

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“PARTICIPACION DE LA BETA-GLUCANASA Y  
LA ALFA- AMILASA EN LA CALIDAD  
CULINARIA DEL FRIJOL”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

**LORENA MENDIETA LOPEZ**



**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      PROFESOR: IRMA BERNAL LUGO**

**VOCAL            PROFESOR: HERMILO LEAL LARA**

**SECRETARIO    PROFESOR: SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO**

**1ER. SUPLENTE    PROFESOR: KARLA MERCEDES DÍAZ GUTIÉRREZ**

**2º SUPLENTE     PROFESOR: ARMANDO CONCA TORRES**

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: LABORATORIO 104, DEPARTAMENTO DE  
BIOQUÍMICA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**ASESOR DEL TEMA:**

**DRA. IRMA BERNAL LUGO**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Irma Bernal Lugo', written over a horizontal line.

**SUSTENTANTE:**

**LORENA MENDIETA LÓPEZ**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Lorena Mendieta López', written over a horizontal line.

---

---

## AGRADECIMIENTOS

---

---

A Marú, mi mamá, por motivarme para salir adelante, por su dedicación y cuidado, por darme la vida y por ser mi mamá. Gracias por tu amor.

A mi tío José por mostrar interés en las cosas que hago, por ser otro padre para mí y por apoyarme en todo momento. Gracias.

A Rocío y Rodrigo por su apoyo en los momentos difíciles y por compartir conmigo la luz y alegría que nos brinda Jovana.

A mi amiga Sandra por su compañía, su amistad sincera y sus buenos consejos. Te quiero amiga.

A Antonio, por que me has acompañado en muchos de los momentos importantes de mi vida, por que me has ayudado incondicionalmente en toda ocasión, por estar a mi lado siempre. Gracias.

A mi buena amiga Sonia, por la gran ayuda que me brindaste, por escucharme siempre y por los buenos momentos.

A José Antonio por ser un amigo incondicional, que día a día me recuerda que *“no hay que preocuparse demasiado por los problemas que surgen en la vida, solo hay que preocuparse por vivirla”*. Te quiero mucho.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 104: Karla, Jessica, Mari, Yazmín y Rodrigo por su compañía y por todos los momentos gratos y alegres, que hicieron agradable mi estancia en el laboratorio.

---

---

## AGRADECIMIENTOS

---

---

En especial quiero agradecer a la Doctora Bernal por haberme permitido formar parte de su equipo de investigación, por todas sus enseñanzas, las oportunidades brindadas, así como el tiempo que me dedico para la culminación de éste trabajo, pero de una manera mucho más especial quiero agradecerle por el apoyo moral que me brindo en los momentos difíciles que atravesé. Muchas gracias.

A la Doctora Hilda Araceli Zavaleta Mancera responsable de la Unidad de Microscopia del Colegio de Postgraduados campus Montecillo, por sus valiosas enseñanzas y por el tiempo que dedico para la realización de las microscopias mostradas en éste trabajo.

A la Química Laurel Fabila por el apoyo técnico brindado.

Al Doctor Hermilo Leal Lara por sus comentarios para mejorar este escrito.

A la Doctora Sobeida Sánchez Nieto por las oportunas observaciones y por el tiempo que dedico a la revisión de este trabajo.

A la UNAM y en especial a la Facultad de Química por abrirme sus puertas y ser mi segundo hogar en los últimos años.

## ÍNDICE

|   | Página |
|---|--------|
| RESUMEN.....  | i      |
| INTRODUCCIÓN.....   | 1      |
| 1. ANTECEDENTES.....  | 3      |
| 1.1 Importancia del frijol en México.....                         | 3      |
| 1.2 Características del frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )..... | 4      |
| 1.2.1 Estructura física de la semilla.....                        | 4      |
| 1.2.2 Estructura de células de cotiledón.....                     | 5      |
| 1.3 Textura de la semilla.....                                    | 6      |
| 1.4 Almidón.....  | 7      |
| 1.5 La pared celular.....   | 8      |
| 1.5.1 Componentes de la pared celular.....                        | 8      |
| 1.5.1.1 Celulosa.....   | 9      |
| 1.5.1.2 Polisacáridos no celulósicos.....                         | 10     |
| 1.5.1.3 Polifenoles.....  | 11     |
| 1.5.1.4 Proteínas.....  | 11     |
| 1.6 Alfa amilasa.....   | 12     |
| 1.7 Endo-(1-4)- $\beta$ -D-glucanasa.....                         | 12     |
| 1.8 Procesamiento de la semilla.....                              | 12     |
| 1.8.1 Proceso de remojo.....                                      | 13     |
| 1.8.2 Proceso de cocción.....                                     | 13     |
| 2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....                                     | 14     |
| 3. METODOLOGÍA.....   | 15     |
| 3.1 Material biológico.....                                       | 15     |
| 3.2 Determinación del tiempo de cocción.....                      | 15     |
| 3.3 Preparación de las semillas para los ensayos enzimáticos..... | 16     |
| 3.3.1 Preparación de los extractos enzimáticos.....               | 16     |
| 3.4 Determinación de proteína.....                                | 17     |

|  |    |
|--|----|
| 3.5 Ensayo de glucanasas.....  | 17 |
| 3.5.1 Determinación de azúcares reductores.....                              | 18 |
| 3.5.2 Ensayo de endoglucanasa.....   | 18 |
| 3.6 Ensayo de celulasa.....  | 19 |
| 3.7 Aislamiento y purificación de pared celular.....                         | 20 |
| 3.7.1 Obtención de la fracción celulósica.....                               | 20 |
| 3.7.2 Hidrólisis de la fracción celulósica.....                              | 21 |
| 3.7.2.1 Determinación de azúcares reductores en la fracción de celulosa..... | 22 |
| 3.7.2.2 Determinación de glucosa.....  | 22 |
| 3.7.2.3 Determinación de xilosa.....   | 22 |
| 3.8 Ensayo de alfa amilasa.....  | 23 |
| 3.9 Micrografías por microscopía electrónica de barrido (MEB).....           | 24 |
| 4. RESULTADOS.....   | 26 |
| 4.1 Efecto del remojo en la calidad de cocción.....                          | 26 |
| 4.2 Actividad de glucanasa.....  | 27 |
| 4.3 Actividad de endoglucanasa.....  | 28 |
| 4.4 Actividad de celulasa.....   | 29 |
| 4.5 Composición de la fracción celulósica.....                               | 30 |
| 4.6 Efecto del remojo en la actividad de la alfa-amilasa.....                | 31 |
| 4.7 Micrografías por MEB.....  | 31 |
| 5. DISCUSIÓN.....  | 36 |
| 6. CONCLUSIONES.....   | 40 |
| 7. PERSPECTIVAS.....   | 41 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA CITADA.....  | 42 |
| ANEXO.....   | 47 |

**RESUMEN**

El frijol es un cultivo tradicional en México, sembrado en todas las regiones agrícolas del país. Actualmente se busca desarrollar variedades mejoradas con adaptaciones específicas como resistencia a enfermedades, ciclo biológico corto y grano de calidad comercial y culinaria. Entre estas dos últimas líneas de investigación se considera el tiempo de cocción ya que en buena parte determina la preferencia del consumidor. Para producir variedades de frijol con bajos tiempos de cocción es necesario conocer los genes que lo determinan. Se ha encontrado que sometiendo a los frijoles a un proceso de remojo previo a la cocción estos se suavizan más rápidamente acortando así el tiempo que tardan en cocinarse. A la fecha no se conoce el mecanismo por medio del cual el remojo produce este efecto. Estudios previos indican que las características de textura de alimentos vegetales dependen de los componentes de la pared celular, como la celulosa, y/o del almidón. En este trabajo se hipotetizó, que el mecanismo por el que el remojo de la semilla de frijol disminuye el  $TC_{50}$  es de tipo enzimático; a través de modificar al almidón y a la celulosa por lo que la  $\alpha$ -amilasa y la endo-glucanasa deberán estar presentes y activas durante este proceso. Para probar lo anterior, se cuantifico la actividad de las glucanasas antes mencionadas. Los resultados indican que durante el remojo del frijol se incrementó la actividad de  $\alpha$ -amilasa, y la de celulasa. También se demostró que la celulosa aislada de cotiledones remojados fue mejor sustrato para una celulasa de *Aspergillus niger*. Además, por microscopia electrónica de barrido se demostró que el remojo de la semilla resultó en la pérdida de la estructura de los cuerpos proteicos, aunque la estructura de los gránulos de almidón se mantuvo.

Lo anterior sugiere que el remojo de la semilla de frijol, incrementa la actividad de la celulasa y la de  $\alpha$ -amilasa. Aparentemente, los cambios en la estructura de la celulosa inducidos por el remojo, no se debieron a la acción de endo-glucanasa, sobre el xiloglucano, ya que la celulosa aislada de la semilla no contenía xiloglucano. Por lo que los resultados se interpretaron en el sentido de que durante el remojo de la semilla de frijol, la celulosa es modificada por la celulasa endógena, permitiendo que la pared celular sea más laxa y por tanto requiera menos energía para el ablandamiento de la semilla durante la cocción.



## INTRODUCCIÓN

El frijol es un cultivo tradicional en México, el cual se siembra en todas las regiones agrícolas del país (Acosta & Pérez, 2003); además de ser uno de los principales alimentos en América Latina. En México se consume por todos los estratos sociales, ello se debe a su costo relativamente bajo y a su gran aceptabilidad. Este alimento es una buena fuente de carbohidratos, proteínas, minerales y vitaminas (citado en Bernal, 2004). No obstante todas estas ventajas, su aprovechamiento es limitado, pues contiene factores tóxicos y antinutricionales. Además de tiempos prolongados de cocción (Blancas, 2001).

En el INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) se han desarrollado variedades con adaptaciones específicas, como son: resistencia a enfermedades, ciclo biológico corto, y grano de calidad comercial y culinaria. Entre las principales líneas de investigación destacan estudios sobre la calidad culinaria e industrial (Acosta & Pérez, 2003). La calidad culinaria de la semilla de frijol se basa en atributos deseables para el consumo humano, relacionadas con el proceso de preparación como son: a) rápida hidratación, b) tiempo reducido de cocción, c) caldo de cocción espeso, d) factores antinutricionales reducidos, e) componentes de alta digestibilidad, f) buen gusto, entre otros. De éstos, el tiempo de cocción es uno de los más importantes (García, 1994).

El procesamiento de leguminosas adecuado para el consumo humano invariablemente involucra alguna rehidratación (remojo) y la aplicación de calor (tratamiento térmico) (Matthews, 1989). Durante el remojo ocurren cambios fisicoquímicos como la hidratación de la semilla (Blancas, 2001), hidratación y aumento de volumen de los gránulos de almidón (García, 1994), así como también se inicia el proceso de germinación de la semilla durante el cual se activa la maquinaria enzimática (Besnier, 1989). Durante la cocción ocurren cambios estructurales y fisicoquímicos como la gelatinización del almidón, la desnaturalización de las proteínas y la relajación de la pared celular (Blancas, 2001). Éstos cambios fisicoquímicos inducidos por el calor se reflejan en la suavización de la semilla (Bernal, 2004). El tiempo en el que la semilla se ablanda, adquiere sabor y textura agradable se conoce como tiempo de cocción

(García, 1994). Todo lo anterior sugiere que cualquier factor que modifique la facilidad de éstas biomoléculas para realizar su transición térmica afecta en forma importante el proceso de cocción (Blancas, 2001).

Estudios anteriores indican que las características de textura en alimentos vegetales dependen de las características y componentes de la pared celular, la lamela media y la abundancia de ciertos componentes específicos, como el almidón (Stolle-Smits, 1998). La celulosa es un componente estructural de la pared celular; cuya estructura consiste de cadenas lineales de unidades de  $\beta$ -D-glucosa, unidas con enlaces  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4, cuyas cadenas están asociadas en microfibrillas. La pared celular también tiene un gran número de proteínas catalíticas entre las que se encuentran la endoglucanasa (García & Peña, 1995), y la celulasa, las cuales atacan el enlace glucosídico de los glucanos y de la celulosa (Cosgrove, 1999). Por otro lado el almidón es una mezcla de glucanos que se deposita en el citoplasma en forma de gránulos insolubles constituidos por  $\alpha$ -amilosa y amilopectina (Voet & Voet, 2000); siendo uno de los mayores componentes del frijol, cerca del 50 % (citado en Carmona et al., 2007). En el citoplasma también se encuentra la  $\alpha$ -amilasa que hidroliza los enlaces glucosídicos  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 4 del almidón (Besnier, 1989).

El remojo de la semilla previo a la cocción disminuye los tiempos de cocción sugiriendo que el remojo puede provocar cambios micro estructurales de origen enzimático tanto en la celulosa como en el almidón que faciliten la suavización de la semilla durante el tratamiento térmico. Para evaluar la actividad *in vitro* de celulasa y  $\alpha$ -amilasa se utilizaron sustratos específicos para cada enzima y como fuente de las enzimas, extractos de frijol seco y remojado, tanto del citoplasma como de la pared celular; de igual modo se tomaron imágenes con microscopio electrónico de barrido de cortes de cotiledón con el fin de detectar diferencias en la microestructura. Para demostrar que durante el remojo la celulosa era modificada, ésta se utilizó como sustrato de una celulasa de *aspergillus*.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Importancia del frijol en México

El frijol es una planta originaria de Mesoamérica, la cual se viene cultivando desde hace alrededor de 8 mil años, desarrollándose durante ese tiempo una diversidad de tipos y calidades de frijoles (SAGARPA, 2003). Se tienen 180 especies del género *Phaseolus* de los cuales aproximadamente 126 provienen del continente Americano, 54 del Sur de Asia y Oriente de África, 2 de Australia y tan solo 1 de Europa. En México se han identificado más de 67 especies del género *Phaseolus*, de las cuales solo se han domesticado cuatro *Phaseolus vulgaris*, *P. coccineus*, *P. lunatus* y *P. acutifolius*, las cuales se cultivan con el propósito de usarse en la alimentación humana (SAGARPA & inCARural, 2002).

Por su gran importancia económica y social, el frijol es un producto estratégico dentro del desarrollo rural en México, ya que representa el tercer lugar en cuanto a superficie sembrada nacional, 1786760 hectáreas (SIAP, 2006) con una producción de 1346745 toneladas (SIAP, 2006); representa además la segunda actividad agrícola más importante en el país por el número de productores dedicados al cultivo (SAGARPA & inCARural, 2002).

