilíndricas y siendo las variedades silvestres más pequeñas que las domesticadas (García, 1994).

En el fríjol común, la semilla madura consta de un embrión y de la cubierta de la semilla o testa. El embrión a su vez consiste de un eje embrionario y dos cotiledones. En muchas semillas secas éstos componentes cuentan respectivamente con los siguientes porcentajes del peso seco de la semilla: cubierta de la semilla o testa del 6-8%, cotiledones aproximadamente el 90% y eje embrionario del 1-2% (Macrae et al., 1993). La estructura típica de la semilla y sus diversas partes anatómicas se muestran en la Figura 1.

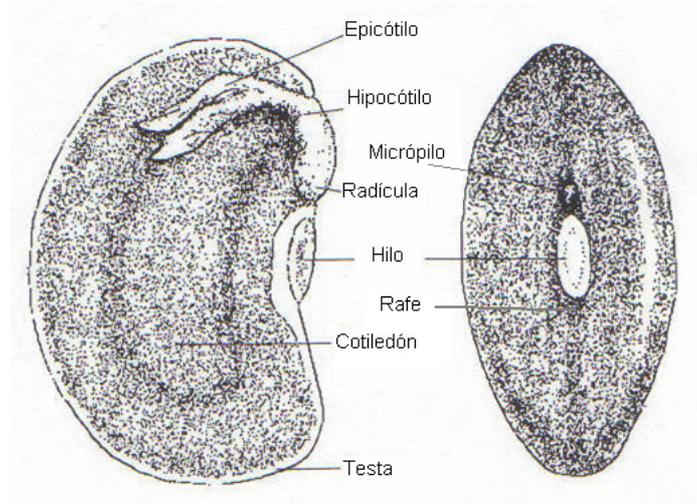


Figura 1. Estructura de la semilla de frijol. Tomado de Macrae et al. (1993).

La capa más externa de la semilla es la cubierta o testa, la cual da protección a las estructuras que integran el embrión y lo protege de posibles daños causados por exceso de absorción de agua, contaminación microbiana o ataques de insectos. La estructura externa, además suele presentar algunas pequeñas formaciones superficiales conocidas como hilo, micrópilo y rafe. El hilo es una especie de marca cicatricial larga y usualmente de forma oval, que se localiza cerca de la mitad del borde en donde la semilla estaba unida al tallo o fúnculo. El micrópilo que tiene la apariencia de un pequeño orificio o apertura, es una estructura por la cual se regula la imbibición del agua por la semilla. El rafe es una cresta al lado del hilo y opuesto al micrópilo que representa la base del tallo que se fundió con la testa durante el proceso de maduración de la semilla. La estructura interna de la semilla contiene al embrión, mismo que incluye dos cotiledones y el eje embrionario. Los cotiledones contienen la mayoría de los nutrientes que posee la semilla; son estructuras abultadas las cuales contienen los almidones de reserva y proteínas, además de ser el componente mayoritario en cuanto a volumen y peso seco de la semilla. Por otro lado está el eje embrionario que incluye el

epicótilo, el hipocótilo y la radícula. El epicótilo es la parte del eje embrionario situada encima de la inserción de los cotiledones y que se opone al hipocótilo.

El hipocótilo es una raíz primaria cuya punta es la radícula, misma que dará origen a la raíz. Todas estas estructuras pertenecen en conjunto a un esbozo de los futuros órganos de la planta adulta (Macrae et al., 1993).

Consumo de la semilla de frijol

Junto con el maíz, el frijol común es uno de los alimentos más importantes de México. Las semillas de ambas especies aportan casi la totalidad de proteínas vegetales que consume la mayoría de la población, por lo que ocupan un lugar de gran importancia en la dieta básica de los mexicanos (Allende et al., 2006).

Por otro lado, el frijol representa una fuente económica de proteína en poblaciones donde su disponibilidad es baja; además de que en los últimos tiempos el consumo de esta semilla ha generado un gran interés en poblaciones conscientes de su salud, ya que posee fibras del tipo soluble que son muy convenientes para aportar a la dieta una ingestión satisfactoria de fibras o por ejemplo para el control de pacientes diabéticos.

El interés por el consumo del grano genera una mayor demanda por parte de la población, que exige ciertas propiedades que debe presentar para conocer su calidad, así como su futuro comportamiento durante su procesamiento.

El conjunto de estas propiedades fisicoquímicas, como tamaño del grano, color, uniformidad, sabor, características del líquido de cocción, contenido de proteína, y tiempo de cocción, son conocidas como cualidades de calidad culinaria y son fundamentales para la aceptación comercial de una variedad específica de frijol (Allende et al., 2006).

Una de las características que se considera de suma importancia para la selección de una variedad por el consumidor, es la que tiene que ver con el tiempo de cocción, ya que un menor tiempo implica facilidad de preparación, un menor consumo de energía y, nutricionalmente hablando, menores pérdidas de vitaminas y minerales.

Inconvenientes para el consumo de la semilla de frijol

No obstante sus beneficios, la semilla de frijol presenta ciertas restricciones para su consumo, debido a:

1. Contenido de antinutrientes, consideradas como factores responsables de la pobre utilización de proteína, que son sustancias como: inhibidores de proteasas y de amilasas, lectinas, fitohemaglutininas, y ácido fítico.
2. Problemas de digestibilidad, por taninos y polifenoles condensados que se unen a proteínas resultando en una proteólisis insuficiente; también presencia de almidón que es del tipo resistente a la digestión por enzimas humanas, lo que produce degradación amilolítica limitada.
3. Factores de flatulencia por presencia de oligosacáridos no digeribles y ciertas proteínas.
4. Procesamiento de las semillas. Tiempo de cocción excesivo (Lindner, 1995; Macrae et al., 1993).

Por estas razones, para poder consumir las semillas sin el riesgo a una posible intoxicación es recomendable remojarlas antes de someterlas a tratamiento térmico. Por ejemplo, los inhibidores de proteasas son sensibles particularmente al calor húmedo, siendo más efectiva su destrucción si la semilla fue remojada previamente de 12 a 24 h (Janssen, 1997). El grado de destrucción no sólo depende de la temperatura y duración

del tratamiento térmico, sino también de la humedad de la semilla. Aquí podemos aludir lo que sucede al inhibidor de tripsina, que se destruye por acción de calor húmedo en 15 minutos si la humedad de la semilla es del 20% y en tan solo 5 minutos si la humedad es de 60% (Lindner, 1995). Otras sustancias como los polifenoles se reducen significativamente después del remojo y la cocción. También se ha demostrado que la germinación disminuye la presencia de algunos antinutrientes como el ácido fítico y oligosacáridos no digeribles (Duranti y Guis, 1997). De ahí la importancia que tiene el darle a la semilla un procesamiento previo a la cocción.

Procesamiento de la semilla de frijol

Debido a que las semillas crudas de frijol tienen mal sabor, que por su dureza son prácticamente inmasticable y que como ya se había mencionado, presentan antinutrientes o sustancias tóxicas, para su consumo éstas suelen ser sometidas a una fase previa de remojo, seguido de un tratamiento térmico o proceso de cocción. Ambos tratamientos, modifican la microestructura de la semilla de manera tal que se obtendrá un grano suave y agradable al paladar. A continuación explicaremos en qué consiste tanto el remojo como la cocción de la semilla.

Proceso de remojo

El remojo de la semilla suele usarse para humedecerla y suavizarla, con el fin de disminuir su tiempo de cocción y ayudar a la remoción de la testa. El remojo también reduce el contenido de sustancias tóxicas en la semilla, y por otro lado disminuye la contaminación superficial de ésta. El tiempo necesario de remojo suele variar entre variedades y especies de semilla y entre condiciones de almacenamiento; sin embargo,

de manera tradicional, las semillas de frijol son remojadas toda la noche por un periodo de entre 8-16 h, en agua fría. El uso de agua de remojo a altas temperaturas acelera la hidratación. Durante la imbibición, la semilla absorbe agua a través de la testa seguida por la penetración en los cotiledones. Tras el proceso de remojo, se dan cambios como aumento de volumen, hidratación de los gránulos de almidón, solubilización de compuestos hidrosolubles de la pared celular y por consiguiente cambios en la dureza de la semilla (Macrae et al., 1993; Blancas, 2001).

Proceso de cocción

El tratamiento térmico, incrementa la suavización del cotiledón, mejora el sabor e inactiva enzimas y factores tóxicos intrínsecos de la semilla; así como aumenta significativamente la digestibilidad de las proteínas de la semilla y hace que adquiera caracteres sensoriales agradables.

Los granos enteros pueden ser cocinados, con o sin testa, en agua a ebullición o a vapor, siendo más común, sobre todo en poblaciones rurales, el hervido de la semilla con agua a fuego lento, hasta obtener el grano con una suavidad y sabor agradables. Factores como la variedad de la semilla y su almacenamiento también afectan de manera directa el tiempo de cocción de la semilla.

Durante la cocción, en la semilla ocurrirán los mayores cambios estructurales, pues las altas temperaturas generan difusión libre de agua dentro de la célula, pérdida de turgor, separación de las células por solubilización de la lamela media, estallido celular, sucediendo también la gelatinización del almidón, y la desnaturalización de proteínas; daños que en conjunto producen la pérdida generalizada de la firmeza (Waldron, 2003).

Tiempo de cocción

El periodo de tratamiento térmico durante el cual la semilla se suaviza y adquiere sabor y textura agradables al paladar se conoce como tiempo de cocción (García, 1994).

Textura en alimentos de origen vegetal

Los órganos de las plantas comestibles son estructuras altamente complejas que comprenden a su vez una serie de subestructuras. Los órganos se componen por tejidos, los que a su vez contienen a las células con sus espacios intercelulares, que difieren en forma, tamaño y nivel de empaquetado; cada célula está rodeada por su propia pared celular, misma que tiene su propia composición. De ahí que las propiedades mecánicas existentes en la pared, junto con la presión de turgor interna de la célula y la adhesión intercelular, sean determinantes de las características de firmeza y por tanto de las características de textura de los tejidos y órganos de los vegetales comestibles. Por lo que un cambio en la construcción de la pared celular se verá reflejado en un cambio en la textura del vegetal (Waldron, 2003). Por lo anterior, los cambios en textura inducidos por el remojo o la cocción en semillas de frijol deben estar relacionados con cambios en la microestructura de la semilla. Los cambios a este nivel en una semilla seca o en una semilla remojada no se conocen bien, pero se considera que inciden directamente sobre la pared celular. De ahí la importancia de conocer como se encuentra organizada dicha estructura.

La pared celular

Función

De entre las estructuras que caracterizan y definen a las células vegetales se encuentra la pared celular. Ésta es una estructura altamente compleja de gran importancia biológica, para el ciclo de vida de la planta.

La principal función de la pared celular es dar rigidez, forma y tamaño a la célula; pero también es capaz de facilitar y regular el crecimiento celular y su división en tejidos expandidos, ayuda en el transporte intercelular, protege al protoplasto del daño ambiental, brinda protección contra microorganismos extraños, previene la difusión de iones y agua del exterior a la membrana celular, sirve como un medio de comunicación entre células, forma canales para la circulación de fluidos y puede actuar como estructura de almacenamiento (García y Peña, 1995; Waldron, 2003; Cosgrove, 2006).

Organización y composición

En la pared celular de las plantas superiores se distinguen de manera general tres diferentes regiones conocidas como la lamela media, la pared primaria y la pared secundaria.

La lamela media forma una capa intercelular amorfa entre las paredes celulares de células adyacentes; su función es mantener unidas a las células vegetales individuales y se compone principalmente por pectinas cuyas funciones son determinar la porosidad de la pared celular y, entre otras, servir como receptor de moléculas que emiten señales para desarrollar respuesta a organismos patógenos, insectos o simbióticos (García y Peña, 1995; Lodish et al., 2005).