El frijol representa en la dieta del pueblo mexicano una fuente importante de proteínas (20-25% del peso seco), carbohidratos (50-60% del peso seco), vitaminas (del complejo B) y minerales (Ca, Fe, Cu, Zn, P, Mg, etc.); los carbohidratos constituyen la fracción principal en las leguminosas. Los polisacáridos más importantes de las leguminosas son el almidón, los polisacáridos de la pared celular (fibra dietética) y los oligosacáridos, que se encuentran en cantidades pequeñas aunque significativas. Sus proteínas presentan un alto contenido de lisina (citado en Blancas, 2001; García, 1994; Vargas et al., 2006), pero son pobres en los aminoácidos sulfurados metionina y cistina (citado en Muller y Tobin, 1990). Es un alimento fundamental en la dieta de la población mexicana, siendo un alimento que no puede sustituirse con el consumo de algún otro. Adicionalmente, la importancia ancestral de su cultivo en el campo mexicano radica también en que forma parte de la cultura gastronómica de México, de ahí la amplia

aceptación del producto en la cocina mexicana, por lo que posee una gran demanda a nivel nacional. Actualmente esta leguminosa se enfrenta a modificaciones importantes ante una sociedad cambiante; así como el paso de una economía cerrada a una economía global, todo lo cual está ejerciendo presiones en diversas etapas de la cadena de producción, comercialización, transformación y consumo (SIAP, 2008).

## **1.2 Características del frijol (*Phaseolus Vulgaris*)**

El frijol es una planta herbácea anual que se desarrolla en climas templados. Tiene una raíz típica con nódulos bacterianos del género *Rhizobium*, fijadores del nitrógeno atmosférico. El tallo varía de corto y robusto a rastrero y esbelto. Las flores con forma amariposada y normalmente hermafrodita, son de color rojo, blanco, lila, etc. y están agrupadas en racimos (García, 1994). El frijol llamado también judía, alubia, habichuela, poroto, etc. es el fruto de la planta, contenido en una vaina o legumbre (ejote) colgante, recta o arqueada comprimida, que se abre en dos valvas, para dar lugar a las semillas que son de forma variable, generalmente reniforme, más o menos comprimidas y algunas veces redondeadas o esféricas y cilíndricas. Se distinguen numerosas variedades de frijol como amarillo, blanco, negro, etc., entre las cuales se forman incontables híbridos (citado en Blancas, 2001). La composición aproximada de la semilla seca es de 9-12 % de humedad, 19-24% de proteína, 1.2-1.5% de lípidos, 62-65% de carbohidratos totales y 3.3-4% de cenizas (citado en Matthews, 1989).

### **1.2.1 Estructura física de la semilla**

La semilla madura de *Phaseolus Vulgaris* consta del embrión y la cubierta de la semilla o testa. En la Figura 1 se muestra la anatomía básica de la semilla de frijol. En la testa se localiza el hilio, que es una cicatriz ovalada que aparece en el lugar donde la semilla estaba unida al funículo. A un lado del hilio se localiza una abertura; el micrópilo y al otro lado se localiza un borde llamado rafe. El embrión consiste de un eje embrionario con dos cotiledones. El eje embrionario está compuesto por el hipocotilo al cual están

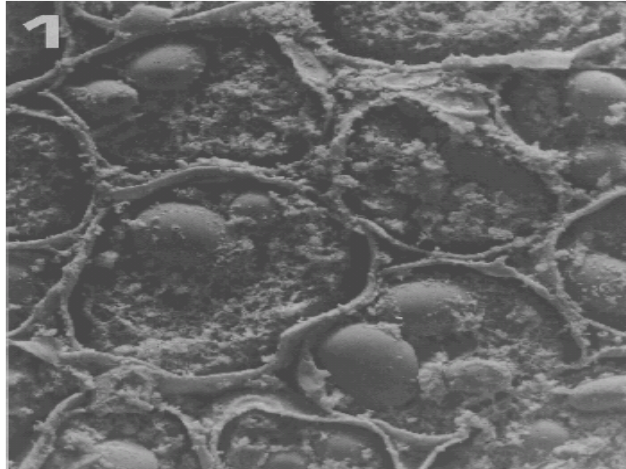
unidos los cotiledones, la radícula y la plúmula (el ápice del borde con las primeras hojas). Los cotiledones son abultados y constituyen el 90% de la masa de la semilla (Quezada, 2005). En estas estructuras se realizan los cambios químicos y estructurales inducidos por el tratamiento térmico (Bernal, 2004).



**Figura 1. Anatomía de la semilla de frijol**

### 1.2.2 Estructura de células de cotiledón

En la Figura 2 se muestra que las células del cotiledón son elípticas y están empaquetadas muy unidas entre sí. Por la desecación que sufre la semilla al madurar, los organelos se reducen y en el citoplasma de las células solamente se observan gránulos de almidón elípticos diseminados entre los cuerpos proteicos amorfos. Los cuerpos proteicos poseen inclusiones cristalinas o globoides, las cuales son ricas en ácido fólico. Las proteínas de reserva también se encuentran localizadas en el interior de estos organelos. Los gránulos de almidón son oblongos o esféricos con dimensiones de 20 a 35  $\mu\text{m}$  de diámetro. El núcleo de estas células es una masa viscosa, amorfa, con el material de DNA rodeado por la envoltura nuclear. Cada pared celular está bien definida y en la unión de tres células se encuentra un espacio intercelular. Estos espacios se forman durante el desarrollo y permite el flujo de gases a través del tejido. Las esquinas de los espacios intercelulares son la unión de dos lamelas medias, las cuales están constituidas principalmente por pectina y polímeros de ácido galacturónico (Bernal, 2004; Quezada, 2005).



**Figura 2. Células de cotiledón de frijol**

Fuente: Marconi et al., 2000

### 1.3 Textura de la semilla

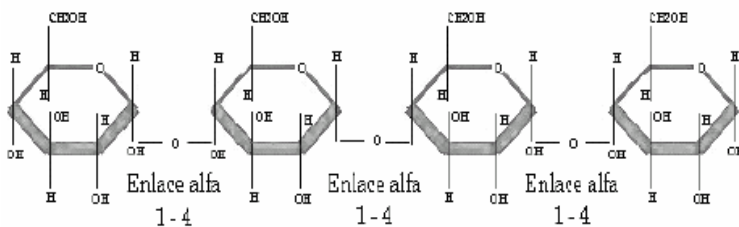
La textura es uno de los más importantes atributos de calidad de las semillas leguminosas, porque ésta afecta la palatabilidad y consecuentemente la aceptabilidad del consumidor (Shiga et al., 2003). Textura es definida como: “todas las características físicas percibidas por el sentido del tacto, eso está relacionado a la deformación después de aplicar una fuerza”. La textura es una característica dada a nivel de los órganos de la planta, que es dependiente de diversas fracciones del tejido de la planta, células y básicamente de estructuras e interacciones inter moléculas y iones. A nivel celular, la textura es una manifestación de la facilidad con que las células pueden fracturarse y la facilidad con que ellas puedan separarse. Entonces la textura de los alimentos vegetales esta determinada por (1) la abundancia de componentes específicos como el almidón, (2) las características de la pared celular y la lamela media y (3) el efecto del procesamiento sobre estas características (Stolle-Smits, 1998). La textura del frijol y de los alimentos en general, es resultado de su microestructura, la cual depende de las fuerzas físicas existentes entre los componentes químicos celulares (Blancas, 2001). Uno de los aspectos más altamente apreciados de los frijoles en la gastronomía es ésta textura (Pujolá et al., 2007).

## 1.4 Almidón

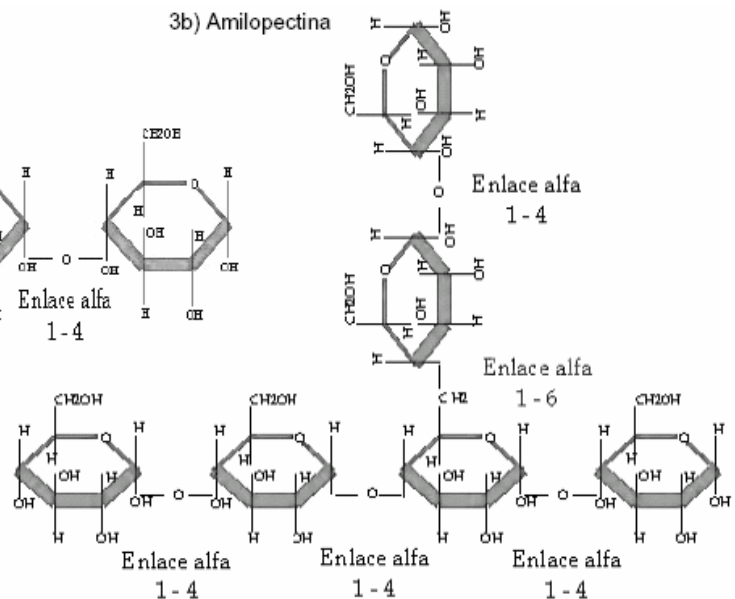
Experimentos previos indican que una de las moléculas más importantes relacionadas con la textura de frijoles es el almidón (amilosa, amilopectina), considerando su importancia cuantitativa en la semilla y sus propiedades en otros alimentos (Pujolá et al., 2007).

El almidón es la sustancia de reserva alimenticia predominante en las plantas. Se diferencia de todos los demás carbohidratos en que en la naturaleza se presenta como complejas partículas discretas (gránulos). Los gránulos de almidón están compuestos de una mezcla de dos polímeros: un polisacárido esencialmente lineal denominado amilosa (Fig. 3a) y otro muy ramificado llamado amilopectina (Fig. 3b) ordenados en forma radial, las moléculas de amilosa se disponen entre las de amilopectina. La mayor parte de la amilosa es una cadena lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$ . El acoplamiento de las moléculas le da una conformación de hélice. La mayoría de los almidones contienen alrededor del 25 % de amilosa. Por otro lado la amilopectina es una molécula muy grande y altamente ramificada; consiste en una cadena de glucosas unidas por enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  que tiene el único extremo reductor, denominada cadena-C, la cual tiene numerosas ramas llamadas cadena- $\beta$  unidas con enlaces  $\alpha(1\rightarrow6)$  (Fennema, 2000; Voet & Voet, 2000).

3a) Amilosa



3b) Amilopectina



Los gránulos de almidón no dañados son insolubles en agua fría, pero pueden embeber agua de manera reversible; es decir, pueden hincharse ligeramente con el agua y volver luego al tamaño original al secarse. En las condiciones normales de procesado de alimentos (calor y humedad), los gránulos de almidón se hinchan rápidamente, las moléculas de agua penetran entre las cadenas, rompen los enlaces entre las misma y establecen capas de hidratación alrededor de las moléculas así separadas; esto plastifica las cadenas, de manera que se separan totalmente y se solvatan (Fennema, 2000).

De acuerdo con su función fisiológica, el almidón provee energía cuando se necesita por ejemplo durante la germinación de las semillas. Este es hidrolizado por enzimas (amilasas) que proporcionan azúcares, sobre todo maltosa, que es más soluble y puede ser metabolizada (Walstra, 2003).

## **1.5 La pared celular**

La pared celular es un componente estructural típico de las células vegetales, que proporciona una matriz extracelular capaz de controlar los procesos de crecimiento y desarrollo. La pared celular tiene funciones variadas y complejas. Mantiene la forma de la célula madura, brinda soporte mecánico a la planta y protección contra patógenos potenciales. También define las interrelaciones celulares y forma un espacio continuo dentro de la planta. Ejerce un amplio control sobre diferentes parámetros químicos que afecta el comportamiento celular. Tiene un marcado efecto en funciones de absorción. Es delgada, hidratada, plástica y extensible para permitir el crecimiento (Flores, 1999).

### **1.5.1 Componentes de la pared celular**

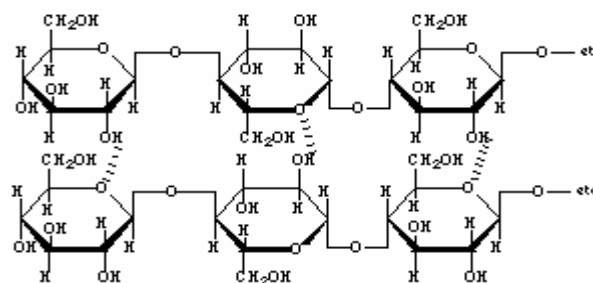
Numerosas revisiones han descrito a la pared celular vegetal como una estructura dinámica debido a que la composición y las interacciones intermoleculares entre sus componentes están en constante cambio como resultado del crecimiento, desarrollo y variedad de tejidos vegetales (Blancas, 2001; Shiga et al., 2003). Compuesta de



polisacáridos complejos (celulosa 20-30%, hemicelulosa 25% y pectinas 30%), pequeñas cantidades de compuesto fenólicos 5% (ligninas y ácidos hidroxicinámicos) y proteínas (extensinas y enzimas 5-10%), con enlaces iónicos, covalentes y puentes de hidrógeno estabilizando estos componentes. Esta estructura polimérica dicta la calidad textural de los alimentos basados en plantas (Flores, 1999; Shiga et al., 2003). Estos polímeros constituyentes están ordenados en tres estructuras independientes, pero interactuando en dominios. Un dominio, la red fundamental de microfibrillas de celulosa y xiloglucano, esta embebida en un segundo dominio de una red de polisacáridos pecticos. El tercer dominio consiste de proteínas estructurales (Stolle-Smits, 1998). La disposición e interacción de los polímeros de la pared celular vegetal, físicamente y químicamente determinan en gran medida las propiedades mecánicas del alimento (Shiga & Lajolo, 2006)

### 1.5.1.1 Celulosa

La celulosa (Figura 4), es uno de los más abundantes polímeros en la naturaleza consiste de una cadena no ramificada, formada por moléculas de D-glucosa, unidas entre si por enlaces  $\beta$  glicosidicos (Levy et al., 2002). Las cadenas son lineales muy largas con 2000 o más de 25000 residuos de glucosa, se unen entre si mediante enlaces de hidrógeno formando una estructura denominada microfibrilla (Flores, 1999), con regiones amorfas y cristalinas.

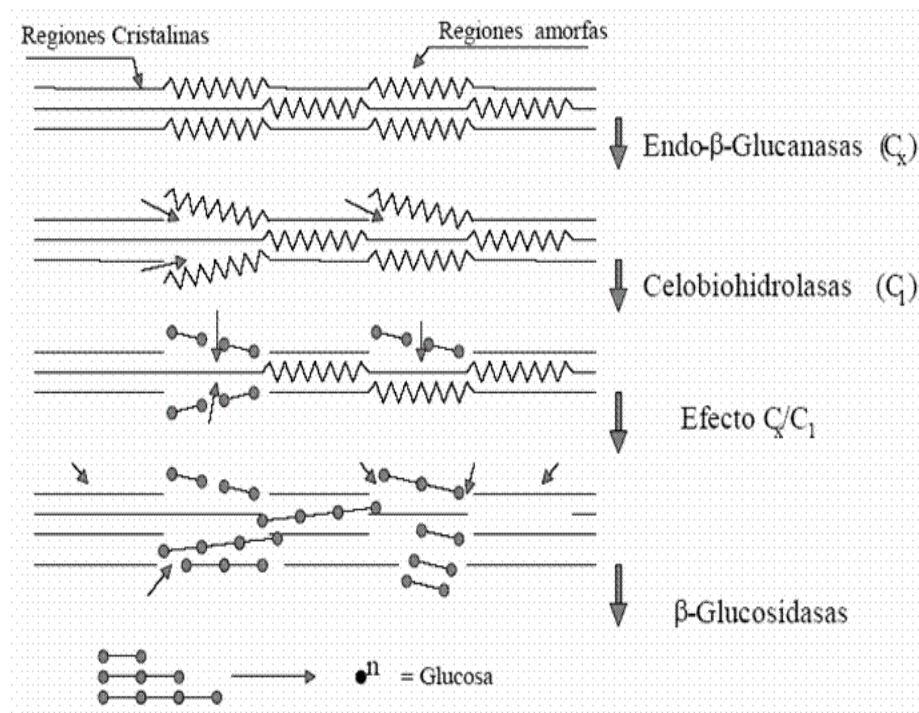


**Figura 4. Celulosa**

El grado de cristalinidad depende del origen de la celulosa (Stolle-Smits, 1998). Esta estructura muy cohesionada, unida por puentes de hidrógeno, confiere a las fibras de

celulosa una fuerza excepcional y las hace insolubles en agua a pesar de su hidrofiliidad. (Voet & Voet, 2000) Las fibras de celulosa forman el componente más resistente de la pared celular. La función de este polímero es la de formar el esqueleto y proveer de forma y fuerza a la pared celular (Quezada, 2005). La celulosa puede estar en un estado relativamente puro o en asociación con otros compuestos como la hemicelulosa y las ligninas (García & Peña, 1995).

Su completa degradación a glucosa requiere de la acción de al menos tres enzimas (Figura 5): endo-1,4- $\beta$ -glucanasa, exo-1,4- $\beta$ -glucanasa (celobiohidrolasa) y  $\beta$ -glucosidasa (Levy et al., 2002).



**Figura 5. Mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa**

Fuente: Nidetzky & Steiner, 1993

### 1.5.1.2 Polisacáridos no celulósicos

En este tipo se encuentran los polisacáridos pecticos y las hemicelulosas. Los polisacáridos pecticos consisten de polisacáridos ricos en ácido galacturónico que a menudo contienen una significativa cantidad de ramnosa, arabinosa y galactosa. Se piensa que pueden estar presentes en todas las partes de la pared celular y

probablemente formen una entremezcla de la matriz de gel y la red celulosa-hemicelulosa. Los tres polisacáridos pecticos mayoritarios son: homogalacturonano, ramnogalacturonano I y ramnogalacturonano II. Este tipo de polímeros puede ser ligado covalentemente a la matriz de la pared. Las hemicelulosas son un grupo de azúcares solubles en álcalis, que rompen los puentes de hidrógeno que las ligan fuertemente a las microfibrillas de celulosa. Las hemicelulosas son: xiloglucanas, xilanas, glucomananas, mananas y galactomananas (Waldron et al., 2003).

### **1.5.1.3 Polifenoles**

Los compuestos fenolicos están frecuentemente presentes en la pared celular de las plantas. Pueden ser divididos en dos grandes grupos; el primer grupo conocido como lignina y el segundo grupo que consiste de esteres fenolicos relativamente simples (ácido ferulico) que pueden fundirse en la pared celular y afectar la adhesión celular (Waldron et al., 2003).

### **1.5.1.4 Proteínas**

Éstas puede ser clasificadas en dos grupos: enzimas y estructurales. La pared celular contiene numerosas enzimas capaces de hidrolizar la mayoría de los componentes de la matriz de la pared (Cosgrove, 1999). Las enzimas tienen un rango de funciones, incluyendo el movimiento de polímeros, degradación de pared y remodelación de pared asociada con el crecimiento, maduración y senescencia de la planta (Waldron et al., 2003). Las enzimas que están localizadas en la pared celular incluyen peroxidasas, invertasas, celulasas, fosfatasas ácidas, pectinasas, pectin metil esterases y malato deshidrogenasas (Brett & Waldron, 1990). La degradación de los polisacáridos de la pared celular es dependiente de la acción de numerosas enzimas clasificadas en tres grupos: exopolisacaridasas, endopolisacaridasas y otras hidrolasas que no pertenecen a estos dos grupos (Minic & Jouanin, 2006). Un número de exoglucosidasas han sido reportadas. Endo- $\beta$ 1,4-glucanasa está presente, y puede estar comprometida en el movimiento de la pared celular (Brett & Waldron, 1990).

## **1.6 Alfa amilasa**

Las amilasas son las enzimas que hidrolizan los almidones. No es sorprendente que cierta degradación del almidón se produzca durante la maduración, el almacenamiento y el procesado de los alimentos. Dado que el almidón contribuye de una manera principal a la viscosidad y a la textura de los alimentos su hidrólisis durante el almacenamiento y el procesado es un asunto importante. Las  $\alpha$ -amilasas hidrolizan enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 del interior del almidón (tanto de la amilosa como de la amilopectina). Dado que es una enzima del tipo endo, su acción tiene un gran efecto sobre la viscosidad de los alimentos que tienen el almidón como base (Fennema, 2000).

## **1.7 Endo-(1-4)- $\beta$ -D-glucanasa**

Durante el crecimiento de la planta, el tamaño y morfología de la células cambia, lo que ocurre como resultado de la degradación de los componentes de la pared celular, en lo cual están implicadas numerosas enzimas como la celulasa (Minic & Jouanin, 2006).

Las endoglucanasas de plantas se han encontrado en un amplio rango de especies incluyendo tomate, melón, frijol, pimienta, durazno y árboles de naranja y aguacate (Levy et al., 2002).

Las endo-(1 $\rightarrow$ 4) $\beta$ -D-glucanasas (celulasas) rompen los enlaces glicosídicos internos de la celulosa en forma aleatoria, lo que provoca una rápida disminución en la longitud de la cadena de los  $\beta$ -glucanos con incremento lento de los grupos reductores (Cosgrove, 1999; Fennema, 2000).

## **1.8 Procesamiento de la semilla**

Uno de los mayores problemas asociados con el consumo de leguminosas es el prolongado tiempo de preparación y cocción (Marconi et al., 2000). Para el consumo

humano, el frijol puede requerir de un periodo de remojo de 12 a 18 horas y posteriormente de un tratamiento térmico (Blancas, 2001). Remojo y cocción de frijoles son procesos separados que pueden o no efectuarse simultáneamente (Taiwo et al., 1997).

### **1.8.1 Proceso de remojo**

En varios procesos los frijoles son remojados hasta que ellos son saturados con agua, y el tiempo de cocción es iniciado para producir ablandamiento (Taiwo et la., 1997). Estudios anteriores reportan que el tiempo de cocción de frijoles que fueron remojados en agua por 12 horas fue del 50% del valor original (Carmona et al., 2007). Los cambios durante el remojo son dependientes de la absorción de agua, durante el cual, se produce la hidratación y aumento de volumen de los gránulos de almidón. Con la imbibición se inicia el proceso de germinación en donde incrementa la actividad enzimática, lo que produce cambios en la semilla (García, 1994). Datos reportados indican que durante el remojo en agua de una variedad de frijol, disminuyó el contenido de celulosa (Rehinan et al., 2004).

### **1.8.2 Proceso de cocción**

Después del remojo, el frijol es sometido a tratamiento térmico. El tiempo en el que la semilla se ablanda y adquiere sabor y textura agradables se conoce como tiempo de cocción. Con la ebullición se efectúan cambios estructurales en a) la lamela media, pues se fractura y solubiliza, facilitando la separación de las células del cotiledón y la pérdida de rigidez del grano y b) el citoplasma, en donde el almidón se gelatiniza totalmente, en dependencia del tiempo de cocción, y se pierde la integridad de los cuerpos proteicos (García, 1994; Shiga et al., 2004). La cocción efectúa un cierto número de cambios en las características físicas y composición química de los alimentos leguminosos (Rehinan et al., 2004). El grado de solubilidad y de despolimerización de los polisacáridos durante el proceso de cocción, determina la calidad (Shiga & Lajolo, 2006).

## 2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### Objetivo General:

Determinar la participación de la endo-(1→4) $\beta$ -D-glucanasa y de la  $\alpha$ -amilasa en el mecanismo mediante el cual el remojo incrementa la calidad de cocción del frijol.

### Objetivos Específicos:

- a) Determinar el tiempo de cocción de tres variedades de frijol, utilizando semillas secas y remojadas,
- b) Determinar el efecto del remojo sobre la actividad de la endo-(1→4) $\beta$ -D-glucanasa y de la  $\alpha$ -amilasa en semillas de frijol.
- c) Identificar la composición de azúcares de la fracción celulósica provenientes de frijol seco y remojado.
- d) Determinar el efecto del remojo en la susceptibilidad a hidrólisis enzimática de la fracción de celulosa.
- e) Señalar las características micro estructurales de células cotiledóneas de frijol seco y remojado por medio de microscopia electrónica de barrido.

### Hipótesis:

Si el remojo disminuye el tiempo de cocción del frijol a través de modificar la estructura del almidón y de la celulosa, entonces la alfa-amilasa y la endo-glucanasa deberán estar activas durante este proceso.

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1 Material biológico**

Se trabajaron tres cultivares de semillas de frijol, Flor de mayo-M38, Bayo mecentral y la línea experimental denominada 2626 (generada por Dr. A. Campos en CEVAMEX-INIFAP). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado para cada uno de los cultivares y para cada una de las condiciones trabajadas. Los tres genotipos fueron analizados en dos condiciones, secos y remojados, esta última condición se llevó cabo pesando un gramo de frijol y colocándolo en un matraz erlenmeyer de 25 ml, agregando 5 ml de agua desionizada, el matraz se tapó con papel aluminio y se dejó reposando toda la noche, aproximadamente 16 h, a temperatura ambiente.

#### **3.2 Determinación del tiempo de cocción**

Para determinar el tiempo de cocción se utilizó el "cocinador Mattson" que consta de una charola con 25 pozos en donde se colocaron las semillas de frijol, encima de cada frijol se colocó una varilla de metal con una masa de 200 gramos. El cocinador se introdujo en una olla con agua hirviendo, se cubrió la olla con una tapa de plástico y se mantuvo el agua en ebullición. Se registró el tiempo en que cada una de las varillas perforó cada una de las semillas de frijol. Posteriormente se realizó una gráfica del número de frijoles cocidos contra tiempo y de la gráfica se obtuvo el tiempo de cocción medio ( $TC_{50}$ ) definido como los minutos en los que el 50% de las semillas de frijol del lote se cocieron. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada condición (frijol seco y remojado) y para cada cultivar (Martínez, 2003).

### 3.3 Preparación de las semillas para los ensayos enzimáticos

Pasado el tiempo de imbibición, el agua de remojo fue drenada y la testa del grano y el eje embrionario fueron retirados con ayuda de pinzas y/o navaja, obteniendo de ésta manera los cotiledones limpios.

Para el caso de las semillas no remojadas o secas, se pesó un gramo de frijol y se retiró directamente la testa de acuerdo a lo descrito previamente, obteniendo así los cotiledones limpios

#### 3.3.1 Preparación de los extractos enzimáticos

El procedimiento que se utilizó para la preparación de los extractos enzimáticos fue una modificación del propuesto por Suda & Buckeridge et al. (2003).

Los cotiledones aislados del frijol fueron homogenizados en un mortero con 15 ml de un amortiguador de acetatos 0.05 M (pH 5.5), el homogenizado se mantuvo en agitación constante por 1 h a 4°C; transcurrido éste tiempo se centrifugó a 6,000 rpm por 15 minutos manteniéndolo a la misma temperatura. Se reservó el sobrenadante para la posterior detección de  $\alpha$ -amilasa, almacenándolo a -20 °C hasta su utilización

La pastilla obtenida en el paso anterior se resuspendió en 15 ml de un buffer de acetatos 0.05 M (pH 5.5) conteniendo NaCl 0.4 M y 0.02 % de NaN<sub>3</sub> (azida de sodio). Esta suspensión se mantuvo en agitación constante por 2 h a 4 °C para posteriormente centrifugar a 4°C y 6,000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante se desechó y la pastilla fue tratada como se describió con anterioridad. En esta ocasión el sobrenadante fue colectado. Este extracto fue rico en hidrolasas de pared celular. Se realizaron experimentos preliminares para detectar las condiciones en que las hidrolasas de pared celular se obtienen. El extracto conteniendo las hidrolasas de pared celular fue dializado, en tubos para diálisis (Spectra/Por 6 de 1kD), previamente lavados con EDTA (ácido etilendiamintetraacético) 1 mM, por 24 h a 4°C con agitación constante en un amortiguador de acetatos 0.05 M (pH 5.5); el extracto dializado se centrifugó a 6,000 rpm por 15 minutos a 4°C colectando el sobrenadante y almacenándolo a -20°C hasta su utilización, para la determinación de endoglucanasa.



### 3.4 Determinación de proteína

Para la determinación de proteína se utilizó el método de Lowry et al. (1951).

En un tubo de ensayo se colocaron 200  $\mu$ l de extracto enzimático de frijol (del utilizado para glucanasas) o 10  $\mu$ l (del utilizado para  $\alpha$ -amilasa), 1ml de solución C (que contiene  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2%, NaOH 0.4%, tartrato de potasio 0.16% y SDS 1% que constituyen la solución A; y  $\text{CuSO}_4 \cdot (5\text{H}_2\text{O})$  4% que es la solución B; mezcladas en una proporción (100:1) y agua destilada c.b.p 1.35 ml. La reacción se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Transcurrido éste tiempo se agregaron 100  $\mu$ l de reactivo de Folin, agitando e incubando nuevamente a temperatura ambiente por 30 minutos para desarrollar color. Se leyó a una longitud de onda de 660 nm en un espectrofotómetro.

El valor de absorbancia se interpoló en una curva patrón que se realizó con una solución estándar de seroalbúmina de bovino (SIGMA, A4503) dentro de un intervalo de 0-100  $\mu$ g/ml, siguiendo la técnica de Lowry para conocer los  $\mu$ g de proteína en la muestra.

### 3.5 Ensayo de glucanasas

El ensayo de glucanasas es una adaptación del método descrito por Suda & Buckeridge et al. (2003).