La pared celular primaria es una estructura delgada que se forma cuando la célula está en crecimiento, rodea al protoplasto e incluye a la membrana plasmática; mientras que la pared celular secundaria se encuentra entre la pared primaria y la membrana celular y no es producida por todas las plantas, siendo más común en células vegetales maduras que han dejado de crecer. Estas paredes suelen ser más gruesas y generalmente están constituidas por varias capas que pueden formar patrones tipo espirales, redes o anillos debido a que suelen acumular un mayor contenido de ligninas (Carpita y McCann, 2000; Lodish et al., 2005).

Las paredes celulares primarias están formadas por diversas moléculas como carbohidratos, proteínas, lignina, agua, iones y moléculas inorgánicas; mientras que en lo que respecta a su organización espacial, se distinguen principalmente dos fases: la fase microfibrilar y la fase amorfa o matriz de polisacáridos (Cosgrove, 2005). La fase microfibrilar está constituida por celulosa, y la matriz se encuentra formada por dos tipos de polisacáridos: las sustancias pécticas y las hemicelulosas. Esta fase también contiene pequeñas cantidades de proteínas estructurales y catalíticas, compuestos fenólicos, agua, y minerales; además de que los polisacáridos que suelen constituirlos, pueden variar entre el tipo de célula y la especie de la planta (Carpita y McCann, 2000; Cosgrove, 2005).

Principales polisacáridos de pared celular

Su clasificación ha sido basada, históricamente, en su estructura química y en sus principales métodos de extracción. De acuerdo a estos criterios, se han agrupado en tres grandes categorías: celulosas, péctinas y hemicelulosas; estos últimos se encuentran asociados a proteínas y compuestos fenólicos.

Celulosa

La celulosa es el más abundante y uno de los más conocidos polisacáridos presentes en plantas; siendo el principal responsable de la rigidez estructural de las paredes celulares por su estabilidad y naturaleza cristalina y microfibrilar. Es una molécula lineal constituida por unidades de β -D- glucosa, unidas con enlaces glucosídicos en posición β 1-4. En la pared un número variable de estas moléculas se unen para formar las estructuras denominadas microfibrillas, las cuales pueden mantenerse juntas y estables por formación de enlaces internos de puentes de hidrógeno (Cosgrove, 2005; Lodish et al., 2005).

Pectinas

Constituyen un grupo heterogéneo de polisacáridos que se encuentran principalmente en la lamela media y en la pared celular primaria de plantas dicotiledóneas (Brett y Waldron, 1990) y que de manera característica contienen azúcares ácidos como el ácido galacturónico y azúcares neutros como ramnosa, arabinosa y galactosa. Las pectinas son los polisacáridos más solubles de la pared celular, ya que pueden ser extraídos con agua caliente, ácidos diluidos o agentes quelantes de calcio (como el ácido etilendiaminotetracético, EDTA, y el ácido ciclohexano-trans-1,2-diamino-N, N, N', N'-tetracetato, CDTA).

En la pared celular, las pectinas son grandes y complejas moléculas compuestas por diferentes dominios de polisacáridos, que se cree, pueden estar unidos por enlaces covalentes o no covalentes.

Algunos dominios de polisacáridos pécticos como el homogalacturonano (HG), poseen una estructura relativamente simple. Este polisacárido, también llamado ácido poligalacturónico, es un polímero de (1→4) α -D-ácido galacturónico. Ver Figura 2.

Dentro de otro dominio también se encuentra al ramnogalacturonano I (RGI), el cual es un esqueleto largo de residuos alternados de (1→4) α -D-ácido galacturonil y (1→2) α -D-ramnosil. Esta molécula es muy grande y a su cadena principal se encuentran unidas grandes cadenas laterales de otros polisacáridos como arabinanos y galactanos (Waldron, 2003; Cosgrove, 2006). Otro polisacárido péctico, considerado de mayor complejidad y altamente ramificado, es el conocido como ramnogalacturonano II (RGII), el cual contiene un esqueleto de homogalacturonano decorado con cadenas laterales que comprenden al menos diez diferentes azúcares en un complicado patrón de enlaces. Aunque RGI y RGII tienen nombres similares poseen diferentes estructuras. Las unidades de RGII forman dímeros a través de enlaces de diésteres de borato, encontrándose que este tipo de asociación contribuye al buen mantenimiento de la resistencia y estructura de la pared celular, pues se ha visto que la carencia de estos dímeros conduce a un mayor hinchamiento de la pared, incrementando su porosidad y debilitando su estructura (Carpita y McCain, 2000; Cosgrove, 2006).

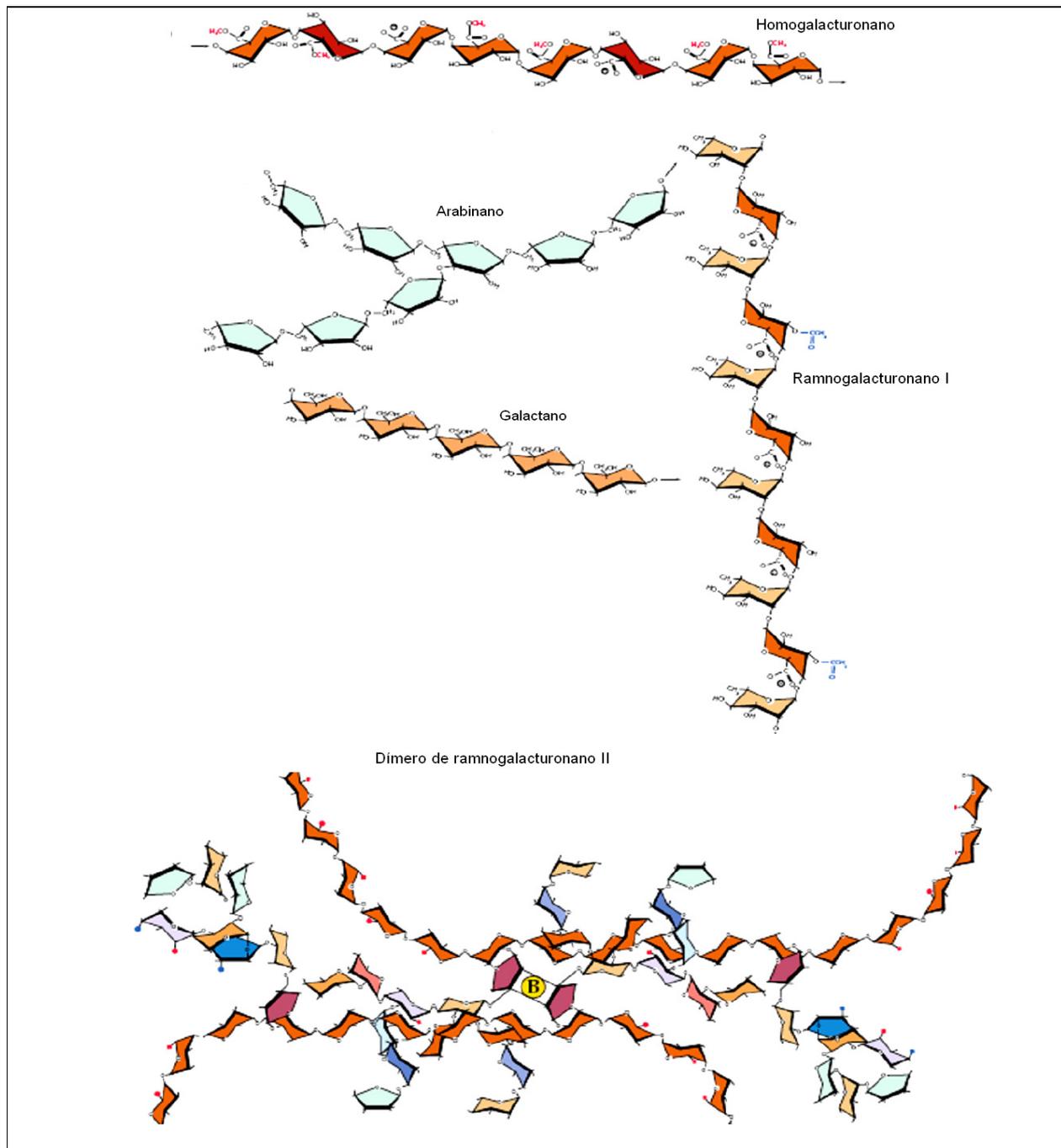


Figura 2. Estructuras simplificadas de algunos polisacáridos pécticos de la pared celular. Las estructuras representan fragmentos de moléculas grandes. Se muestra respectivamente el homogalacturonano cadenas de $(1\rightarrow4)$ α -D-ácido galacturónico, el ramnogalacturonano I con un esqueleto principal de residuos alternados de $(1\rightarrow4)$ α -D-ácido galacturonil y $(1\rightarrow2)$ α -D-ramnosil y sus cadenas laterales de arabinanos y galactanos, ramnogalacturonano II complejo de homogalacturonano con cuatro distintos grupos compuestos por azúcares como: L-arabinosa, L-ácido acérico, D-3-deoxi-D-lixo-2-ácido heptulopiranosilico, L-fucosa, D-3-deoxi-D-mano-ácido octulosónico, D-galactosa; los puntos rojos y azules se refieren a grupos metilo y grupos acetilo. Adaptada de Carpita y McGain (2000).

Hemicelulosas

Las hemicelulosas están presentes tanto en paredes celulares primarias como secundarias y su presencia se ha comprobado en un gran número de semillas, entre las que están el maíz, la soya y el frijol común.

Representan la fracción de azúcares neutros que son extraídos de las paredes celulares despectinizadas con álcalis fuertes en concentraciones de entre 2.0 a 4.0 M de hidróxido de sodio o hidróxido de potasio (Brett y Waldron, 1990; Krishnamurthy, 1999; Cosgrove, 2005).

La hidrólisis de hemicelulosas genera diferentes hexosas (como glucosa, galactosa, manosa), pentosas (como xilosa y arabinosa) y en ocasiones ácidos urónicos (como ácido galacturónico). Estos componentes suelen variar relativamente en diferentes cantidades y en diferentes combinaciones de acuerdo a la especie estudiada. (Krishnamurthy, 1999).

Las hemicelulosas se encuentran presentes en forma de diversos polisacáridos, entre los que están los xiloglucanos, los xilanos, los arabinoxilanos, los glucomananos, los mananos y galactomananos y los glucuronomananos. Siendo los xiloglucanos las hemicelulosas de mayor presencia en paredes celulares primarias de plantas dicotiledóneas (Carpita y McCain, 2000; Waldron, 2003).

Los xiloglucanos poseen una estructura base muy similar a la de la celulosa, ya que está constituida por una cadena lineal de residuos de glucosa unidos por enlaces tipo β (1 \rightarrow 4), y que a su vez contiene numerosos grupos laterales que pueden consistir de residuos de α -D-xilosa, α -L-arabinosa o β -D-galactosa, dependiendo de la especie, aunque en ocasiones a la galactosa se le adiciona una α -L-fucosa.

Ya que el esqueleto principal no varía entre los xiloglucanos de diferentes plantas y tejidos, la clasificación de éstos se realiza en base a la naturaleza de las ramificaciones. De esta manera los xiloglucanos se nombran con un código de letras (Tabla 1), que constituye un listado ordenado del patrón de sustituciones de las cadenas laterales. Cada letra corresponde al residuo de azúcar que constituye la última ramificación lateral y que se refiere a la sub-estructura entera a la que pertenece dicho residuo. Además la letra G, se refiere a los residuos de glucosa del esqueleto principal cuando éstos no están ramificados.

Tabla 1*. Abreviaturas de una letra para los grupos laterales en los xiloglucanos

Letra designada	Azúcar terminal	Grupo lateral que se representa en la cadena de glucano
G	D-Glucosa	Ninguna
X	D-Xilosa	α -D-Xil-(1→6)-
L	D-Galactosa	β -D-Gal-(1→2) α -D-Xil-(1→6)-
F	L-Fucosa	α -L-Fuc-(1→2)- β -D-Gal-(1→2)- α -D-Xil-(1→6)-
A	L-Arabinosa	α -L-Ara-(1→2)- α -D-Xil-(1→6)-

*Adaptada de Carpita y McCain (2000).