En un tubo de ensayo se hizo la mezcla de reacción conteniendo, 2.5 ml de extracto enzimático, CMC (carboximetilcelulosa) de alta viscosidad (SIGMA, C5013) al 2%, buffer de acetato de sodio 0.05 M (pH 5.5), NaCl 0.1 M y agua destilada c.b.p 10 ml. La mezcla fue incubada a 35 °C durante 16 horas, transcurrido éste tiempo se detuvo la reacción colocando los tubos en agua a ebullición por 20 minutos, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se determinaron los azúcares reductores por el método de Nelson-Somogyi (1989). <sup>Φ</sup>

---

<sup>Φ</sup> Con el fin de evaluar la cantidad de reductores iniciales presentes en la mezcla de reacción, ésta se preparó por duplicado, inactivando una de ellas inmediatamente después de la adición del extracto enzimático; dicha mezcla también será considerada como un control para el ensayo de viscosidad.

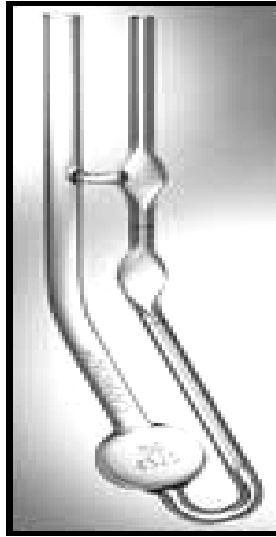
### 3.5.1 Determinación de azúcares reductores

La determinación de los azúcares reductores se realizó por el método de Nelson-Somogyi et al. (1989). La actividad enzimática de las glucanasas se midió en cada una de las mezclas de reacción incubadas en los ensayos de endoglucanasas anteriormente descritos.

En un tubo de ensayo se colocaron 500  $\mu$ l de la mezcla de reacción y 500  $\mu$ l de reactivo de cobre mezclado ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2.5%, tartrato doble de sodio y potasio 2.5%,  $\text{NaHCO}_3$  2.5% y  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  20% que constituyen la solución A; y  $\text{CuSO}_4 \cdot (5\text{H}_2\text{O})$  15% con 0.05% (v/v) de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado que constituyen la solución B; mezcladas en una proporción 24:1), se mezcló bien el contenido del tubo, se tapó y se colocó en agua a ebullición por 10 minutos, transcurrido este tiempo se enfrió en hielo y se agitó. Posteriormente se agregaron 500  $\mu$ l de reactivo de arsenomolibdato (molibdato de amonio 5%,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado 4.2% (v/v) y ortoarsenato disódico 0.6%) y 1 ml de agua desionizada. Los tubos fueron agitados hasta obtener un color estable a la vista. La reacción se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm. El valor obtenido de absorbancia se interpoló en una curva patrón que se realizó con una solución estándar de glucosa (SIGMA, G8270) dentro de un intervalo de 0-25  $\mu$ g/ml, siguiendo la técnica de Nelson-Somogyi (1989), para conocer los microgramos de reductores presentes en la muestra.

### 3.5.2 Ensayo de endoglucanasas

Se realizó un ensayo viscosimétrico, adaptación del método propuesto por Suda & Buckeridge et al. (2003); en el que se utilizó la mezcla de reacción preparada para los ensayos anteriormente descritos para glucanasas. Los cambios en viscosidad de las mezclas fueron medidos usando un viscosímetro de Ostwald de vidrio (Fig. 6), registrando el tiempo de flujo de cada mezcla de reacción, los cuales fueron comparados contra los controles negativos<sup>Ⓧ</sup> preparados bajo las mismas condiciones que los ensayos.



**Figura 6. Viscosímetro de Ostwald**

### **3.6 Ensayo de celulasa**

El ensayo se realizó con EnzChek®, el cual es un sustrato para celulasa provisto por Invitrogen (E33953), por lo que se hizo una adaptación de la técnica propuesta por éste proveedor para hacer una determinación colorimétrica.

Se disolvió el contenido del vial con EnzChek® en 1.86 ml de DMSO (dimetil sulfoxido) 50% y se transfirió a otro contenedor, se agregó 7.44 ml de buffer de acetatos 100 mM (pH 5.0), la solución se agitó, siendo ésta, la solución de sustrato. Esta solución debe de mantenerse protegida de la luz y almacenarse a una temperatura  $\leq -20$  °C.

La mezcla de reacción, se preparó colocando en un tubo Eppendorf color café, 500  $\mu$ l de la solución de sustrato y 500  $\mu$ l del extracto enzimático para endoglucanasas, mezclándolos bien para posteriormente dejar incubar la reacción por 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la reacción fue detenida introduciendo el tubo en agua a ebullición por 20 minutos, dejándolo enfriar a temperatura ambiente para poder leer la reacción a una longitud de onda de 360 nm en un espectrofotómetro.

El valor obtenido de absorbancia se interpoló en la curva patrón provista por el fabricante para conocer las unidades de celulasa / ml que contiene la muestra.

### 3.7 Aislamiento y purificación de pared celular

Se obtuvo pared celular de los cotiledones aislados de frijol seco y remojado (Quezada, 2005). Los cotiledones se homogenizaron en un mortero hasta obtener una harina fina y no grumosa.

Un gramo de la harina obtenida previamente, se incubó con 100  $\mu$ l de  $\alpha$ -amilasa termoestable (SIGMA, A3306) en 50 ml de una solución amortiguadora de fosfatos 0.08 M (pH 6.0) por 30 minutos a 95 °C, agitando a intervalos de 5 minutos, concluida la incubación se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó por 20 minutos a 10,000 rpm. La pastilla obtenida se resuspendió en 50 ml de buffer de fosfatos 0.08 M (pH 7.5), agregando 100  $\mu$ l de una solución (50 mg/ml) de proteasa (SIGMA, P3910) preparada inmediatamente antes de su uso, e incubando por 30 minutos a 60 °C; una vez terminada la incubación se realizó una centrifugación de 20 minutos a 10,000 rpm para retirar la proteasa restante en el sobrenadante; haciendo posteriormente dos lavados con agua desionizada agitando vigorosamente y centrifugando bajo las mismas condiciones. Finalmente la muestra se resuspendió nuevamente en 50 ml de buffer de fosfatos 0.08 M (pH 4.0), se agregaron 100  $\mu$ l de amiloglucosidasa (SIGMA, A9913) y se incubó por 30 minutos a 60 °C; al terminar la incubación la muestra se centrifugó a 11,000 rpm por 20 minutos desechando el sobrenadante y lavando la pastilla consecutivamente con agua desionizada, acetona y metanol-cloroformo (1:1 v/v), para obtener una fracción seca, enriquecida en paredes celulares.

#### 3.7.1 Obtención de la fracción celulósica

La fracción de pared celular obtenida anteriormente se trituró en un mortero hasta homogenizar el tamaño de partícula. De esta harina se tomaron 100 mg y se le agregaron 5 ml de una mezcla de buffer de acetatos 50 mM (pH 6.5) con 50 mM de CDTA (ácido ciclohexandiamintetraacético) para despectinizarla. La suspensión se agitó por 16 horas a temperatura ambiente. Después del tiempo transcurrido la mezcla se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se separó y la pastilla se resuspendió en 5 ml de agua destilada, volviendo a centrifugar y separando el

sobrenadante de la pastilla. A la muestra restante se le hizo una extracción de hemicelulosas, para lo cual la pastilla despectinizada fue resuspendida en un tubo de teflón en 5 ml de una solución de NaOH 4 M y borohidruro de sodio 20 mM (recién preparado); antes de cerrar el tubo de teflón se burbujeo con gas nitrógeno por 3 minutos y se agitó por 16 horas a 4 °C. Posteriormente se ajustó el pH de la solución a 5.0 con ácido acético y se centrifugó por 15 minutos a 11,000 rpm a 4 °C. El sobrenadante es una fracción rica en hemicelulosas y la pastilla es considerada la fracción celulósica obtenida de pared celular. La cual se secó a peso constante.

### **3.7.2 Hidrólisis de la fracción celulósica**

Anterior a la hidrólisis se eliminó el almidón del estrato celulósico sometiéndolo a un tratamiento con 26 unidades de  $\alpha$ -amilasa de páncreas de porcino (SIGMA, A6255) en 1 ml de un buffer de tris/HCl 0.1 M (pH 7.0) con 0.02 % de NaN<sub>3</sub>, dejando incubar por 24 horas a temperatura ambiente. Posterior a la incubación se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos desechando el sobrenadante. La pastilla obtenida se sometió nuevamente al tratamiento anteriormente descrito y una vez centrifugada se lavó con etanol y se secó a peso constante.

De la celulosa libre de almidón se realizó una hidrólisis enzimática para lo cual se pesó aproximadamente un miligramo de la fracción celulósica en un tubo Eppendorf, posteriormente se adicionó 1 ml de buffer de acetatos 0.05 M (pH 5.0) y se calentó en agua a 80 °C por 30 minutos, pasado este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregaron 2 mg de celulasa (SIGMA, C-7502), dejando incubar por 72 horas a 37 °C en un baño de agua con agitación orbital. Al término de la incubación la reacción se inactivó colocando los tubos en agua en ebullición por 20 minutos, una vez que se enfriaron a temperatura ambiente se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos, reservando el sobrenadante a 4 °C hasta su utilización, para la determinación de su composición química.

### 3.7.2.1 Determinación de azúcares reductores en la fracción de celulosa

La determinación de azúcares reductores se hizo por el método de Nelson-Somogyi et al. (1989), descrito anteriormente en la sección 3.5.1, realizando la reacción con 10 µl del hidrolizado de celulosa.

### 3.7.2.2 Determinación de glucosa

La glucosa se cuantificó enzimáticamente por medio de un kit de SIGMA (P7119), PGO (glucosa oxidasa/peroxidasa), haciendo una adaptación de la técnica descrita por el proveedor.

Se disolvió una cápsula de PGO en 100 ml de agua, siendo esta la solución de enzimas, a dicha solución se le agregó 1.6 ml de o-dianisidina 2.5 mg/ml, la solución-reacción. En un tubo Eppendorf color café, se preparó un blanco agregando 91 µl de agua, un estándar al cual se le agregaron 91 µl de una solución estándar de glucosa (SIGMA, G8270) a una concentración de 0.05 mg/ml y las muestras que se prepararon mezclando 18 µl de hidrolizado y 73 µl de agua destilada. A cada uno de los tubos se le adicionaron 136 µl de la solución-reacción de enzimas PGO, se agitaron por inversión y se incubaron a 37 °C por 35 minutos, al finalizar la incubación, se leyeron en un espectrofotómetro a una absorbancia de 450 nm, contra el blanco como referencia. Para calcular la cantidad de glucosa presente en el hidrolizado se utilizó la siguiente relación:

$$[\text{Glu}] = \frac{\text{Absorbancia (muestra)} \times \text{Dilución de la muestra} \times 0.05 \text{ mg/ml}}{\text{Absorbancia del estándar}}$$

### 3.7.2.3 Determinación de xilosa

La xilosa se cuantificó por medio de un kit de MEGAZYME (K-XILOSA 03/07), haciendo una adaptación de la técnica descrita por el proveedor.

En celdas de plástico de 1 cm, para espectrofotómetro, se agregaron 51 µl del hidrolizado, 1020 µl de agua destilada, 204 µl de la solución 1 del kit (buffer TEA 1 M pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 70 mM y 0.02% de azida de sodio), 204 µl de la solución 2 (NAD<sup>+</sup>/ATP 5 mg/ml y 50 mg/ml respectivamente) y 10.2 µl de la solución 3 (hexoquinasa 1000 U/ml). Una vez que se agregaron las soluciones anteriores, las celdas se taparon con parafilm y se agitaron por inversión suave, después de 5 minutos se leyó la absorbancia a 340 nm (A<sub>1</sub>). La reacción se continuó por adición de 10.2 µl de la solución 4 (β-xilosa deshidrogenasa 120 U/ml y xilosa mutarotasa 4.1 mg/ml) cubriendo nuevamente las celdas para agitar por inversión y después de 6 minutos se leyó nuevamente la absorbancia a 340 nm (A<sub>2</sub>).

La concentración de xilosa en la muestra se calculó determinando la diferencia de absorbancia (A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>) para el blanco y la muestra, restando posteriormente el blanco a la muestra para obtener el Δ<sub>AD-xilosa</sub>. La concentración de la D-xilosa se calculó con la siguiente relación:

$$[\text{xilosa}] = \frac{\text{Vol. final} \times \text{peso molecular xilosa} \times \Delta A_{D-xilosa}}{\text{coeficiente de extinción}_{\text{NADH a } 340\text{nm}} \times \text{diámetro celda} \times \text{vol. muestra}}$$

### 3.8 Ensayo de alfa-amilasa

Para el ensayo de α-amilasa se utilizó como sustrato amilopectina azure (SIGMA, A4640) la cual produce una reacción colorida que puede ser leída espectrofotométricamente. El ensayo se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante con algunas variaciones. En un tubo Eppendorf (protegido de la luz), se pesaron 18 mg de amilosa azure. La cual se disolvió en 500 µl de buffer de fosfato de potasio 20 mM (pH 7.0) con NaCl 50 mM y 500 µl del extracto enzimático para amilasas, mezclando bien para posteriormente dejar incubando a 37°C con agitación constante por 15 minutos, una vez transcurrido éste tiempo se detuvo la reacción agregando 400 µl de ácido acético 2.77 M y mezclando bien. La reacción se leyó a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro.

El valor obtenido de absorbancia se interpoló en una curva patrón que se realizó con una solución estándar de  $\alpha$ -amilasa (SIGMA, A6380) dentro de un intervalo de 0-0.25 unidades / ml, siguiendo la misma técnica para conocer las unidades  $\alpha$ -amilasa por mililitro presentes en la muestra.

### **3.9 Micrografías por microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Los cotiledones se prepararon inicialmente de acuerdo a lo descrito en la sección de preparación de muestras. Dejando secar las muestras húmedas a temperatura ambiente por 1 hora sobre un papel filtro. Posteriormente se realizó un corte transversal al cotiledón de aproximadamente 2 mm, el cual se fijó en un porta muestras con cinta adherible de carbón. El porta muestras se introdujo en un ionizador metálico para cubrir las muestras con una capa fina de oro. Una vez cubiertas con oro se llevaron a la plataforma del Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL/EO JSM-6390) para ser observadas utilizando un voltaje de 10 kV y distintos aumentos.



A continuación se muestra el diagrama general experimental que se siguió en el trabajo (Figura 7).

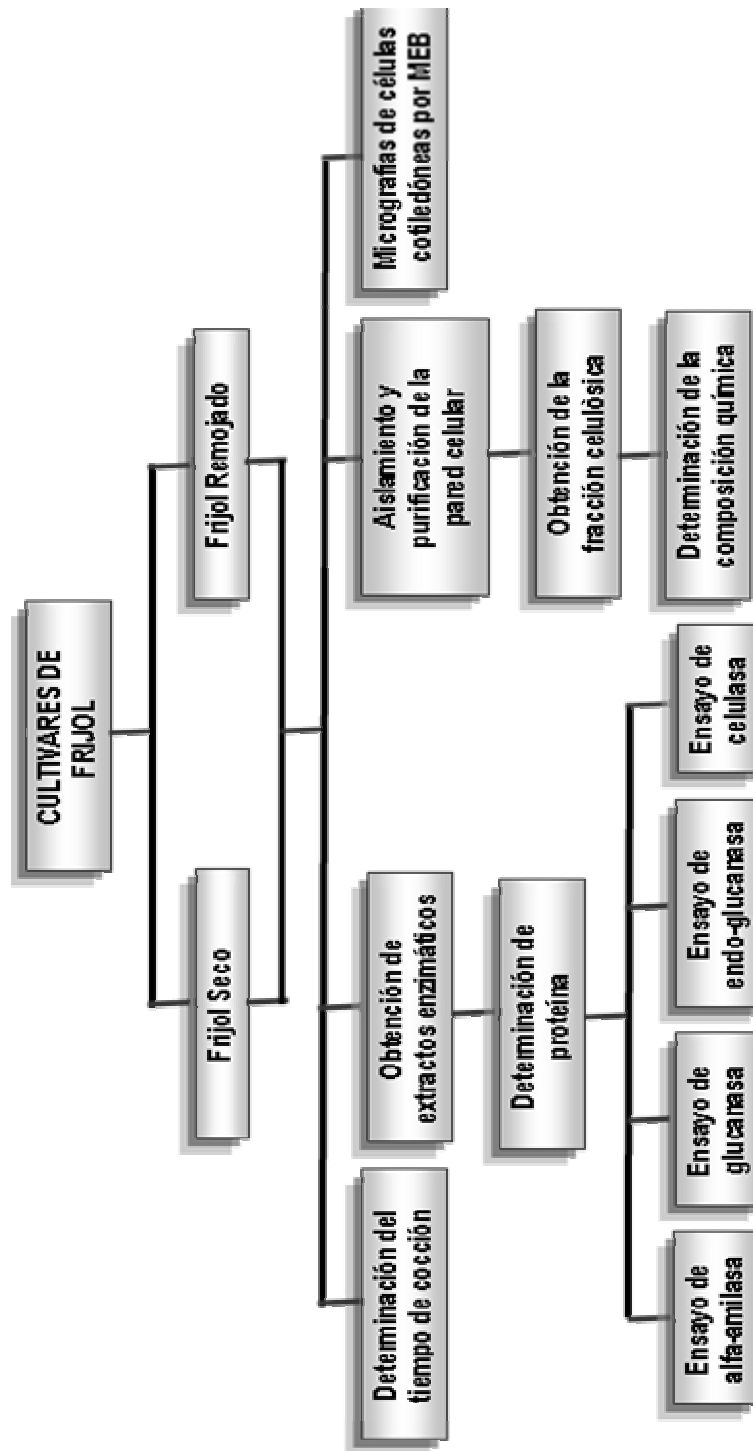


Figura 7. Diagrama general

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efecto del remojo en la calidad de cocción

El tiempo de cocción es uno de los parámetros de calidad culinaria más importantes (García, 1994). Debido a que para su procesamiento el frijol se somete a un periodo de remojo para reducir el tiempo de cocción, se ha sugerido que en esta etapa el frijol debe de sufrir cambios que facilitan su cocción (Blancas, 2001).

Para poder estudiar estos cambios se requiere contar con cultivares que presenten diferencias en su calidad culinaria, para lo cual se determinó el tiempo de cocción de tres cultivares de frijol, con y sin remojo (Tabla 1). Se encontró que las semillas sin remojo presentan un mayor  $TC_{50}$  que las semillas con remojo, en los tres cultivares: En todos los casos con diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ). La variedad en la que se refleja más el efecto del remojo es en la Flor de Mayo en la cual el  $TC_{50}$  disminuye cerca de un 70% con respecto al tiempo inicial. El frijol 2626 y el Bayo Mecentral también disminuyeron su tiempo de cocción, en un 40% y un 25% respectivamente.

**Tabla 1. Efecto del remojo en el tiempo de cocción**

| Variedad              | $TC_{50}$ (min)           |                         |
|-----------------------|---------------------------|-------------------------|
|                       | Sin remojo                | Con Remojo              |
| <b>Flor de Mayo</b>   | 124.00±12.96 <sup>a</sup> | 40.33±2.01 <sup>b</sup> |
| <b>2626</b>           | 112.67±11.59 <sup>a</sup> | 68.67±3.79 <sup>b</sup> |
| <b>Bayo Mecentral</b> | 91.50±6.18 <sup>a</sup>   | 68.50±4.02 <sup>b</sup> |

Los valores presentados son promedios de determinaciones triplicadas ± D. E.  
Diferente letra entre tratamientos indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

El tiempo de cocción depende del arreglo estructural que guardan varios componentes celulares como la pared celular, la lamela media y/o la abundancia del almidón en el momento que son sometidos al tratamiento térmico. Se sabe que el tiempo de cocción puede ser reducido si se somete a las semillas a un remojo; con lo cual se podría estar alterando la estructura de los componentes anteriormente nombrados y dicha alteración podría deberse a la activación y/o síntesis de enzimas presentes en la semilla, como podría ser el caso de las enzimas endo-(1-4)- $\beta$ -D-glucanasa y  $\alpha$ -amilasa.

## 4.2 Actividad de glucanasa

Se sabe que durante el proceso de imbibición (remojo) se activa el metabolismo de la semilla, lo que podría incrementar la actividad de algunas enzimas como las glucanasas que se han asociado a la degradación del xiloglucano y de la celulosa (Chanliaud et al., 2004). Para comprobar que la actividad de enzimas se incrementó con el remojo, se determinó la actividad de un extracto de hidrolasas de pared celular, entre las cuales se encuentran las glucanasas.

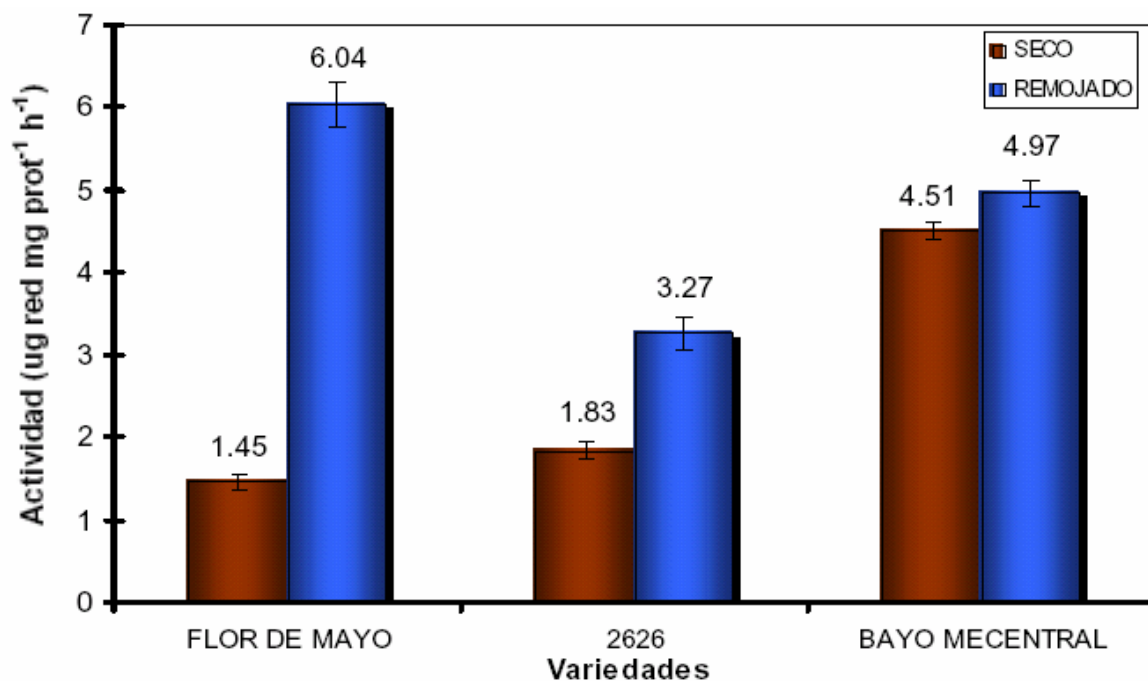
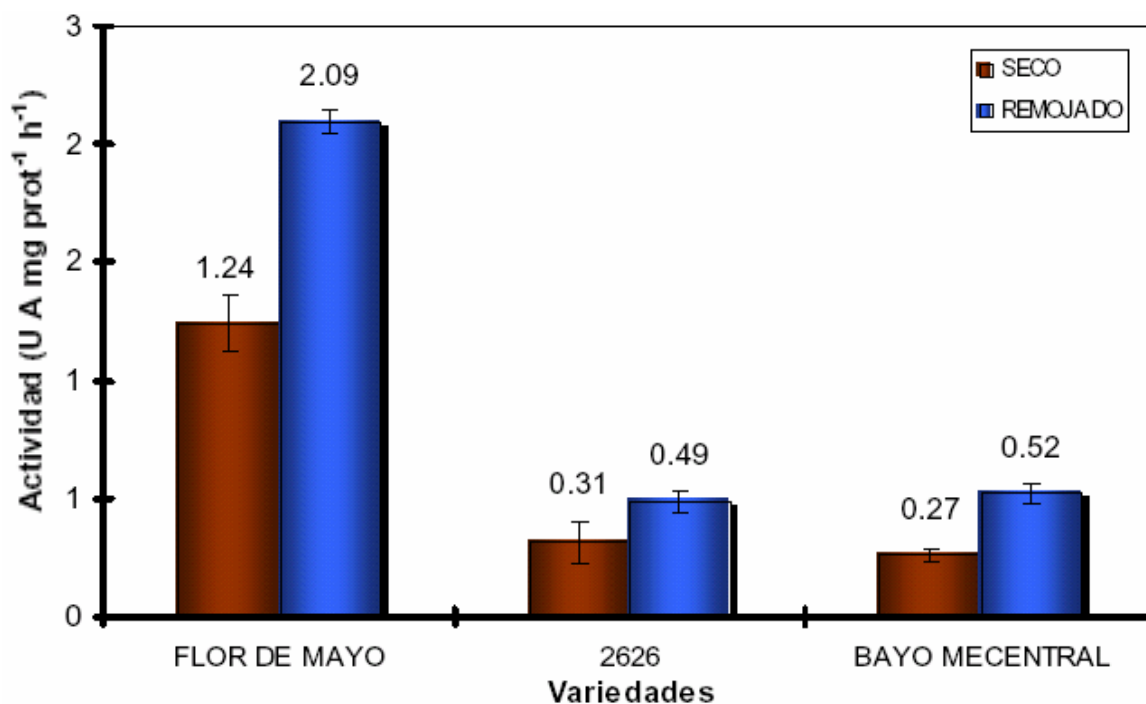


Figura 8. Efecto del remojo en la actividad de las glucanasas

Se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre la actividad del extracto obtenido de frijol seco y de frijol remojado. En los tres cultivares se detectó un incremento de la actividad cuando son sometidos a remojo. De los tres cultivares, el que presentó un mayor incremento de la actividad con respecto a la de la semilla seca, 4 veces el valor inicial, fue el Flor de Mayo. En el caso del 2626 aunque la magnitud no es tan grande como en el caso anterior, el incremento es casi del doble del valor inicial. Mientras que en el Bayo Mecentral la actividad de la enzima en la semilla seca fue mucho mayor que en los otros cultivares, pero el remojo no incrementó su actividad de manera significativa (Figura 8).

### 4.3 Actividad de endoglucanasa

Las exoglucanasas en general rompen enlaces glucosídicos con lo que provocan un incremento en los grupos reductores, sin embargo, las endo-glucanasas rompen en forma aleatoria los enlaces glucosídicos internos de los  $\beta$ -glucanos provocando además del incremento en los azúcares reductores una disminución rápida en la longitud de la cadena, éste tipo de actividad “endo” se manifiesta con una disminución en la viscosidad de las soluciones.



**Figura 9. Efecto del remojo en la actividad de endoglucanasa**

La Figura 9 representa la actividad de endoglucanasa de los extractos, medida como una UA (Unidad Arbitraria, definida en la tabla 5 del anexo) por miligramo de proteína por hora. Nuevamente se observa que la variedad Flor de Mayo es la que presenta una mayor actividad en comparación con las otras dos variedades, y que el remojo incrementa la actividad de las enzimas.

#### 4.4 Actividad de celulasa

Debido a que se ha reportado que tanto la endoglucanasa como la xiloglucanasa pueden actuar en regiones de celulosa como en moléculas de xiloglucano inespecíficamente (Chanliaud et al., 2004), fue necesario confirmar la actividad de la endoglucanasa por medio de un sustrato específico para celulasa, el cual no solo demostró la presencia de la enzima en el extracto sino que también corroboró el incremento de la actividad enzimática por efecto del remojo (Figura 10). Al igual que en la determinación de poder reductor y la actividad viscosimétrica quien tiene un mayor incremento en la actividad es el frijol Flor de Mayo, tres veces con respecto al valor inicial, además desde el inicio se revela la mayor presencia de celulasa en los cotiledones secos. Lo anterior también sucede en las otras dos variedades pero en proporciones menores.

La actividad específica y la actividad como celulasa concuerdan, si no bien en magnitud, si en el orden en que las variedades presentan una mayor actividad, Flor de Mayo, 2626 y Bayo Mecentral.