Por ejemplo los xiloglucanos del tipo XXXG presentan tres residuos consecutivos de glucosa ramificados con xilosa y un cuarto residuo de glucosa no ramificado.

En algunos otros tejidos de plantas dicotiledóneas también existen los llamados fucogalactoxiloglucanos (Figura 3), en donde además de los residuos de xilosa, se adicionan también un α -L fucosa y una β -D-galactosa quedando la cadena compuesta por cantidades casi iguales de unidades tipo XXXG y XXFG, pero que también pueden contener α -L-arabinosas (Carpita y McCain, 2000).

Sustancias aromáticas

Las plantas producen muchos tipos de sustancias aromáticas. Ciertos compuestos de este tipo son depositados en la pared celular. Estos compuestos pueden dividirse principalmente en dos tipos: la lignina, que es principalmente un polímero fenólico cuyos precursores son los alcoholes aromáticos cumarol, coniferol, y sinapol, confiriéndole características de fuerza y soporte a los tejidos de la planta, permitiendo su crecimiento. El segundo tipo consiste en los ésteres fenólicos como el ácido ferúlico, que se puede encontrar unido a diferentes polisacáridos de la pared, como por ejemplo a pectinas (Brett y Waldron, 1990; Peña y García, 1995; Waldron, 2003; Quezada, 2005).

Como ya se ha visto, la pared celular es una estructura altamente compleja de ahí la conveniencia de presentar a continuación un modelo de pared celular en el que se muestra como se considera están organizados los diferentes polisacáridos dentro de ésta.

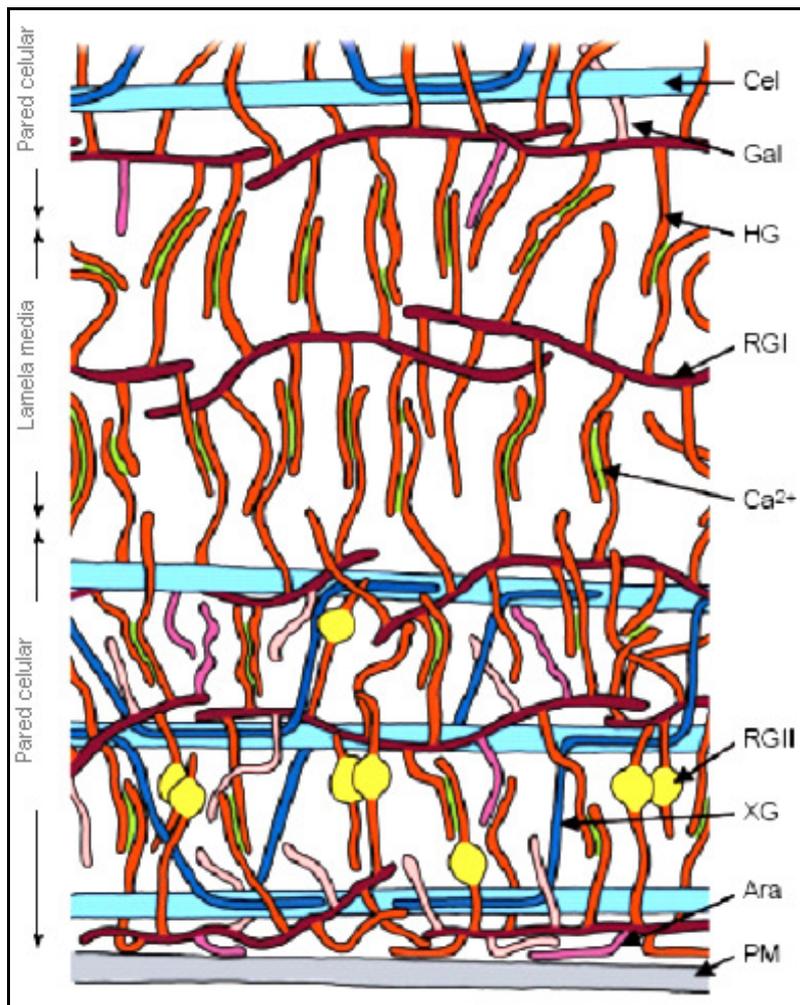


Figura 4. La pared celular. Modelo que muestra la organización de los polisacáridos en la pared celular de plantas. Aquí las microfibrillas de celulosa (Cel) están entrecruzadas con los xiloglucanos (XG), miembro de las hemicelulosas. El ramnogalacturonano I (RGI) está también alineado con las microfibrillas de celulosa. Los homogalacturonanos (HG), arabinanos (Ara), galactanos (Gal) y ramnogalacturonanos II (RGI) se encuentran unidos como cadenas laterales de un esqueleto principal de alto peso molecular de RGI. PM, membrana plasmática. Tomado de Vorwerk et al. (2004).

Proteínas

Las proteínas de la pared celular pueden ser estructurales o enzimas (Cosgrove, 1997). Las proteínas estructurales de la pared celular han sido divididas en tres clases principales: proteínas ricas en prolina, proteínas ricas en glicina y proteínas conjugadas con pequeños oligosacáridos que dan lugar a las glicoproteínas, mismas que a su vez son ricas en un aminoácido poco usual como la hidroxiprolina. Dentro de este último grupo se localizan las extensinas, que son la familia de proteínas de la pared celular más estudiadas (Srivastava, 2002).

Por otro lado, las proteínas enzimáticas están distribuidas a lo largo de la pared celular; su localización específica y su asociación con otros componentes de la pared aún no se encuentran bien esclarecidas. Muchas de estas enzimas parecen ser proteínas solubles, ya que son extraídas por solventes acuosos. La mayoría están involucradas con modificaciones en la arquitectura de la pared, porque hidrolizan componentes importantes de ésta. Es decir, participan en procesos importantes durante la vida de la célula, como en su crecimiento, durante la elongación o expansión de estructuras como tallo, raíz, hojas o frutos, en fenómenos como maduración y senescencia de frutos, en abscisión de hojas y otros órganos, aparte de intervenir en la etapa de germinación de las semillas. Las enzimas localizadas en la pared celular incluyen en general actividades de sintasas, transferasas, peroxidasas, invertasas e hidrolasas (Srivastava, 2002; Minic y Jouanin, 2006), siendo estas últimas las de mayor interés para fines de este trabajo.

Enzimas involucradas en la degradación de polisacáridos de pared celular

La degradación de los polisacáridos de la pared celular es dependiente de la acción de numerosas enzimas. Fry (2004) clasifica a estas enzimas dentro de tres grupos: exopolisacaridasas, endopolisacaridasas y otras hidrolasas que no entran dentro de la clasificación de los dos primeros grupos. Las exopolisacaridasas inciden directamente sobre poli y oligosacáridos, por los extremos no reductores de las cadenas, o directamente sobre las ramificaciones o substituciones de las cadenas laterales, liberando así monosacáridos y en ocasiones disacáridos. Las endopolisacaridasas atacan directamente en la cadena principal del polímero, en cualquier posición, dentro de ésta. Estas enzimas, tras su acción, tienen un inmediato y gran impacto sobre el

peso molecular del polisacárido. Las hidrolasas del tercer grupo, pueden romper algunas sustituciones que no son carbohidratos, unidas a diversos polisacáridos como grupos O-metil, O-acetil, O-feruloil, entre otros (Minic y Jouanin, 2006). Debido a que los polímeros de la pared celular son muy heterogéneos y complejos, el espectro de actividades enzimáticas que se pueden encontrar es muy amplio, pudiéndose encontrar las actividades de endo y exo para muchos casos.

Dentro de las enzimas que se consideran más importantes como remodeladoras de pared celular se encuentran las endoglucanasas, xilanasas, pectinasas, pectin metil esterasas, xiloglucan endotransglicosidasas/hidrolasas (Cosgrove, 1997).

Para el caso de las enzimas hidrolíticas, que atacan directamente a la fracción de hemicelulosas, se reconocen aquellas que atacan a los polisacáridos propios de éstas, es decir a los xiloglucanos, xilanos y arabinoxilanos.

De manera esquemática, en la Tabla 2 se presenta un resumen de las principales enzimas hidrolíticas causantes de posibles cambios de estructura en las hemicelulosas.

Tabla 2. Principales enzimas hidrolíticas responsables de modificaciones en hemicelulosas

Enzima	Acción propuesta
Enzimas tipo endo	
Endo- β -(1,4) glucanasas (también conocidas como celulasas).	Rompen los enlaces β -(1,4) de la cadena de glucano en los xiloglucanos y también de la celulosa no cristalina (Bennett y Rose, 1999, Srivastava, 2002; Minic y Jouanin, 2006).
Endoglucanasas específicas para xiloglucano: las xiloglucan endo-transglicosidasas/ hidrolasas.(XHTs).	Dividen la cadena de xiloglucano endolíticamente, (XHTs); pueden exhibir ambas actividades de hidrolasas (endo y exo) o endo-transglicosidasas. Éstas parten la cadena de un xiloglucano donador liberando fragmentos con extremos reductores y los vuelve a unir a otro oligosacárido aceptor. (Bennett y Rose, 1999; Minic y Jouanin, 2006)
Endoxilanasas, Endo- β -(1,4) xilanasas.	Rompen endolíticamente el esqueleto de xilano en las cadenas de arabinoxilano.
Enzimas exo	
Glicosidasas.	Hidrolizan principalmente mono o disacáridos de extremos no reductores de oligo o polisacáridos; de cadenas principales o substituyentes. (Bennett y Rose, 1999)

OBJETIVOS

Objetivo General:

- ◆ Definir la participación de las hemicelulasas en las modificaciones de la pared celular inducidas por el remojo de la semilla de frijol y que ayudan a disminuir su tiempo de cocción.

Objetivos específicos:

- ◆ Determinar los tiempos de cocción de tres variedades de semillas de frijol bajo dos condiciones: semillas secas y remojadas.
- ◆ Conocer la composición química de la fracción de hemicelulosa de tres variedades de frijol con y sin remojo.
- ◆ Cuantificar la actividad de hemicelulasas en extractos de semillas de frijol.
- ◆ Identificar el peso molecular promedio de las cadenas de hemicelulosa presentes en la pared celular aislada de semillas con y sin remojo.

HIPÓTESIS

Si las hemicelulasas se activan durante el remojo del frijol, entonces la actividad de estas hidrolasas se detectará en mayor medida en semillas remojadas que en secas y su acción "in situ" se manifestará como un cambio estructural de la fracción de hemicelulosa, detectado como cambio en peso molecular o en su composición química. La magnitud de este cambio deberá correlacionar con la disminución en el tiempo de cocción de la semilla inducida por el remojo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los genotipos de fríjol utilizados para este trabajo fueron las conocidas como Flor de Mayo M38, 2626 y Bayo Mecentral. Estos materiales fueron sembrados en la localidad de Santa Lucia, Texcoco, estado de México.

Para cada genotipo las semillas se dividieron en dos lotes. Uno se sometió a un periodo de remojo, mientras que en el otro la semilla se manipuló estando seca. El remojo de las semillas se realizó de tal manera que por cada gramo de semilla se adicionaron 5 mL de agua desionizada, por un periodo de tiempo de 16 horas y a temperatura ambiente. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado y cada experimento se repitió tres veces de manera independiente.

Determinación de tiempo de cocción

El tiempo de cocción se determinó con un “cocinador Marston” (Figura 5).

Este consiste en un soporte con 25 pocillos, en donde fue colocada una semilla de fríjol y luego una varilla sobre la superficie de cada semilla, más una masa de 200 g. El sistema se introdujo en una olla de peltre con agua hirviendo y se mantuvo a ebullición. Durante el experimento se registró el tiempo en el que cada varilla perforó una a una a las semillas de fríjol, hasta que el total de las semillas sometidas al experimento fueron perforadas (Jackson y Varriano-Marston, 1981; Blancas, 2001). Con estos resultados se construyeron gráficas donde cada punto representó el porcentaje de fríjoles perforados o cocidos, considerándose como el 100 % la cantidad de 25 fríjoles, y el tiempo en el cual la barra atravesó la semilla. El tiempo de cocción se calculó, de estas gráficas,

cuando el 50 % del lote de semillas se cocinó (TC_{50}). Para obtener resultados con una buena reproducibilidad, se realizó la prueba tres veces de manera independiente.