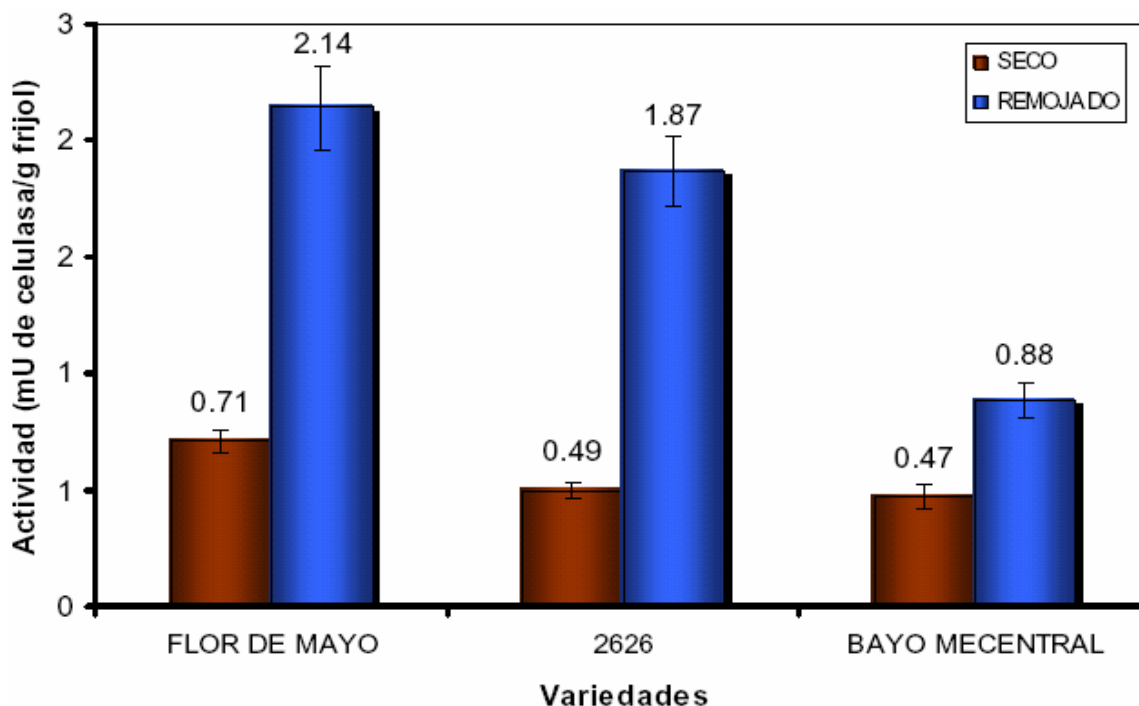


Figura 10. Efecto del remojo en la actividad de celulasa

#### 4.5 Composición de la fracción celulósica

Una forma de poder constatar la acción de la endoglucanasa *in situ* fue aislando la fracción celulósica y determinando su composición química antes y después de la hidratación.

Como se puede observar en la Tabla 2 en la primera columna aparecen los reductores totales, los cuales se utilizaron como un indicativo de la eficiencia de la hidrólisis, se puede observar también que hay mayor cantidad de reductores en la celulosa que proviene de frijol remojado en todos los casos, siendo el aumento de 32, 6 y 15% para Flor de Mayo, 2626 y Bayo Mecentral respectivamente.

La segunda columna corresponde a la cantidad de glucosa libre que se obtuvo después de hidrolizar a la fracción celulósica. La variedad 2626 reporta un incremento significativo en la cantidad de glucosa detectada después del remojo, en el Bayo Mecentral también se aprecia un incremento pero no es significativo, no así la variedad Flor de Mayo en donde después del remojo se detecta una menor cantidad de glucosa.

En la última columna se cuantificó la cantidad de xilosa presente, ya que aunque no es un constituyente de la celulosa si esta fuertemente asociado a ella. En este caso solo la celulosa proveniente de frijol Flor de Mayo presenta una diferencia significativa siendo menor la cantidad encontrada en la fracción proveniente del frijol remojado.

**Tabla 2. Composición de la fracción celulósica**

|                       | Reductores totales<br>(mg red / mg celulosa)* |                        | Glucosa<br>(mg glu / mg celulosa)* |                        | Xilosa<br>(mg xilosa / mg celulosa)* |                          |
|-----------------------|---|------------------------|------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
|                       | Seco  | Remojado               | Seco                               | Remojado               | Seco                                 | Remojado                 |
| <b>Flor de Mayo</b>   | 0.62±0.02 <sup>a</sup>                        | 0.82±0.02 <sup>b</sup> | 0.19±0.02 <sup>a</sup>             | 0.13±0.01 <sup>b</sup> | 0.018±0.005 <sup>a</sup>             | 0.009±0.003 <sup>b</sup> |
| <b>2626</b>           | 0.66±0.03 <sup>a</sup>                        | 0.70±0.02 <sup>a</sup> | 0.24±0.02 <sup>a</sup>             | 0.35±0.01 <sup>b</sup> | 0.023±0.004 <sup>a</sup>             | 0.017±0.002 <sup>a</sup> |
| <b>Bayo Mecentral</b> | 0.76±0.03 <sup>a</sup>                        | 0.88±0.02 <sup>b</sup> | 0.21±0.02 <sup>a</sup>             | 0.25±0.01 <sup>a</sup> | 0.039±0.004 <sup>a</sup>             | 0.039±0.002 <sup>a</sup> |

\* Base seca

Los valores presentados son promedios de determinaciones triplicadas ± D. E.

Diferente letra entre tratamientos indica diferencia significativa (p<0.05)

La glucosa y la xilosa están consideradas dentro los reductores totales

#### 4.6 Efecto del remojo en la actividad de la $\alpha$ -amilasa

Otro factor de importancia para la calidad culinaria es el almidón y por lo tanto aquello que lo pudiera estar alterando, es por esto que se determinó la actividad de la  $\alpha$ -amilasa en frijol seco y remojado. Al igual que en los cereales en donde solo se detecta actividad de esta enzima después de iniciada la germinación, en el frijol solo se encontró actividad después del remojo, antes de este no fue posible detectarla. Entre los cultivares estudiados, el que presenta una mayor actividad es el Flor de Mayo, comparado con los otros dos.

**Tabla 3. Efecto del remojo en la actividad de la  $\alpha$ -amilasa**

| Variedad              | Proteína<br>(mg / ml)  |                        | Actividad <sup>§</sup><br>(mU amilasa / mg prot * h) |          |
|-----------------------|------------------------|------------------------|--|----------|
|                       | Seco                   | Remojado               | Seco   | Remojado |
| <b>Flor de Mayo</b>   | 2.04±0.04 <sup>a</sup> | 1.62±0.26 <sup>b</sup> | ND   | 336±47   |
| <b>2626</b>           | 6.16±0.59 <sup>a</sup> | 4.76±0.25 <sup>b</sup> | ND   | 53±6.0   |
| <b>Bayo Mecentral</b> | 3.39±0.33 <sup>a</sup> | 5.18±0.32 <sup>b</sup> | ND   | 29±1.0   |

Diferente letra entre tratamientos indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

§ Los valores presentados son promedios de determinaciones triplicadas  $\pm$  D. E.

ND (no detectable)

1 unidad de amilasa libera 1.0 mg de maltosa de almidón en 3 min a pH 6.9 a 20 °C

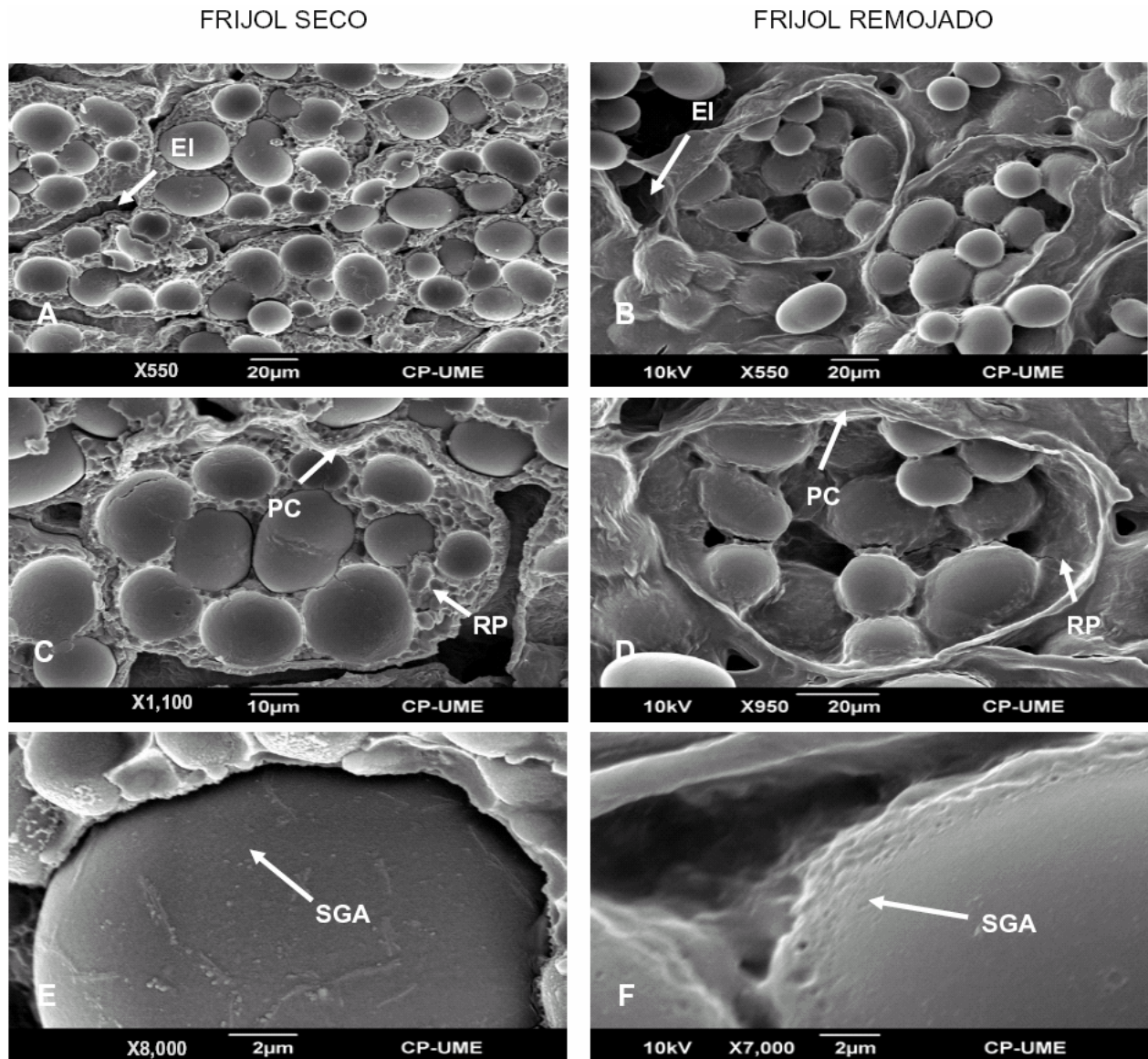
#### 4.7 Micrografías por MEB

Con la finalidad de identificar la estructura del citoplasma de las células de cotiledón del frijol y como ésta era modificada por el remojo se realizaron micrografías por medio de un microscopio electrónico de barrido de cada uno de los cultivares en las dos condiciones, antes y después del remojo (Figuras 11, 12, 13). En los cultivares sin remojo, lo primero que se observó fueron diferencias en las interacciones intercelulares. En Flor de Mayo, la separación celular fue muy definida y se observan espacios vacíos, en las esquinas de las células. El contorno de los cuerpos proteicos se distinguió perfectamente en la periferia de los gránulos de almidón (Fig.11). En 2626 no fue posible distinguir claramente el espacio intercelular. Ésta es una estructura mucho más

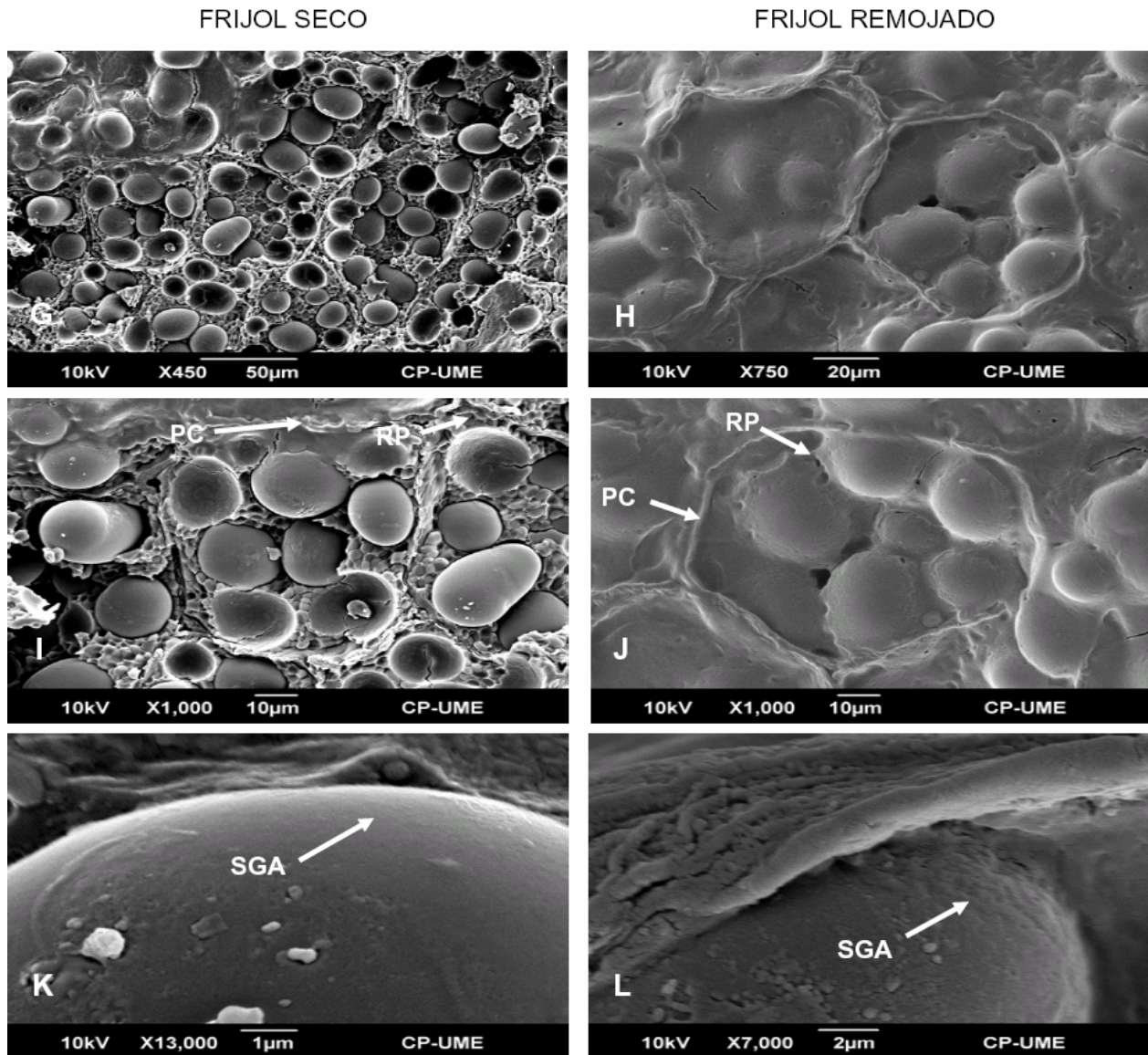
cerrada en donde los cuerpos proteicos parecen estar rodeando a cada uno de los gránulos. En este caso las células fueron más pequeñas que en el caso de los cultivares Flor de Mayo o 2626. El límite celular en Bayo Mecentral, solo está definido en algunas regiones y en otras parece que las células son continuas. Sorprendentemente, en este cultivar no se distinguen los cuerpos de proteína, aunque en su lugar se observan regiones amorfas y en algunos casos parecen cubrir a los almidones. Estas diferencias estructurales del citoplasma en la semilla seca podrían explicar, al menos en parte, las diferencias en la magnitud del efecto benéfico observado en los distintos cultivares. Cuando las semillas fueron hidratadas, en todos los cultivares se observó la desaparición de los cuerpos esféricos de las proteínas. Una vez hidratada la semilla, solo en el cultivar Flor de Mayo se conservó la definición celular y los gránulos permanecieron expuestos. En contraste, en 2626 y Bayo Mecentral no solo ya no se observaron los cuerpos proteicos o las regiones amorfas, sino que se observó una capa continua que cubrió a los almidones. Esta capa podría estar formada por la fusión de los cuerpos proteicos en una gran vacuola, en la que quedaron contenidos los almidones. Este recubrimiento podría estar actuando como una especie de aislante que dificulte la hidratación de los gránulos y quizás su gelatinización. Al momento del tratamiento térmico, las transiciones orden desorden del citoplasma en el cultivar FM, requerirían menos energía que las de 2626 o BM, reflejándose en la magnitud del efecto benéfico del remojo en el  $TC_{50}$ .