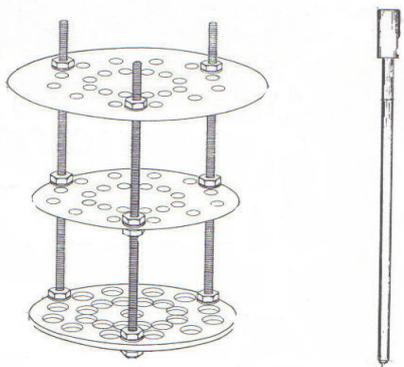


Figura 5. Cocinador Marston. Adaptado de Jackson y Varriano-Marston (1981).

Aislamiento de pared celular

En un matraz protegido de la luz se colocó un gramo de harina de cotiledón (de los distintos cultivares y sus condiciones) y se le adicionaron 50 mL de una disolución amortiguadora de fosfatos 0.08 M, pH 6.0 (J. T. Baker). Inmediatamente después se adicionaron 0.10 mL de α -amilasa termoestable (A 3306 Sigma). La mezcla se colocó en un baño con agua hirviendo y una vez que la temperatura en el interior del medio alcanzó los 95 °C se incubó durante 30 minutos. Al término de la incubación, la suspensión se dejó enfriar a temperatura ambiente, y posteriormente se centrifugó a 7000 rpm (Centrifuga Sorvall RC 5B; Rotor serie SS-34)¹ por 20 minutos. Tras separar la pastilla del sobrenadante, ésta se resuspendió en 50 mL de disolución amortiguadora de fosfatos 0.08 M, pH 7.5, y se le adiciono 0.10 mL de una disolución de proteasa (P 3910 Sigma) a una concentración de 50 mg / mL. La mezcla se incubó a 60 °C durante 30 minutos, después de que en su interior se alcanzara dicha temperatura. Al término de la incubación la suspensión se centrifugó a 8000 rpm por 20 minutos. La pastilla

¹ Misma centrifuga utilizada durante toda la etapa del aislamiento y fraccionamiento de pared celular.

obtenida se lavó con agua desionizada con la finalidad de eliminar el exceso de proteasa.

La pastilla lavada se suspendió en 50 mL de disolución amortiguadora de fosfatos 0.08 M, pH 4.0 y se le adicionaron 0.10 mL de amiloglucosidasa (A9913 Sigma), en un sistema protegido por la luz con agitación continua. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 60 °C. Ya enfriada, la suspensión se centrifugó a 8000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se desechó y a la pastilla recuperada se le realizaron una serie de lavados sucesivos con agua desionizada, acetona (J. T. Baker) y una mezcla de metanol-cloroformo 1:1 v/v (Quezada, 2005; Sigma, 2008). El residuo corresponde a una fracción rica en paredes celulares, las cuales se colocaron en un desecador al vacío hasta alcanzar peso constante.

Fraccionamiento de pared celular

A la cantidad obtenida de pared celular se le agregaron (partiendo de un gramo de cotiledón) 10 mL de una mezcla de solución amortiguadora de 50 mM de acetato de sodio, con 50 mM de CDTA a pH 6.5. La suspensión se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente y más tarde se centrifugó a 11,000 rpm durante 15 minutos, obteniéndose una pastilla o fracción de pared celular despectinizada.

La pastilla a continuación se trató con 10 mL de hidróxido de sodio 4.0 M conteniendo 3 mg / mL de borohidruro de sodio (Lajolo y Shiga, 2003), bajo una atmósfera de nitrógeno, dejándola en agitación constante durante 16 horas a temperatura ambiente. En seguida, a la mezcla se le ajustó el pH a 5.0 con ácido acético glacial y se procedió

a centrifugar a 11,000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se separó de la pastilla y ambos se conservaron.

El sobrenadante se sometió a una precipitación con etanol al 80% durante 10 horas a 4 °C, obteniéndose así la fracción correspondiente a las hemicelulosas, mientras que la pastilla obtenida tras el tratamiento con hidróxido de sodio, constituye la fracción de celulosa (Lajolo y Shiga, 2003).

La fracción correspondiente a hemicelulosa (alrededor de 40 mg), se resuspendió en 5 mL de una solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1 M, pH 7, (Sigma), conteniendo 0.02% de azida de sodio y tratada dos veces con 26 unidades de α -amilasa de páncreas de porcino (A 6255 Sigma) durante 24 horas para eliminar el almidón remanente (Brummell y Labavitch, 2004). Al término del tratamiento, la mezcla se precipitó con etanol al 80%, para volver a obtener la fracción de hemicelulosa ya libre de almidón, que posteriormente será utilizada para conocer la composición química de azúcares por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y después obtener el patrón de distribución de pesos moleculares.

Identificación de los azúcares presentes en la fracción de hemicelulosa por (HPLC)

Con el propósito de determinar la composición de azúcares en las diferentes muestras, se pesaron de 2 a 3 mg de hemicelulosas que fueron puestas en tubos cónicos y disueltas en 850 μ L de agua desionizada, para más tarde ser tratadas con 150 μ L de ácido trifluoroacético (J. T. Baker) y sometidas a el proceso de hidrólisis. Éste consta de un calentamiento constante a 120 °C durante dos horas (Fry, 1988). Al término de la

hidrólisis el ácido se evaporó con una corriente de nitrógeno gaseoso y los residuos lavados sucesivamente con isopropanol (J. T. Baker), con el propósito de obtener un pH entre 4 o 5. El isopropanol se evaporó de manera similar con la ayuda de la corriente de nitrógeno. Con el pH ajustado y estando los residuos secos, la muestra se resuspendió en una mezcla de agua-acetonitrilo con un volumen final de 500 μ L, en una proporción 60:40 y se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos (Eliasson, 2006). El líquido es después filtrado en tubos filtro de poro 0.2 μ m (Alltech), e inyectados en un cromatógrafo con un detector de índice de refracción marca Waters modelo 410, con una columna de 4.6 mm X 25 cm, con una fase estacionaria de Supelcosil LC-NH₂ y una fase móvil isocrática de acetonitrilo: agua (85:15) a una temperatura de trabajo entre 35 y 40 °C y un flujo de 1.2 mL / min. Para obtener resultados con una buena reproducibilidad, la prueba se hizo por triplicado.

Determinación de ácidos urónicos

Para conocer el contenido de ácidos urónicos en las muestras que fueron sometidas a hidrólisis, se empleó el método colorimétrico descrito por Blumenkrantz y Asboe-Hansen (1973).

Se tomó un volumen no mayor a 400 μ L de la muestra (tres repeticiones por cada una), se adicionó agua desionizada cbp 400 μ L. Luego se agregó 2.4 mL de una disolución de tetraborato de sodio 0.0125 M (Carlo-Erba), en ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente la mezcla se hirvió durante 5 minutos, luego se enfrió en agua con hielo por un minuto y se le añadió al blanco 40 μ L de NaOH al 5% (p/v); mientras a las muestras se les agregó 40 μ L de o-hidroxidifenil al 0.15% (p/v). Se dejó reposar a todas las reacciones 30 minutos a temperatura ambiente, con agitaciones cada 10 minutos. Al

término se leyó a una longitud de onda de 520 nm en un espectrofotómetro Sequia Turner, Modelo 340. El contenido de ácidos urónicos en las muestras se obtuvo a partir de la ecuación de la recta de una curva estándar de una disolución de ácido galacturónico (Sigma) dentro de un intervalo de entre 0-100 µg.

Separación de la testa y el eje embrionario

Con la finalidad de utilizar únicamente los cotiledones, a las semillas de ambos lotes se les removió, con ayuda de navaja de un solo filo y pinzas, la testa o cubierta exterior de la semilla y el eje embrionario.

Extracción de hidrolasas de pared celular

El procedimiento que se utilizó para la preparación de los extractos enzimáticos fue una modificación del propuesto por Suda et al. (2003). Se utilizó un gramo de cotiledones, tanto de semillas con y sin remojo que fueron pulverizadas con nitrógeno líquido (de manera separada) con la ayuda de un mortero con pistilo. A la harina, o a la pasta obtenida para cada caso, se le adicionaron 15 mL de una disolución amortiguadora de acetato de sodio (J. T. Baker) 0.05 M, pH 5.0, conteniendo 0.4 M de cloruro de sodio (J. T. Baker) y 0.02% de azida de sodio (Eastman Kodak). El homogenizado obtenido se colocó en un matraz de 250 mL y se mantuvo en agitación durante dos horas a una temperatura de 4 °C.

Transcurrido este tiempo, el extracto se centrifugó a 7000 rpm durante 15 minutos a la temperatura de 4 °C (Centrifuga Sorvall RC 5C; Rotor serie SS-34)². Se separó la

² Misma centrifuga utilizada durante toda la etapa de extracción de hidrolasas de pared celular.

pastilla del sobrenadante, conservando únicamente la pastilla, y a ésta se le resuspendió en otros 15 mL de amortiguador de acetato de sodio 0.05 M, pH 5.0, conteniendo cloruro de sodio 0.4 M y 0.02% de azida de sodio. De la misma manera, este extracto se mantuvo en agitación durante dos horas a 4 °C y se centrifugó a 7000 rpm, por 15 minutos. La pastilla se desechó y el sobrenadante de esta re-extracción se dializó en tubos para diálisis Spectra/Por® 6, MWCO 1000 Da de Spectrum®, 10 mL de sobrenadante de re-extracción se dializaron con un litro de disolución amortiguadora de acetato de sodio 0.05 M, pH 5.0, durante 24 horas. Después de la diálisis, el extracto se centrifugó a 7000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, obteniéndose un extracto de enzimas de pared celular parcialmente purificado, que se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso.

Con la diálisis, las globulinas se precipitaron por cambios en la concentración de sal en el medio, lográndose obtener un extracto parcialmente purificado que contenía principalmente albúminas, enzimas dentro de las que podemos considerar se encuentran las hemicelulasas. Se realizaron estudios previos para demostrar que la actividad de hemicelulasas no se detecta en el primer extracto salino.

Cuantificación de las proteínas de pared celular

Método de Lowry

Para expresar la actividad de las hemicelulasas como actividad específica, se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Lowry. En tubos de ensaye de 12 x 13 mm se colocaron 0.2 mL del extracto enzimático de frijol, ya fuese remojado o seco (por separado) y 1 mL de disolución C, la que es una mezcla de una disolución A,

(conteniendo carbonato de sodio al 2%, hidróxido de sodio 0.4%, tartrato de potasio 0.16% y SDS 1%) y una disolución B, (conteniendo sulfato de cobre al 4%) en una proporción 100:1 y 0.15 mL de agua desionizada. Después de 10 minutos se adicionó 0.1 mL de reactivo de Folin (Sigma). Tras la agitación de la mezcla, ésta se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente para desarrollar color. Se leyó a una longitud de onda de 660 nm, en un espectrofotómetro LKB Biochrom Ultrospec II. El contenido de proteína en los diferentes extractos se obtuvo con la ecuación de la recta de una curva estándar, la cual fue elaborada con una disolución de seroalbúmina de bovino (A4503, Sigma), dentro de un intervalo de 0-100 µg. (Pacheco, 2003).

Preparación de los ensayos enzimáticos para la identificación de actividades de hemicelulasas presentes en la pared celular de diversos cultivares de frijol

Las distintas reacciones enzimáticas se efectuaron para cada extracto y de manera separada como a continuación se refiere: en los ensayos enzimáticos de xilanasas, xiloglucanasa y arabinoxilanasas se mezcló el contenido de 380 µL de extracto enzimático con 620 µL de los respectivos sustratos, Xilano de Avena 1.2 % (Sigma), Xiloglucano 0.5% y Arabinoxilano 1% (Megazyme), en una disolución amortiguadora de acetato de sodio 0.05 M, pH 5, con cloruro de sodio 0.1 M y azida de sodio 0.02% (Suda et al., 2003). Las diferentes muestras se incubaron a 38 °C durante 6 horas. Transcurrido este tiempo, con la finalidad de detener las reacciones, las muestras se transfirieron a un baño con agua a ebullición durante 15 minutos. Se usó como control la misma mezcla de reacción, sólo que ésta fue sometida inmediatamente a ebullición

durante 15 minutos antes del periodo de incubación. El poder reductor producido en los diferentes ensayos se determinó por el método de Nelson-Somogyi (Nelson, 1944; Suda et al., 2003) como medida de la actividad enzimática.

Actividad de endo hemicelulasas

La medición de esta actividad se realizó por pérdida en viscosidad, para los diferentes extractos enzimáticos (Suda et al., 2003), utilizando el sustrato xiloglucano, ya que su disolución al 0.5% proporciona características de viscosidad que pueden ser analizadas y así conocer de manera indirecta la probable presencia de enzimas hidrolíticas tipo “endo”. Para ello, las reacciones se prepararon mezclando 3.8 mL de extracto enzimático en 6.2 mL de xiloglucano al 0.5% (Megazyme), en una disolución amortiguadora de acetato de sodio 0.05 M, pH 5.0, conteniendo además cloruro de sodio 0.1 M y azida de sodio al 0.02%. Las reacciones, preparadas por separado y para cada extracto, se incubaron a 38 °C durante 6 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, las mezclas de reacción se transfirieron a un baño de agua a ebullición durante 15 minutos con el fin de detener las reacciones.

Como control se realizó la misma mezcla de reacción para cada extracto sólo que de manera inmediata, y previamente a la incubación, el medio se colocó en un baño con agua a ebullición durante 15 minutos con el fin de desnaturalizar la enzima.

Posteriormente la viscosidad de las reacciones y sus respectivos controles se determinaron en un viscosímetro de Ostwald, en el cual se midió por triplicado, el tiempo en segundos que tarda en pasar un líquido de un punto a otro; como se puede ver en la Figura 6, en las líneas marcadas como A y B.

Con la ayuda de la siguiente relación se puede obtener la viscosidad relativa de una sustancia expresada en centipoases (cP) (Torreblanca et al., 1999).

$$\eta = \kappa \rho t$$

Donde:

η = Viscosidad en cP

κ = Constante del viscosímetro, obtenida a partir de un líquido conocido.

t = Tiempo que tarda en pasar el líquido de un punto al otro.

Con el valor de la viscosidad de los ensayos, se hace la conversión a unidades arbitrarias (UA), donde $1UA = 1\Delta cP/24 h$.

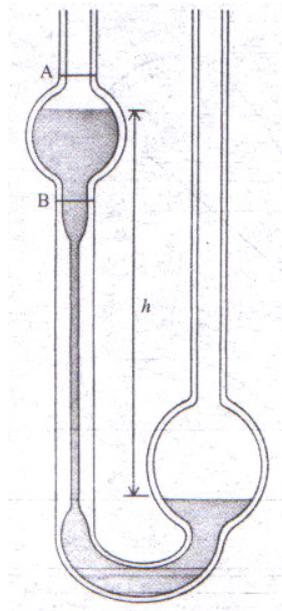


Figura 6. Viscosímetro de Oswald. Tomado de Levine (2004).

Determinación de azúcares reductores por el método de Nelson-Somogyi

Se determinó la cantidad de azúcares reductores producidos en cada una de las mezclas de reacción, como medida de la actividad de hemicelulasas tipo “exo” (Suda, 2003) de acuerdo a distintas modificaciones propuestas en Nelson (1944).

En varias series de tubos de ensaye de 12 x 13 mm (para cada muestra por triplicado), se colocaron 0.5 mL de la mezcla de reacción de los ensayos enzimáticos, y 0.5 mL de reactivo cúprico alcalino; tras una vigorosa agitación, los tubos se colocaron dentro de un baño de agua a ebullición durante 10 minutos. Después, los tubos se retiraron del calor y se transfirieron a un baño con hielo. Enseguida se adicionaron a los tubos 0.5 mL de reactivo de arsenomolibdato y 1 mL de agua desionizada. Tras un periodo de agitación y en ciertos casos de centrifugación, el contenido de los tubos se leyó a una longitud de onda de 520 nm en un espectrofotómetro LKB Biochrom Ultrospec II. El contenido de azúcares reductores de las muestras se obtuvo de la ecuación de la recta de una curva estándar hecha a partir de una disolución de glucosa (Sigma) dentro de un intervalo de 0-100 µg.

Los reactivos cúprico alcalino y de arsenomolibdato se prepararon como a continuación se describe:

Reactivo cúprico alcalino. Se prepara justo antes de su uso y es la mezcla de 24 partes de la disolución A y una parte de la disolución B.

Reactivo A; para 100 mL, se disuelven y aforan en agua al volumen correspondiente: 2.5 g de carbonato de sodio, 2.5 g de tartrato doble de sodio y potasio, y 2.5 g de bicarbonato de sodio, además de 20 g de sulfato de cobre.

Reactivo B; para 50 mL se disuelven en agua 7.5 g de sulfato de cobre y 25 µL de ácido sulfúrico concentrado.

Reactivo de arsenomolibdato. Para 100 mL, se disuelven 5 g de molibdato de amonio junto con 4.2 mL de ácido sulfúrico concentrado y 5 mL de una disolución de

ortoarsenato disódico al 12%; mezclar y antes de ajustar el volumen la disolución se incubó a 37 °C en un periodo de entre 24 a 48 horas.

Cromatografía de filtración en gel de hemicelulosas

Para conocer la distribución de pesos moleculares correspondientes a la fracción de hemicelulosas, se usó el gel Sepharose CL-6B (Sigma), del cual se tomó un volumen de aproximadamente 50 mL y se le adicionaron 150 mL de agua desionizada. Se mezcló cuidadosamente hasta formar una suspensión, la que después se dejó reposar diez minutos. Al gel parcialmente sedimentado se le eliminó el agua de lavado con una pipeta conectada a una trampa de vacío, con la finalidad de eliminar aquellas partículas de tamaño más pequeño. Tras dos series de lavados, el gel se empacó en una columna (Biorad) de 1.5 x 40 cm, que fue colocada en posición vertical y cerrada por la parte de abajo. Posteriormente se llenó con agua desionizada hasta un poco más de la mitad de su capacidad y se procedió a vaciar el gel suspendido en agua e introducido a diversos intervalos de tiempo dentro de la columna, procurando que éste no se sedimentara, con ayuda de un agitador de vidrio, evitando así la formación de estratos (Determann, 1968). Al término del empacado se equilibró el gel lavando la columna con tres volúmenes de hidróxido de sodio 0.1 M (Brummell y Labavitch, 2004; Sigma, 2008).

Se estimó el volumen externo (V_0) al pasar por la columna 0.5 mL de una disolución de azul de dextrana (Sigma) a una concentración de 1 mg / mL, la cual se eluyó con una disolución de hidróxido de sodio 0.1 M. Se colectaron fracciones de aproximadamente 1.55 mL (42 gotas) y cada fracción se leyó a una longitud de onda de 620 nm en un espectrofotómetro LKB Biochrom Ultrospec II.

La calibración de la columna se hizo utilizando dextranas de diferente peso molecular. Las dextranas utilizadas fueron respectivamente de 500 kDa, 200 kDa y 70kDa (Fluka). Se preparó una disolución de cada una de las dextranas a una concentración de 1 mg / mL, tomando por separado 0.5 mL de cada disolución y filtrándolas a través de la columna. Se colectaron para cada dextrana fracciones de aproximadamente 1.55 mL. Posteriormente a cada una de las fracciones se le determinó el contenido de azúcares totales por el método de Fenol-Sulfúrico (Dubois et al., 1956). Para obtener la distribución de pesos moleculares de las diferentes muestras, se realizaron disoluciones de las hemicelulosas aisladas de los cultivares, cada una por separado, a una concentración de 1 mg / mL, tomando respectivamente 0.5 mL, filtrando por la columna y eluyendo con hidróxido de sodio 0.1 M. De igual manera, a las fracciones colectadas se les determinaron azúcares totales por el método de Fenol-Sulfúrico como se explica a continuación.

Cuantificación de azúcares totales

Para el análisis de cada una de las fracciones obtenidas tras la cromatografía de filtración en gel, se utilizó el método de determinación de azúcares totales (Dubois et al., 1956).

De cada fracción obtenida tras la filtración en la columna, se tomó un volumen de 500 μ L (triplicados para cada muestra obtenidos tras filtraciones independientes en la columna), a los que se agregaron 300 μ L de fenol acuoso al 5% (J. T. Baker); la mezcla se agitó y se añadieron 1.8 mL de ácido sulfúrico concentrado (Mallinckrodt). La mezcla de reacción se volvió a agitar y se dejó reposar durante diez minutos a temperatura

ambiente. El color desarrollado se leyó a una longitud de onda de 485 nm en un espectrofotómetro Sequia Turner, Modelo 340. El contenido de azúcares totales en las muestras se obtuvo a partir de una curva estándar de una solución de glucosa (Sigma) dentro de un intervalo de 0-50 μg .

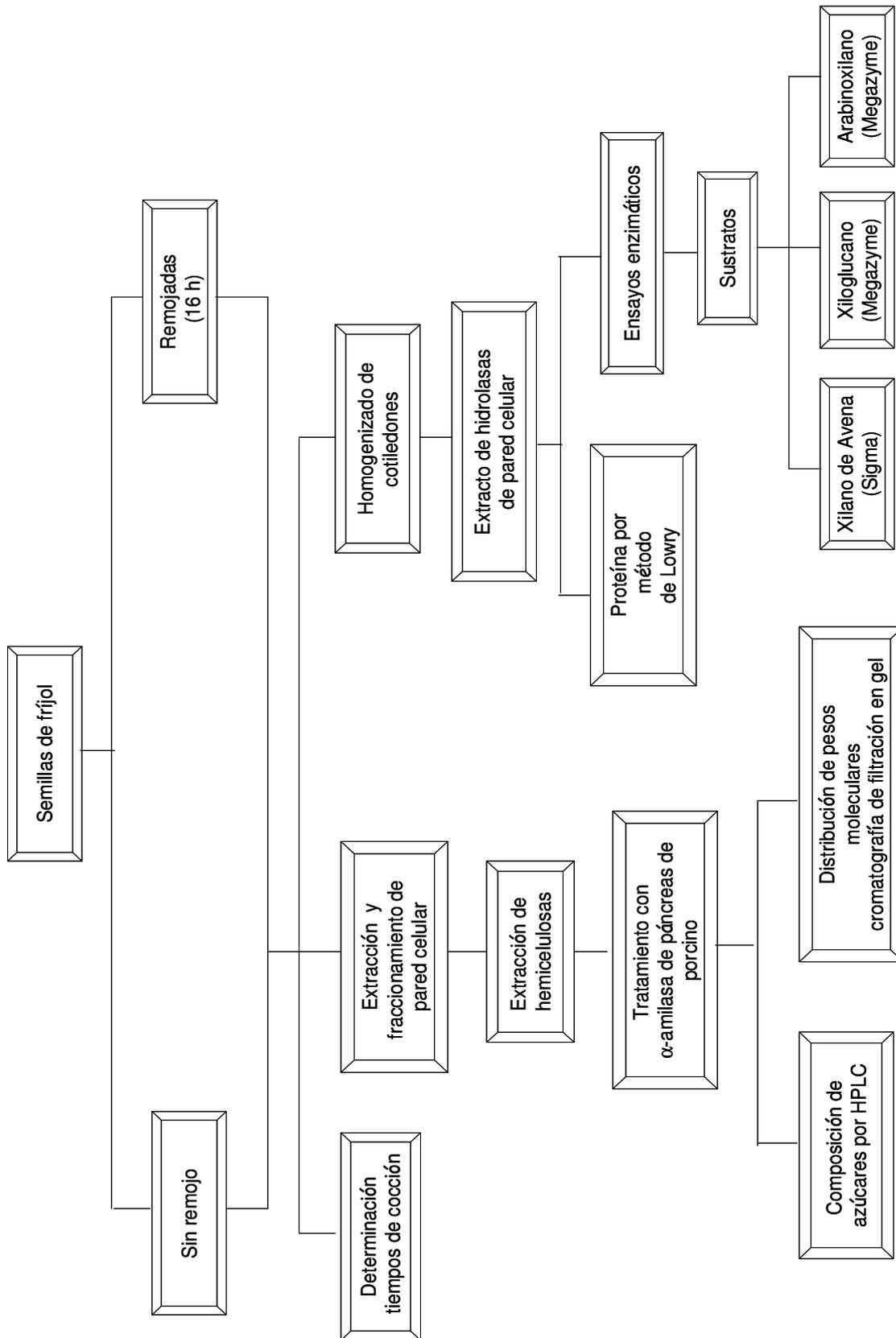


Figura 7. Metodología empleada con las semillas de frijol con y sin remojo, durante la realización de este trabajo.