Con respecto a la superficie de los gránulos, Flor de Mayo después del remojo parece mostrar unas pequeñas muescas que podrían ser indicativos del ataque enzimático, lo que no sucedió con las otras dos variedades quienes mostraron proteína adherida e incluso una superficie hasta cierto punto cerosa como Bayo Mecentral, lo que sugiere poca probabilidad de que se lleve a cabo una hidrólisis enzimática.





**Figura 11. Micrografía electrónica de barrido del cultivar Flor de Mayo.** A la izquierda se presenta el frijol seco y a la derecha el frijol remojado. En A y B se puede observar el acomodo celular que es más cerrado en A y el EI (espacio intercelular) el cual es más pronunciado en B. En C y D se observa una sola célula en donde se puede distinguir la PC (pared celular) que pareciera estar más alisada en el frijol remojado (D), también se observa la RP (red proteica) que en el frijol seco (C) esta perfectamente definida contrariamente a lo que ocurre en el remojado en donde se pierde la estructura. E y F son acercamientos a la superficie de un gránulo de almidón (SGA), en donde E muestra una superficie lisa y F muestra pequeñas muescas, probable efecto de la alfa-amilasa.



**Figura 12. Micrografía del cultivar 2626.** En G y H se puede observar el acomodo celular que en comparación con el cultivar anterior es mucho más cerrado inclusive no puede señalarse con certeza el EI, en G no se puede distinguir adecuadamente el limite de cada una de las células en tanto que en H se marca un tanto mejor el limite celular. En I la PC se muestra rugosa al igual que la RP las cuales pierden su aspecto rugoso (J) con el remojo, la PC no se observa definida y la RP se muestra como una capa que pareciera estar cubriendo a los almidones. K muestra la SGA prácticamente lisa y en L se advierte una superficie carcomida.



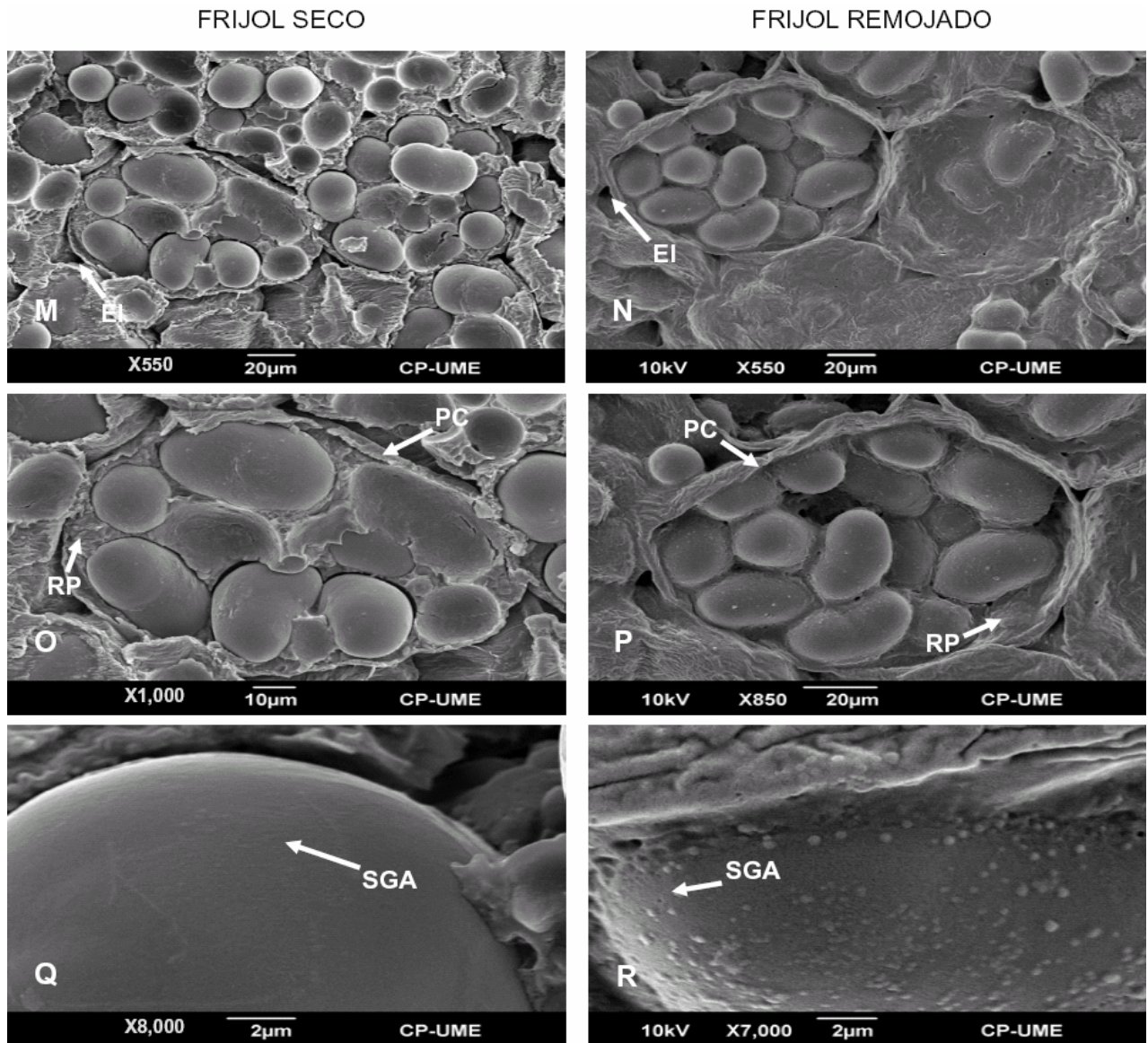


Figura 13. Micrografía del cultivar Bayo Mecentral. En M y N se puede observar el acomodo celular no tan compacto como en el caso anterior ya que se puede distinguir el EI pero no es posible definir completamente el límite celular sobre todo en M. En O se observa una sola célula en donde se puede distinguir la PC en su mayoría lisa y la RP poco definida, P también muestra una PC mayoritariamente lisa y una RP amorfa. La SGA mostrada en Q es totalmente lisa con apariencia cética mientras que R muestra una superficie que a pesar de ser granulosa no se aprecia alterada.

## 5. DISCUSIÓN

Debido a que los frijoles requieren de un prolongado tiempo de cocción para su consumo, se ha tratado de disminuir este defecto remojando a las semillas. Se ha reportado que cuando las semillas de frijol se hidratan, previo al tratamiento térmico, el tiempo que tardan en cocinarse disminuye significativamente. Lo anterior, también se demostró en este trabajo (Tabla 1). La magnitud de este efecto benéfico fue cultivar dependiente. El  $TC_{50}$  para FM-M38 disminuyó tres veces respecto del control, mientras que para 2626 y BM, esta disminución fue de tan solo 60 y 36 % respectivamente.

En la actualidad no se ha reportado un mecanismo que explique el fenómeno anterior por lo que en este trabajo se exploró un mecanismo enzimático que modificase las interacciones de y entre algunas de las moléculas responsables de la textura, de manera más específica la celulosa y el almidón.

La celulosa puede ser hidrolizada enzimáticamente por la endo-1,4- $\beta$ -glucanasa. Esta hidrólisis se ha asociado a la relajación de la pared celular durante la germinación y la maduración de los frutos.

En el extracto de hidrolasas de pared celular de cotiledones de frijol se identificaron al menos tres tipos de actividad de glucanasas: exoglucanasa (Fig. 8), endoglucanasa (Fig. 9) y una celulasa (Fig. 10). Llama la atención que la actividad de estas hidrolasas (máximo 6 U/ mg de proteína) sea relativamente baja, comparadas con las presentes en hongos, como es el caso de *Aspergillus* sp. K-27 para quien se ha reportado una actividad específica de 160 U / mg utilizando CMC como sustrato (Abe et al., 1999). Esto puede deberse a la diferente función que estas hidrolasas realizan en los organismos antes mencionados. En plantas las glucanasas de pared celular solo hidrolizan algunos enlaces glucosídicos para permitir el deslizamiento de las fibras de celulosa. Con lo cual disminuye la presión de turgor, el agua se transporta al interior de la célula, produciendo la elongación de la misma. Posteriormente se re-forman los enlaces glucosídicos y la pared celular readquiere sus propiedades iniciales (Levy et al., 2002; York et al., 2004). Mientras que en el caso de los hongos las hidrolasas son secretadas al medio ambiente para hidrolizar los polisacáridos de la pared celular hasta azúcares reductores, con la finalidad de ganar acceso a la planta e infectarla, o los

utiliza como fuente carbonada para su crecimiento (York et al., 2004). En todos los cultivares estudiados, el remojo de la semilla incrementó la actividad de estas enzimas. Sorprendentemente, la actividad de las tres glucanasas de pared celular presentó mayor actividad en las semillas remojadas que en las secas y en todos los casos la mayor actividad se detecta en Flor de Mayo y 2626, los cultivares en los que el remojo disminuyó de manera muy significativa el  $TC_{50}$ . Aparentemente, hay una relación ( $r = 0.985977$ ) entre la magnitud del decremento en el tiempo de cocción ( $TC_{SR}-TC_{CR}$ )<sup>1</sup> inducido por el remojo de la semilla y el incremento en la actividad de las glucanasas ( $AG_{CR}-AG_{SR}$ )<sup>2</sup> durante el mismo tratamiento (Tabla 7), siempre y cuando la actividad de estas enzimas se cuantifique como reductores totales. Lo anterior sugiere que las glucanasas de la pared celular modifican *in situ* la celulosa de las semillas de frijol. Para demostrar lo anterior se determinó la estructura de la celulosa de manera indirecta, cuantificando su susceptibilidad a hidrólisis por celulasa comercial. Se sabe que las áreas cristalinas de la celulosa forman una matriz muy compacta que protegen a algunos de los enlaces glucosídicos del ataque enzimático (Levy et al., 2002). Debido a que la hidrólisis de la celulosa, extraída de frijol remojado fue mayor que la extraída de frijol seco (Tabla 2), se sugiere que durante el proceso de imbibición, la celulosa sufrió cambios estructurales que la hicieron más susceptible al ataque enzimático. En las plantas, la estructura de la celulosa en la pared celular solo se modifica de manera enzimática por lo que el resultado anterior solo se puede explicar a través de la acción *in situ* de las glucanasas o celulasa detectadas en la pared celular del frijol.

Si consideramos a la variedad Flor de Mayo, como aquella que después de la hidratación de las semillas presenta la mayor actividad en los tres ensayos realizados, se podría pensar que al estar más activas sus enzimas contribuyeron a indicar que esta mayor actividad de las glucanasas produjo a un cambio más notable en la microestructura, lo que permitió hacer más laxa a la pared, facilitando no solo el fraccionamiento sin arrastrar restos de otros polisacáridos, sino también permitiendo que la hidrólisis se llevara a cabo más fácilmente. Lo anterior sería congruente con los resultados obtenidos para  $TC_{50}$  en donde Flor de Mayo es quien disminuye un mayor

<sup>1</sup> (Tiempo de cocción sin remojo – Tiempo de cocción con remojo)

<sup>2</sup> (Actividad de glucanasas con remojo – Actividad de glucanasas sin remojo)

---

número de veces ( $\approx 3$ ) su tiempo de cocción. Otra forma en que el remojo podría tener efecto en la fracción de celulosa es a través de modificar su interacción con la matriz no celulósica (pectinas y hemicelulosas). Sin embargo, esta suposición resulta menos probable, puesto que, al menos por microscopia electrónica no se detectan cambios estructurales en la pared celular de cotiledones remojados en comparación con los no remojados (Shomer et al., 1990).

La baja correlación entre la magnitud del incremento en la actividad de las glucanasas y el de la disminución en  $TC_{50}$  podría explicarse si se considera que en la pared celular se encuentran otras fracciones, como las pectinas y las hemicelulosas, que al igual que la celulosa tienen incidencia en la textura de las semillas y que con el remojo también modifican su arreglo molecular (Ibáñez, 2009; Martínez, 2003) contribuyendo así a que la pared celular de la semilla remojada sea más laxa que la seca.

Por otro lado se consideró determinar la actividad de la alfa-amilasa debido a que se trata de una enzima que hidroliza los enlaces  $\alpha(1,4)$  del almidón, el cual es un componente de importancia en la textura de la semilla del frijol debido a su abundancia (50% del peso aproximadamente). El almidón además está interactuando con la pared celular ya que aquel que está más íntimamente ligado a dicha estructura es el que conforma la fracción de almidón resistente y por tanto no digerible. Por lo que se puede sugerir que si el remojo vuelve laxa la pared celular disminuye la interacción que hay entre esta estructura y los gránulos de almidón volviéndolo así más disponible no solo a un probable ataque enzimático durante la imbibición sino que también podría hidratarse y gelatinizarse más fácilmente durante la cocción lo que también contribuiría a la disminución en el  $TC_{50}$  observada. Como lo señala Würsch (1986) la alfa-amilasa no puede penetrar fácilmente debido al impedimento estérico y a la naturaleza física del grano de almidón leguminoso, sin embargo cualquier disrupción de las células especialmente antes de la cocción incrementaría la susceptibilidad del almidón a la digestión enzimática.