RESULTADOS

Determinación del tiempo de cocción

Este parámetro fue evaluado con el fin de determinar el efecto del remojo sobre el tiempo de cocción de las semillas de frijol. En general, las semillas remojadas presentaron menor tiempo de cocción que las semillas secas. La disminución fue estadísticamente significativa y cultivar dependiente (Tabla 3).

Tabla 3. Tiempo de cocción para las diversas variedades de frijol.

Tiempo de cocción* (min.)		
Cultivar	Semilla seca	Semilla remojada
Flor de Mayo	107.0 ± 12.4 ^a	49.3 ± 3.5 ^b
2626	117.3 ± 5.1 ^a	67.3 ± 2.1 ^b
Bayo Mecentral	95.4 ± 2.5 ^a	72 ± 5.0 ^b

*Los números representan la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas ($p=0.05$)

El tiempo de cocción de la semilla remojada del cultivar Flor de Mayo fue 2.1 veces menor que el registrado para la semilla sin remojar. Mientras que para los cultivares 2626 y Bayo Mecentral esta disminución fue de 1.7 y 1.3 veces, respectivamente.

Identificación de los polisacáridos de hemicelulosa de frijol

La identificación y cuantificación de los azúcares presentes en la fracción de hemicelulosa permite establecer la composición química de esta fracción y por ende predecir el tipo de polisacáridos de la pared celular. Con esta finalidad se hidrolizó químicamente la fracción de hemicelulosa extraída de paredes celulares provenientes

de cotiledones con y sin remojo. Los azúcares se separaron, identificaron y cuantificaron por HPLC (Tabla 4).

Tabla 4. Composición de azúcares provenientes de la fracción de hemicelulosa para distintos cultivares de frijol.

	µg de azúcar/mg de hemicelulosa*					
	Flor de Mayo		2626		Bayo Mecentral	
	Seco	Remojado	Seco	Remojado	Seco	Remojado
Ramnosa	ND**	ND	ND	40	ND	ND
Xilosa	142 ^a	133 ^a	174 ^a	139 ^b	139 ^a	143 ^a
Arabinosa	343 ^a	438 ^b	490 ^a	411 ^b	467 ^a	455 ^a
Glucosa	145 ^a	111 ^b	109 ^a	135 ^a	117 ^a	125 ^a
Ácidos urónicos	13.0 ^a	8.9 ^b	11.0 ^a	12.4 ^b	7.5 ^a	8.2 ^a

*El resultado indicado es la media de tres experimentos independientes.

**ND. No detectable

Letras diferentes entre tratamientos indican diferencia significativa ($p=0.05$)

La composición química de la fracción de hemicelulosa, para todos los cultivares, fue rica en azúcares neutros y de manera especial en arabinosa. En menor cantidad se detectó la presencia de xilosa, y glucosa (Tabla 4). Este resultado concuerda con lo obtenido por Shiga et al. (2006) para la composición de la fracción de hemicelulosa obtenida de frijoles Carioca-Pérola.

Por otro lado, destaca la variedad 2626 sometida a remojo, por ser la única en la que se detectó ramnosa.

Cabe aclarar que además de estos azúcares también se detectó la presencia de ácidos urónicos, proteína y agua fuertemente unida al polímero, con lo que puede explicarse que el total de los azúcares extraídos sea de aproximadamente un 70%.

Extracción y cuantificación de proteínas de pared celular

La abundancia de las proteínas en la pared celular de los cotiledones de frijol es de 1-5% del peso seco de esta estructura (Cosgrove, 1997). Estas proteínas desempeñan dos funciones: estructural y enzimática, siendo estas últimas las encargadas de la remodelación de la pared celular durante el crecimiento del cotiledón (Cosgrove, 1997). Su función es hidrolizar y re-sintetizar los polisacáridos de la pared celular y se encuentran unidas a pared celular por enlaces iónicos (Brett y Waldron, 1990). Para su extracción del tejido se utilizan disoluciones de alta fuerza iónica (NaCl 0.4 M). Debido a que los cotiledones son ricos en globulinas, y estas proteínas de reserva también son solubles en soluciones acuosas de alta fuerza iónica (Duranti, 2006), la extracción de enzimas remodeladoras de pared celular (ERPC) arrastra una gran cantidad de globulinas. Con la finalidad de eliminar dicha contaminación, el extracto de ERPC se dializó exhaustivamente con amortiguador de baja fuerza iónica. Mediante este tratamiento, las globulinas se precipitaron en el tubo de diálisis, por lo que el sobrenadante se consideró la fracción enriquecida en ERPC.

Tras dicha extracción y cuantificación, la proteína presente en los extractos de ERPC de los cultivares Flor de Mayo y 2626 fue significativamente menor en los cotiledones de las semillas remojadas que en los de las semillas secas (Tabla 5).

La disminución en la cantidad de proteína tras el remojo puede ser un reflejo de los cambios que dicho tratamiento causa en el material biológico, ya que el incremento en el contenido de agua de la semilla conduce a la activación del metabolismo y por ende a la utilización de las proteínas de reserva.

Tabla 5. Proteína en el extracto enzimático obtenido de diversos cultivares de frijol.

Cantidad de proteína* (mg de proteína /g de frijol)		
Variedad	Semilla seca	Semilla remojada
Flor de Mayo	8.4 ± 0.3 ^a	5.6 ± 0.4 ^b
2626	9.6 ± 0.3 ^a	7.8 ± 0.3 ^b
Bayo Mecentral	7.4 ± 1.1 ^a	6.1 ± 0.2 ^a

* Los números representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Letras diferentes entre tratamientos indican diferencia significativa (p=0.05)

Identificación actividades enzimáticas presentes en la pared celular de diversos cultivares de frijol

Con la finalidad de verificar la presencia de hemicelulasas en la pared celular de cotiledones de frijol, se determinó la actividad de estas enzimas en los extractos de ERPC desalados obtenidos de los cotiledones de semillas secas y remojadas. Diversos polisacáridos del grupo de las hemicelulosas se utilizaron como sustratos. Las tres enzimas detectadas fueron xilanasas, xiloglucanasas y arabinoxilanasas. En los tres cultivares, la actividad específica de la xilanasas se incrementó por efecto del remojo (Tabla 6). Este incremento fue mayor en los cultivares 2626 y Bayo Mecentral (68 %) que en el cultivar Flor de Mayo (16 %).

Tabla 6. Actividad de Xilanasas

Actividad Específica* (µg reductores/mg proteína/h)		
Cultivar	Semilla seca	Semilla remojada
Flor de Mayo	13.2 ± 1.4 ^a	15.9 ± 0.8 ^a
2626	9.5 ± 1.4 ^a	15.8 ± 1.3 ^b
Bayo Mecentral	10.4 ± 3.1 ^a	17.5 ± 2.2 ^b

* Los números representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencia significativa (p=0.05)

En el caso de la xiloglucanasa, el remojo de la semilla incrementó su actividad sólo en los cultivares Flor de Mayo y 2626, mientras que no modificó la actividad presente en la semilla de Bayo Mecentral (Tabla 7).

Tabla 7. Actividad de Xiloglucanasa

Actividad Específica* (μg reductores/mg proteína/h)		
Cultivar	Semilla seca	Semilla remojada
Flor de Mayo	9.2 ± 0.4^a	18.0 ± 1.4^b
2626	9.7 ± 2.4^a	12.8 ± 1.7^a
Bayo Mecentral	10.8 ± 0.5^a	10.3 ± 1.1^a

* Los números representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.
Letras diferentes entre tratamientos indican diferencia significativa ($p=0.05$)

En general, la actividad de la arabinoxilanasas fue 10 veces mayor que la de las otras dos hidrolasas y, al igual que en las dos hidrolasas antes detectadas, el remojo de las semillas de los cultivares Flor de Mayo y 2626 incrementó su actividad. Sorprendentemente, en el cultivar Bayo Mecentral el mismo tratamiento disminuyó la actividad de esta enzima en un 21 % (Tabla 8).

Tabla 8. Arabinoxilanasas

Actividad Específica* (μg reductores/mg proteína/h)		
Cultivar	Semilla seca	Semilla remojada
Flor de Mayo	92.5 ± 2.2^a	115.2 ± 3.5^b
2626	100.2 ± 3.3^a	137.0 ± 2.1^b
Bayo Mecentral	146.3 ± 3.3^a	116.6 ± 5.9^b

* Los números representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.
Letras diferentes entre tratamientos indican diferencia significativa ($p=0.05$)

Actividad de endo hemicelulasas

La única actividad encontrada de enzimas tipo endo es la que se expresa como endoxiloglucanasa y/o endoglucanasa (endoXG/endoGasa), ya que en el extracto crudo puede haber presencia de una o de ambas enzimas, y el xiloglucano es un buen sustrato para ambas (Fry, 1988; Chanliaud et al., 2004; Minic y Jouanin, 2006).

En la Tabla 9 se puede observar un incremento de esta actividad para el cultivar Flor de Mayo sometido al remojo de aproximadamente nueve veces con respecto a su similar seco. Sin embargo, para los cultivares 2626 y Bayo Mecentral, aparentemente el remojo no está incrementando la actividad de dicha enzima.

Tabla 9. Endoxiloglucanasa

Unidades arbitrarias (UA)*		
Variedad	Semilla seca	Semilla remojada
Flor de Mayo	0.9	7.8
2626	5.2	4.2
Bayo Mecentral	7.1	6.9

*Donde 1 UA = 1 Δ cP/ 24h

Los valores presentados son la media de tres determinaciones independientes.

Patrón de distribución de pesos moleculares de la hemicelulosa

Para demostrar que las enzimas detectadas en la pared celular del cotiledón eran activas "in muro" se compararon los pesos moleculares de los polisacáridos presentes en la fracción de hemicelulosa, obtenidos de paredes celulares aisladas de cotiledones de semillas remojadas y no remojadas. En la Figura 8 se muestra que el remojo de las semillas, independientemente del cultivar, modificó ligeramente el patrón de distribución de pesos moleculares de los polisacáridos. En las Figuras 8B y 8C, que muestran los resultados de la cromatografía de filtración de los polisacáridos extraídos de los

cultivares 2626 y Bayo Mecentral, claramente se observa que el remojo de la semilla desplazó el patrón de distribución de pesos moleculares hacia la derecha del cromatograma, indicando que los polisacáridos de menor peso molecular incrementaron y los de alto peso molecular disminuyeron, por efecto del tratamiento. En el caso del cultivar Flor de Mayo (Figura 8A), los polisacáridos de alto peso molecular extraídos de semillas no remojadas, disminuyeron discretamente respecto de los obtenidos de semillas remojadas aunque en este último tratamiento, se incrementó la abundancia de polisacáridos de muy bajo peso molecular (Figura 8A). Este incremento en la abundancia de polisacáridos de menor peso molecular en la fracción de hemicelulosa extraída de cotiledones remojados, respecto a los no remojados, se interpretó como el resultado de la acción “in muro” de enzimas remodeladoras de pared celular.

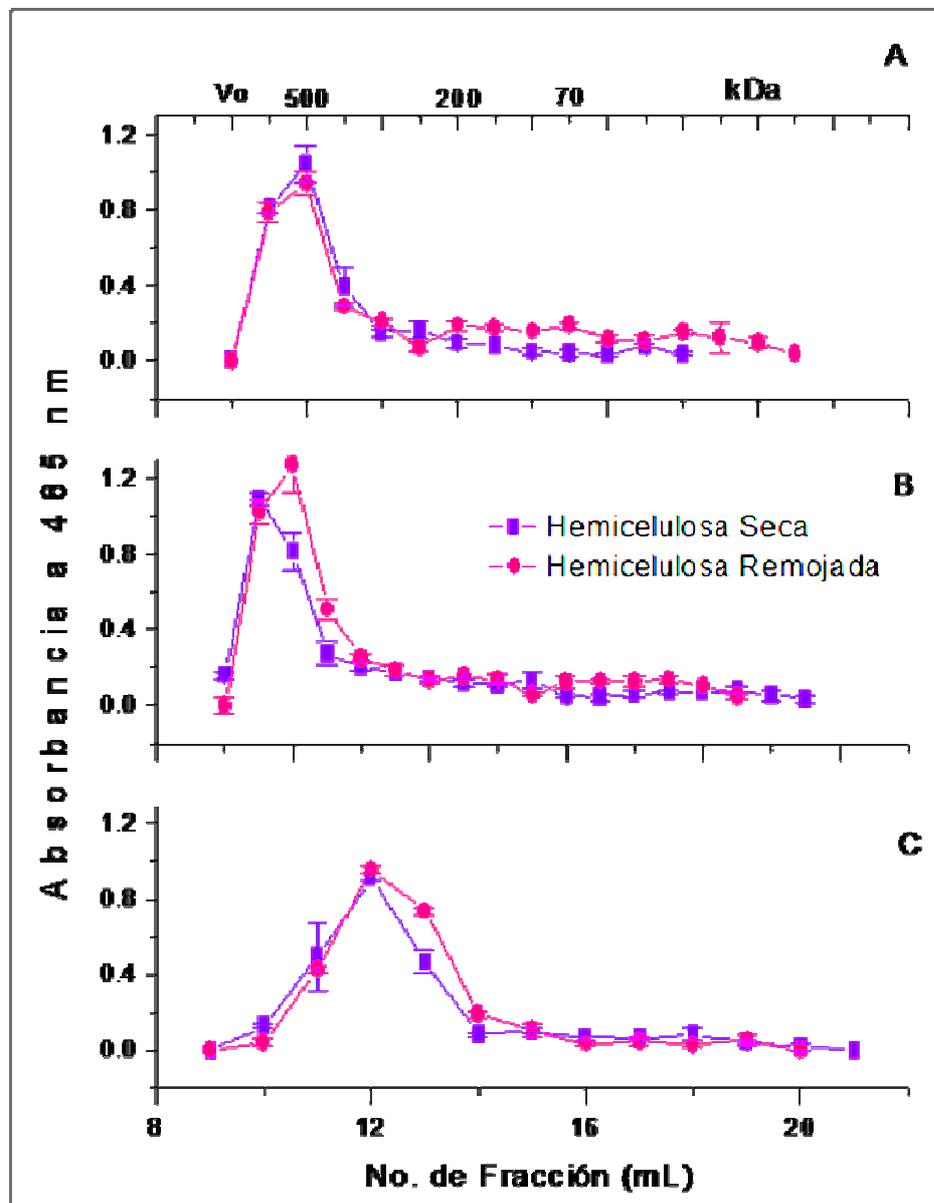


Figura 8. Distribución de pesos moleculares de hemicelulosa para semillas secas y remojadas de los cultivares Flor de Mayo (A), 2626 (B), y Bayo Mecentral (C). En todos los casos, la separación se realizó por cromatografía de filtración en gel, utilizando una columna de Sepharose CL-6B y las fracciones colectadas se analizaron por el método de determinación de azúcares totales (Dubois et al., 1956). Los ordenes de elución de los estándares de pesos moleculares y el volumen externo ($V_0=2000$ kDa), se muestran arriba. Cada punto en la figura corresponde a la media de tres determinaciones independientes.

DISCUSIÓN

En muchos trabajos se ha reportado que el remojo previo a la cocción de la semilla de fríjol disminuye su tiempo de cocción (Silva et al., 1981; Blancas, 2001; Carmona et al., 2007). Sin embargo, en ningún caso se han descrito, ni propuesto, las bases moleculares de este efecto. Uno de los objetivos de nuestro grupo de investigación es el de contribuir al conocimiento de dichas bases y para ello se ha desarrollado este trabajo.

Los diferentes cultivares de semillas estudiadas sometidas a remojo redujeron significativamente su tiempo de cocción con respecto a las semillas secas (Tabla 3). Esto indica que el solo proceso de remojo produce cambios que permiten tener una semilla de más fácil cocción. Dichos cambios comienzan a darse justo después del momento en el que se ha puesto al grano en contacto con el agua, pues la semilla de fríjol, como cualquier otra, inicia su hidratación, y con ello el proceso que se conoce como la fase I de la germinación (Bewley, 1997) en donde la cantidad de agua absorbida se incrementa rápidamente, induciendo la expansión y rearreglo de sus paredes celulares que antes se encontraban contraídas. También durante esta fase se realiza el escape de solutos y metabolitos de bajo peso molecular, la reactivación de enzimas y posteriormente el metabolismo de la semilla (Bewley, 1997).

El hecho de que la pared entre en un proceso de rearreglo, implica modificaciones a nivel de su estructura, es decir a nivel de los principales polisacáridos de los que está constituida, o sea de pectinas, hemicelulosas y celulosas. Modificaciones similares se han observado durante el proceso de maduración de frutas (Goulao et

al., 2007), y en este caso conducen a una disminución de la dureza del tejido vegetal. Los cambios en el peso molecular y la composición de los principales polisacáridos de la pared celular durante la germinación o la maduración de frutos son debidos a varias familias de enzimas hidrolíticas (Goulao et al., 2007). Estas modificaciones resultan en un nuevo patrón de interacción de toda la red de polisacáridos, modificando la arquitectura de la pared y por tanto sus propiedades (Goulao y Oliveira, 2008). Por lo anterior, el hecho de que diversas hemicelulasas estén presentes en la pared celular, y se activen por efecto del remojo de la semilla, sugiere que la fracción de hemicelulosas constituye uno de los estratos de la pared celular que puede ser modificado durante el remojo de la semilla y que esta modificación facilita la cocción del fríjol. Que las hemicelulasas actúan “in muro” durante el remojo de la semilla lo demuestra el hecho de que en los cultivares 2626 y Bayo Mecentral el promedio de pesos moleculares de la fracción de hemicelulosas fue menor en las semillas remojadas que en sus respectivos controles. La disminución en peso molecular promedio de las hemicelulosas fue menor en Bayo Mecentral que en 2626, lo que concuerda con el hecho de que el efecto benéfico del remojo en el tiempo de cocción fue menor para Bayo Mecentral (1.3 veces) que para 2626 (1.7 veces). En contraste, en el cultivar Flor de Mayo la disminución en el peso molecular promedio de las hemicelulosas fue poco. Sin embargo, el efecto benéfico del remojo fue mayor (2.1 veces) que en los cultivares antes mencionados. Estas diferencias podrían ser explicadas por la abundancia y tipo de enzimas presente. En todos los cultivares se detectaron las actividades de endoxiloglucanasa, xiloglucanasa arabinoxilanasa y xilanasa. Sin embargo, llama la atención el hallazgo de que en el cultivar Flor de Mayo tras el remojo existe un incremento de casi 10 veces en la actividad de enzimas tipo endoXG/endoGasa y de casi 2 veces de la

enzima exo-xiloglucanasa (Tablas 9 y 7, respectivamente), mientras que en las semillas 2626 y Bayo Mecentral ocurre algo distinto, pues aunque presentan actividad de estas enzimas su actividad es menor que en el caso de Flor de Mayo. Dado que las actividades enzimáticas en 2626 y Bayo Mecentral sólo se incrementan menos de dos veces, existe la posibilidad de que a estos tiempos de germinación, 16 h, las enzimas no hayan alcanzado su máxima actividad y que los máximos de actividad puedan encontrarse justo al término de la germinación, con la emergencia de la radícula. Por ejemplo, Suda et al. (2003), reporta que una endoglucanasa y una xilanasas aumentan considerablemente su actividad después de 48 horas de haber iniciado la imbibición de semillas de *E. heterophylla*.

Los cambios discretos observados en el patrón de distribución de pesos moleculares aunado a la poca variación de la composición química de las hemicelulosas aisladas de semillas secas y remojadas, indican que la acción de las hemicelulasas sobre los polisacáridos es escasa. También, el hecho de que tras el remojo exista un incremento en azúcares como arabinosa para Flor de Mayo y de glucosa en 2626, además de la sorprendente detección de ramnosa en este último cultivar, puede atribuirse a que la acción previa de enzimas hidrolíticas que actúan sobre pectinas (Martinez, 2003) incrementa la porosidad y con ello la apertura de la pared celular lo cual permite un mayor acceso a los polisacáridos de la matriz (entre éstos hemicelulosas), lo que fue considerado como una mayor extracción de fragmentos de polisacáridos con dichos azúcares, dejándolos más disponibles para más tarde poder ser ocupados como sustratos para otras enzimas remodeladoras de la pared celular (Carpita y McCainn, 2000; Toivonen y Brummell, 2008).

Por otro lado, no es posible saber con certeza la estructura del polisacárido que se está extrayendo con la metodología utilizada en este trabajo. Para ello sería

necesario valerse de otras herramientas como el análisis de carbohidratos por metilación. No obstante, se sabe que en las paredes celulares primarias de dicotiledóneas abundan los xiloglucanos y los glucouronoarabinoxilanos (Capita y McCainn, 2000)

En estudios hechos en soya se ha encontrado que uno de los polisacáridos extraídos de manera similar a lo que nosotros hemos encontrado, consta de un xiloglucano rico en unidades XXXG (Hiusman et al., 2000).

Shiga et al. (2006) también reportan un xiloglucano para frijol Carioca-Pérola rico en estas unidades, además de reportar que dicho polisacárido está acompañado también por un polisacárido rico en arabinosa.

Nuestro polímero presenta una composición de xilosa, arabinosa y glucosa en una proporción aproximada de 1:3:1. Las cantidades similares de xilosa y glucosa pueden ser explicadas por la presencia de un oligomero tipo XXXG. No se esperaba encontrar fucosa dentro de las cadenas de xiloglucano debido a que las semillas de dicotiledóneas carecen de dicho azúcar (Brett y Waldron, 1990; Cosgrove 2006). Por otro lado, la galactosa es otro azúcar que se ha encontrado de manera frecuente en diversos trabajos que han analizado la fracción de hemicelulosas extraídas con NaOH 4.0 M (Talbot y Ray, 1992, Shiga y Lajolo ,2004; Shiga et al., 2006). Su ausencia dentro de nuestro trabajo puede deberse a que la cantidad analizada probablemente no fue suficiente para su detección, por lo que no puede descartarse del todo su presencia en el polímero, aunque su predominio sea menor. Por otra parte la mayor proporción de arabinosa puede deberse a que se presentan en mayor proporción cadenas de arabinanos que se encuentran muy entrecruzadas con un primer dominio de xiloglucanos que están menos asociados con las microfibrillas de celulosa y que también puede llegar a ser extraído con hidróxido de sodio. También,

como ya se ha mencionado, las cantidades pequeñas de ramnosa y ácidos urónicos, nos indican la posible presencia de cantidades traza de RGI (Talbot y Ray, 1992; Hiltz et al., 2007)

En resumen, los resultados indican que existen cambios en la fracción de hemicelulosa para al menos los cultivares 2626 y Bayo Mecentral. Es sabido que pequeños cambios en la arquitectura de los enlaces de los polisacáridos que componen la pared resultan en modificaciones significativas en la firmeza de los alimentos de origen vegetal (Goulao, 2007). Si bien estos cambios no son tan notorios en el cultivar Flor de Mayo, es posible que aún así se haya realizado una modificación enzimática en las hemicelulolasas, que no modifique su peso molecular, pero sí facilite su termosolubilidad. La anterior propuesta se basa en que las modificaciones son un evento cooperativo, es decir que no intervienen únicamente las hemicelulosas, sino también dada la complejidad de la pared celular se ven afectados otros polisacáridos como pectinas hemicelulosas y extensinas (Cosgrove, 2006), e incluso se debe tener en cuenta otro componente importante de la semilla de frijol, que es el almidón, ya que éste constituye una fracción importante de carbohidratos en la semilla.

CONCLUSIONES

- ◆ La composición química en la fracción de hemicelulosas para todos los cultivares fue rica en arabinosa, seguida por cantidades similares de xilosa y glucosa.
- ◆ El remojo no modificó la composición química de las hemicelulosas.
- ◆ En todos los cultivares se detectaron actividades de xiloglucanasa, arabinoxilanasas y xilanasas, y el remojo incrementó en diferentes proporciones la actividad de dichas enzimas.
- ◆ El remojo disminuyó discretamente el peso molecular promedio de la fracción de hemicelulosa en todos los cultivares estudiados.

PERSPECTIVAS

- ◆ Ya que ha sido encontrada actividad de hemicelulasas en los ensayos utilizando sustratos artificiales, se sugiere medir la actividad *in Vitro* de las enzimas presentes en los extractos crudos, utilizando sus propias fracciones de hemicelulosa como sus sustratos.
- ◆ Como las modificaciones dadas a nivel de pared celular son un proceso cooperativo, se propone estudiar a mayor detalle la participación de otras estructuras como el almidón o a las proteínas estructurales conocidas como extensinas, ya que se sabe también juegan un papel importante dentro de los mecanismos reguladores de la arquitectura en pared celular.
- ◆ Debido a que en trabajos previos se han encontrado incrementos en actividades enzimáticas en frijol tras el remojo se propone que en aquellas enzimas cuya actividad y efectos sea de mayor presencia; se identifiquen sus genes para lograr entender los mecanismos por las que son reguladas y así más adelante poder manipular y obtener semillas modificadas cuyo valor agregado sea que posean un tiempo de cocción bajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Allende A. G., Acero G. G., Padilla R J., Mayek P. N. (2006) "Comportamiento agronómico y características fisicoquímicas del grano de frijol en Aguascalientes México". *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29, 1, 89-93.
2. Bennett B. A., Rose J. K. C. (1999). "Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening". *Trends in Plant Science Reviews*, 4, 176-183
3. Bewley J. D. (1997) "Seed Germination and Dormancy" *Plant Cell*, 9, 1055-1066.
4. Blancas V. M. (2001) "Estudio de las modificaciones en la pectina que ocurren durante el remojo de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*)". Tesis Licenciatura, UNAM, Facultad de Química, pp. 3-17.
5. Carmona G. R., Osorio D. P., Agama A. E., Tovar J., Bello P: L. (2007) "Composition and effect of soaking on starch digestibility of *Phaseolus vulgaris* (L.) cv. Mayocoba". *International Journal of Food Science and Technology*, 42,296-302.
6. Brett C., Waldron K. (1990) "Physiology and Biochemistry of Plants Cell Walls". Unwin Hyman. London, England. pp. 4-44.
7. Blumenkrantz y Asboe-Hansen G. (1973). "New method for quantitative determination of uronic acids". *Analytical Biochemistry*, 54, 484-489.
8. Brummell, D. A, Labavitch J. M. (2004) "Cell Wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit". *Journal of Experimental Botany*, 405, 55, 2029-2039.
9. Carpita, N. C., McCann, M. (2000). The Cell Wall. In Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L. (Eds), "Biochemistry & Molecular Biology of Plants" (1st ed.). American Society of Plant Physiologists pp. 52-83.
10. Chanliaud E., De Silva J., Strongitham B., Jeronimidis G., Gidley M. J. (2004). "Mechanical effects of plant cell wall enzymes on cellulose/xyloglucan composites". *The Plant Journal*, 38, 27-37
11. Cosgrove D. J. (1997) "Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants". *Annual Reviews of Cell and Developmental Biology*. 13, 171-201.

12. Cosgrove D. J. (2005). "Growth of the plant cell wall". *Nature Reviews*, 6, 850-861.
13. Cosgrove D. J. (2006). "Cell Walls: Structure, Biogenesis and Expansion". In Taiz L., Zeigel E. (Eds), "Plant Physiology" (Fourth Edition). Sinauer Associates, Inc. 350-360.
14. Determann H. (1968) "Gel Chromatography" Springer-Verlag. New York, USA. pp. 42-45.
15. Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P., Smith F. (1956). "Colorimetric method for determination of sugar and related substances". *Analytical Chemistry*, 28, 3, 350-356.
16. Duranti M. (2006) "Grain legume proteins and nutraceutical properties". *Fitoterapia*, 77, 67-82.
17. Duranti M., Gius C. (1997) "Legume seed: protein content and nutritional value", *Field Crops Research*, 53, 31-45.
18. Eliasson A. C. (2006) "Carbohydrates in Food" Taylor and Francis Group. California, USA. pp. 35.
19. Fry S. C. (1988) "The Growing Plant Cell Wall: Chemical and Metabolic Analysis". Longman Scientific and Technical. London, England. pp. 121.
20. Fry S. C. (2004) "Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells". *New Phytologist*, 161, 641-675.
21. García E, (1994) "Diferencias entre el frijón silvestre y domesticado en atributos morfofisiológicos y su respuesta al almacenamiento inadecuado de la semilla" Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados, pp 4-21.
22. Goulao L. F., Oliveira C. M., (2008) "Cell Wall Modifications during fruit ripening when a fruit is not the fruit". *Trends in food science and technology*, 19, 4-25.
23. Goulao L. F., Santos J., De Sousa I., Oliveira M. C. (2007) "Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples". *Postharvest Biology and Technology*, 43, 307-318.
24. Graham P. H., Ranalli P. (1997) "Common bean (*Phaseolus vulgaris* L)". *Fields Crops Research*, 53, 137-146.
25. Huisman M. M. H., Weel K. G. C., Schols H. A, Voragen A. G. J. (2000) "Xyloglucan from soybean (*Glycine max*) meal is composed of XXXFG-type building units". *Carbohydrate Polymers*, 42, 185-191.

-
26. Hilz H., De Jong L. E., Kabel M. A., Verhoef R., Schols H. A, Voragen A. G. J. (2007) "Bilberry xyloglucan-novel building blocks containing β -xylose within a complex structure". *Carbohydrate Research*, 342, 170-181.
 27. Jackson M. G., Varriano-Marston E. (1981) "Hard to Cook Phenomenon in Beans: Effects of Accelerated Storage on Water Absorption and Cooking Time". *Journal of Food Science*, 46, 799-803.
 28. Janssen M. M. T. (1997) Antinutritives. In Vries J (Ed), "Food Safety and Toxicity", CRC Press. California, USA. pp. 39-43
 29. Krishnamurthy K. V. (1999) "Methods in Cell Wall Cytochemistry". CRC Press. California, USA. pp. 2-8.
 30. Lajolo F. M. Shiga T. M. (2003) "Cell wall polysaccharides of Common Beans (*Phaseolus vulgaris*)"; *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 23, 2, 141-148.
 31. Levine I. N. (2004) "Fisicoquímica". Mc Graw-Hill. Barcelona, España. pp. 620.
 32. Lindner E. (1995) "Toxicología de Alimentos". 2da. Edición, Acribia. Zaragoza, España. pp. 4-10
 33. Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser A. C., Krieger M. (2005) "Molecular Cell Biology.", Freeman and Company. New York, USA. pp. 231-232.
 34. Macrae R., Robinson R. K., Sadler M. J. (1993) "Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. Academic Press. California, USA. Vol 1, pp. 317-321.
 35. Macrae R., Robinson R. K., Sadler M. J. (1993) "Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. Academic Press. California, USA. Vol 4, pp. 2718-2725.
 36. Martínez Silva Ana Valeria. (2003) "Relación entre la actividad de poligalacturonasa y la calidad de cocción del frijol". Tesis Licenciatura, UNAM, Facultad de Química.
 37. McDougall J. G., Morrison I. M., Stewart D., Hillman R. J. (1996) "Plant Cell Walls as Dietary Fiber: Range, Structure, Processing and Function". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70, 133-150.
 38. Megazyme. Carbohidratos en:
<http://secure.megazyme.com/Dynamic.aspx?control=CSCatalogue&categoryName=Polysaccharides>. Actualizado a octubre 2008

Sustratos utilizados información:

Arabinosilano baja viscosidad:

<http://secure.megazyme.com/downloads/en/data/P-WAXYL.pdf>

- Actualizado octubre 2008.
<http://secure.megazyme.com/downloads/en/data/P-XYGLN.pdf>
Xiloglucano:
Actualizado octubre 2008.
39. Minic, Z., Jouanin L. (2006) "Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation", *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 435-449.
40. Nelson N. (1944) "A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose", *Journal of Biological Chemistry*, 153, 375-379.
41. Pacheco G. L. (2003) Participación de glicosidasas de pared celular en la calidad culinaria del frijol. Tesis licenciatura UNAM. pp. 27.
42. Peña C., García H. E. (1995) "La pared Celular" México: Universidad Autónoma de Chapingo, pp. 6-30.
43. Quezada V. M. (2005) "Relación entre el envejecimiento de cotiledones y la disminución de la termosolubilidad de pectinas durante el almacenamiento y remojo de la semilla de frijol". Tesis UNAM. Posgrado.
44. SAGARPA. Estadísticas de agricultura, Cadenas agroalimentarias.
Disponible en: http://www.siap.sagarpa.gob.mx/av_comcadebral.html
Diciembre 2007
45. Sigma-Aldrich información sobre productos:
- α -Amylase from porcine pancreas No. A 6255 in:
<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20information%20sheet/a6255pis.pdf>
Actualizado a Septiembre 2008
- Blue Dextran Molecular Weight No. D5751 in:
<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20information%20sheet/D5751pis.pdf>
Actualizado a Septiembre 2008
- Sepharose CL Gel Filtration No. CL6B 200 in:
<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20information%20sheet/cl6b200pis.pdf>
Actualizado a Septiembre 2008
- Total Dietary fiber assay kit. No. TDF100A Technical Bulletin :
<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/bulletin/tolf100abul.pdf>
Actualizado a Septiembre 2008
46. Shiga T. M., Lajolo F. M., Filisetti T. M. C. C. (2004) "Changes in the cell wall polysaccharides during storage and hardening of beans". *Food Chemistry*, 84, 53-64.

-
47. Shiga T. M., Lajolo F. M. (2006) "Cell Wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.)-composition and structure". *Carbohydrate Polymers*, 63, 1-12.
 48. Silva, C. A., Bates, R. P. & Deng, J. C. (1981). "Influence of soaking and cooking upon the softening and eating quality of black beans (*Phaseolus vulgaris*)". *Journal of Food Science*, 46, 6, 716-720.
 49. Srivastava M. L. (2002) "Plant Growth and Development", Academic Press. California, USA. pp. 23-38.
 50. Suda N. K., Buckeridge S. M., Giorgini J. F. (2003) "Cell Wall Hydrolases in seeds of *Euphorbia heterophylla*" *Brazilian Journal Plant Physiology*, 15, 3, 135-143.
 51. Talbott L. D., Ray P. M. (1992). "Molecular size and separability features of pea cell wall polysaccharides". *Plant Physiology*, 98, 357-368.
 52. Toivonen P.M., Brummell D.A. (2008) "Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables". *Postharvest Biology and Technology*, 48, 1-14.
 53. Torreblanca S. T., Viades T.J., Gonzáles H. C. (1999) "Fisicoquímica de Superficies y Cinética Química. Manual de Laboratorio. Facultad de Química, Departamento de Fisicoquímica. pp. 14-15.
 54. Vorwerk S., Somerville S., Somerville C. (2004). "The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance". *Trends in Plant Science*, 9, 4, 203-209.
 55. Waldron K. W. y Parker M. L. (2003) "Plant Cell Walls and Food Quality", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 101-116.