Como ya se mencionó, el proceso de imbibición puede considerarse semejante al de germinación, el cual en su primera fase involucra una rápida absorción de agua, activando de esta forma la maquinaria metabólica que prepara a la semilla para germinar.

En las semillas dicotiledóneas como el frijol, el almidón es utilizado como un polisacárido de reserva que permite al embrión crecer, pero para que pueda ser utilizado es necesario que sea hidrolizado para lo que se requiere de enzimas como la alfa-amilasa, la cual se sabe esta activa durante la germinación por lo que se esperaría que durante el proceso de remojo del frijol esta enzima también se encuentre activa. Es por esto que se determinó la actividad de la alfa-amilasa antes y después del remojo encontrándose solo después de la hidratación lo que indica que se sintetizó durante el proceso, en todas las variedades estuvo presente, siendo el frijol Flor de Mayo quien presentó una actividad mayor.

Para demostrar la acción de alfa amilasa *in situ* fue preciso recurrir a un análisis microscópico para examinar el citoplasma de las células del cotiledón antes y después de la imbibición. Desafortunadamente, los gránulos de almidón no presentaron modificaciones que pudieran ser interpretadas como efecto de la alfa amilasa. En contraste, la imbibición indujo la pérdida de la estructura de los cuerpos proteicos y se formó una malla continua que cubrió a los gránulos de almidón. Una posibilidad es que la malla esté formada por la anastomosis de los cuerpos proteicos y la activación de las proteasas encargadas de hidrolizar a las proteínas de reserva localizadas en los cuerpos proteicos. También llama la atención el hecho de que en el caso de BM, la malla que cubre los gránulos de almidón esté formada aún antes del remojo, lo que puede ser consecuencia de la carga genética de cada cultivar, o de las condiciones de manejo poscosecha. Esto último parecería más probable en el caso de BM, ya que en estas micrografías no se detectaron los cuerpos proteicos ni en estado seco.

Las diferencias estructurales en el citoplasma de las semillas secas entre variedades podrían explicar su distinto comportamiento durante los ensayos, aunque esta explicación no aplica para las semillas remojadas, ya que en todos los casos se observó una malla que cubre a los almidones.

Con respecto a la superficie de los gránulos, Flor de Mayo después del remojo parece mostrar unas pequeñas muescas que podrían ser indicativos del ataque enzimático, lo que no sucedió con las otras dos variedades quienes mostraron proteína adherida e incluso una superficie hasta cierto punto cerosa como Bayo mecentral que sugiere poca probabilidad de que se lleve a cabo una hidrólisis enzimática.

## 6. CONCLUSIONES

- ▶ El remojo disminuyó el tiempo de cocción.
- ▶ Con la imbibición se incrementó la actividad de varias enzimas hidrolíticas de la pared celular: exo y endo (1-4)- $\beta$ -glucanasas y celulasas; y del citoplasma, las  $\alpha$ -amilasas.
- ▶ Las endo (1-4)- $\beta$ -glucanasas modificaron la estructura de la celulosa.
- ▶ La celulosa extraída de frijol remojado es un mejor sustrato para la celulasa de *Aspergillus niger*.
- ▶ La estructura del gránulo de almidón se mantuvo después del remojo.



## 7. PERSPECTIVAS

Para identificar cual de las actividades enzimáticas de pared celular y cual de las modificaciones en los polisacáridos de la misma estructura, contribuyen más en la modificación estructural de la pared celular del frijol durante el remojo, sería necesario realizar un análisis estadístico de componentes principales, en el que se consideren no solo la celulasa y la amilasa, sino también otras enzimas estudiadas en trabajos anteriores como la poligalacturonasa, ramnogalacturonasa y las hemicelulasas, para que dicho estadístico indique cual de ellas es la de mayor importancia. Este estudio también debe considerar los cambios de los polisacáridos reportado en este y otros trabajos (Ibáñez, 2009; Martínez, 2006)

Debido a que se observo que la alfa amilasa está presente durante el remojo pero parece no estar actuando *in situ*, se sugiere que se realicen estudios que permitan destruir al inhibidor de dicha enzima previo al remojo o una vez que la semilla ha sido remojada, aplicar un calentamiento de 60 °C por algunos minutos, previo a la cocción, ya que se ha demostrado que la actividad de la alfa amilasa es resistente a esta temperatura pero el inhibidor se destruye (Hideki et al., 2000), con lo cual se permitiría la modificación de los gránulos de almidón. Desde el punto de vista tecnológico la propuesta anterior resulta muy interesante, pues de resultar positiva, disminuiría el gasto de combustible pues el frijol requeriría menor tiempo de cocción.

---

**8. BIBLIOGRAFÍA CITADA**

- Abe J., Nakanishi T. & Hizukuri S. (1999). Characterization of Endo- $\beta$ -1,4-Glucanase and  $\beta$ -Glucosidase from *Aspergillus* sp. K-27. *J. Appl. Glycosci.*, Vol. 46, No. 4, pp. 465-468.
- Acosta G. J. A. & Pérez H. P. (2003). Situación del cultivo de frijol común en México, producción e investigación. [en línea]  
<<http://www.cnpaf.embrapa.br/publicacao/seriedocumentos/anais/palestras/mesa1a.pdf>> [consulta 03 junio 2008]
- Bernal L. I. 2004. "Eventos moleculares asociados al endurecimiento del frijol", en Cuaderno de posgrado de Bioquímica vegetal, ed. Jorge Vásquez Ramos. UNAM, Pág.129-139.
- Besnier R. F. 1989. Semillas, Biología y Tecnología. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, Pág. 37-38, 184-185, 189.
- Blancas, V. H. 2001. Estudio de las modificaciones en la pectina que ocurren durante el remojo de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., Pág. 1-12.
- Brett C. & Waldron K. 1990. Physiology and Biochemistry of Plant cell walls. Ed. Unwin Myman. London, Pág.33
- Carmona G. R., Osorio D. P., Agama A. E., Tovar J. & Bello P. L. A. (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.
- Chanliaud E., De Silva J., Strongitharm B., Jeronimidis G. and Gidley M. J. (2004) Mechanical effects of plant cell wall enzymes on cellulose/xyloglucan composites. *The Plant Journal*, 38, 27-37.
- Cosgrove D. J. (1999). Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50:391-417
- Fennema O. R. 2000. Química de los alimentos 2ª edición. Ed. Acribia. Pág. 228-232, 588-590
- Flores V. E. 1999. La Planta estructura y función. Vol. 1 libro Universitario Regional, Costa Rica. Pág. 115-144.

- García, H. E. R. 1994. Diferencia entre el frijol silvestre y domesticado en atributos morfológicos y en su respuesta al almacenamiento inadecuado de la semilla. Tesis Maestría, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México, Pág. 4-5, 11-15,
- García, H. E. R. y Peña V. C. B. 1995. La pared celular. Componente fundamental de las células vegetales. Primera edición. Universidad Autónoma Chapingo. México, Pág. 16-55
- Hideki Y., Makoto K., Chie T., Tsuneo I. & Macoto K. (2000) Termal stability and digestibility of alpha-amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* cultivar Tora. Journal of the Japanese Society for food Science and Technology. Vol. 47 No. 2 pp. 158-162.
- Ibáñez L. Y. 2009. Detección de hemicelulasas y su participación en la calidad culinaria de las semillas de frijol. Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., Pág. 42-50.
- Invitrogen. Enzchec<sup>®</sup> Cellulase Substrate [en línea]  
<<http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp33953.pdf>> [consulta 18 septiembre 2007].
- Levy I., Shani Z. & Shoseyov O. (2002) Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4- $\beta$ -glucanase-binding domains. Biomolecular Engineering 19:17-30.
- Marconi E., Ruggeri S., Cappelloni M., Leonardo D. and Carnovale E. (2000) Physicochemical, Nutricional and Microstructural Characteristics of Chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Following Microwave Cooking. J. Agric. Food Chem., vol. 48, No. 12, 5986-5994.
- Martínez, A. V. 2003. Relación entre la actividad de la poligalacturonasa y la calidad de cocción del frijol. Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., Pág. 21-22, 27-28.
- Matthews R. H. 1989. Legumes: Chemistry, technology and human nutrition. Ed. Borrad, New York. Pág. 187-196.
- MEGAZYME. K-xylose [en línea]  
<[http://www.olympus.de/analytical\\_technology/images/K-XYLOSE.pdf](http://www.olympus.de/analytical_technology/images/K-XYLOSE.pdf)> [consulta 26 agosto 2008]
- Minic Z. & Jouanin L. (2006) Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation. Plant Physiology and Biochemistry, 44:435-449.

- Muller H. G. y Tobin G. 1990. Nutrición y ciencia de los alimentos. Ed. Acribia, España, Pág. 11-15, 142-146.
- Nidetzky B. & Steiner W. (1993). Approach for modeling cellulase-cellulose adsorption and the kinetics of the enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Biotechnol. & Bioeng.* 42:469-479.
- Pujolà M., Farreras A. & Casañas F. (2007) Protein and starch content of raw, soaked and cooked beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry* 102:1034-1041.
- Quezada, M. Y. 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 maestría, UNAM, México, D.F., Pág. 12-21.
- Rehinan Z., Rashid M. & Shah W. (2004) Insoluble dietary fibre components of food legumes as affected by soaking and cooking processes. *Food Chemistry* 85: 245-249.
- SAGARPA e InCARural. 2002. Plan Rector. Sistema Nacional. Frijol. [en línea] <<http://www.amsda.com.mx/PRNacionales/Nacionales/PRNfrijol.pdf>> [consulta 15 junio 2008].
- Shiga T. M., Lajolo F. M. & Filisetti T. M. C. C. (2003) Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris*). *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 23(2), 141-148.
- 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.
- Shiga T. M. & Lajolo F. M (2006) Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) – composition and structure. *Carbohydrate Polymers* 63 1-12.
- Shomer I., Paster N., Lindner P. & Vasiliver R. (1990). The role of cell wall structure in the hard-to-cook phenomenon in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Structure*. 9: 139-149.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [en línea] <<http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>> [consulta 17 mayo 2008]

- <[http://w4.siap.gob.mx/sispro/IndModelos/SP\\_AG/Frijol/Descripcion.pdf](http://w4.siap.gob.mx/sispro/IndModelos/SP_AG/Frijol/Descripcion.pdf)>  
[consulta 15 junio 2008].
- SIGMA. Amylose Azure [en línea]  
<[http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General\\_Information/amylose\\_azure\\_suitability.Par.0001.File.dat/amylose\\_azure\\_suitability.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/amylose_azure_suitability.Par.0001.File.dat/amylose_azure_suitability.pdf)> [consulta 18 septiembre 2007].
- PGO Enzymes [en línea]  
<<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/datasheet5/p7119dat.Par.0001.File.tmp/p7119dat.pdf>> [consulta 13 febrero 2007].
- Stolle-Smits A. 1998. Effects of thermal processing on cell walls of green beans: a chemical and ultrastructural study. Katholieke Universiteit Nijmegen, Wageningen. [en línea]  
<[http://webdoc.ubn.kun.nl/mono/s/stolle-smits\\_a/effeofthp.pdf](http://webdoc.ubn.kun.nl/mono/s/stolle-smits_a/effeofthp.pdf)>  
[consulta 29 enero 2008].
- Suda C. N. K., Buckeridge M. S. & Giorgini J. F. (2003) Cell wall hydrolases in the seeds of *Euphorbia heterophylla* L. during germination and early seeding development. Brazilian Journal Plant Physiology 15(3), 135-143.
- Taiwo K. A., Akanbi C. & Ajibola O. O. (1997) The Effects of Soaking and Cooking Time on the Cooking Properties of Two Cowpea Varieties. Journal of Food Engineering 33 337-346.
- Vargas T. A., Osorio D. P., Agama A. E., Morales F. L. y Bello P. L. A. (2006) Digestibilidad del almidón en diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Interciencia, VOL. 31, No. 12, 881-884.
- Voet D. & Voet J. G. (2000). Bioquímica. Ed. Omega. Pág. 273-276.
- Walstra Pieter. 2003. Physical Chemistry of Foods. Ed. Pearson, NY, Pag. 187.
- Waldron K. W., Parker M. L. & Smith A. C. (2003). Plant Cell Walls and Food Quality. Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety, Vol. 2, 101-116.
- Würsch P., PhD, Del Vedovo S. and Koellreutter B. (1986) Cell structure and starch nature as key determinants of the digestion rate of starch in legume. The American Journal of Clinical Nutrition 43:January, pp 25-29.

York W. S., Qin Q. & Rose J. K. C. (2004). Proteinaceous inhibitors of endo- $\beta$ -glucanases. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1696 223-233.

## ANEXO

Tabla 4. Actividad de glucanasa

| Variedad              | Proteína<br>(mg / ml)        |                              | Actividad <sup>§</sup><br>( $\mu$ g red / mg prot * h) |                              |
|-----------------------|------------------------------|------------------------------|--|------------------------------|
|                       | Seco                         | Remojado                     | Seco   | Remojado                     |
| <b>Flor de Mayo</b>   | 0.21 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> | 0.16 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup> | 1.45 $\pm$ 0.09 <sup>A</sup>                           | 6.04 $\pm$ 0.28 <sup>B</sup> |
| <b>2626</b>           | 0.43 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup> | 0.50 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup> | 1.83 $\pm$ 0.11 <sup>A</sup>                           | 3.27 $\pm$ 0.20 <sup>B</sup> |
| <b>Bayo Mecentral</b> | 0.28 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup> | 0.37 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup> | 4.51 $\pm$ 0.09 <sup>A</sup>                           | 4.97 $\pm$ 0.16 <sup>B</sup> |

<sup>§</sup> Los valores presentados son promedios de determinaciones triplicadas  $\pm$  D. E.  
Diferente letra entre tratamientos indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

Tabla 5. Actividad de endoglucanasa

| Variedad              | Actividad <sup>§</sup><br>(UA / mg prot * h) |                              |
|-----------------------|--|------------------------------|
|                       | Seco   | Remojado                     |
| <b>Flor de Mayo</b>   | 1.24 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>                 | 2.09 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup> |
| <b>2626</b>           | 0.31 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>                 | 0.49 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup> |
| <b>Bayo Mecentral</b> | 0.27 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>                 | 0.52 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup> |

<sup>§</sup> Los valores presentados son promedios de determinaciones triplicadas  $\pm$  D. E.  
UA =  $\Delta$ CP (control – reacción)  
Diferente letra entre tratamientos indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

Tabla 6. Actividad de celulasa

| Variedad              | Actividad <sup>§</sup><br>(mU celulasa / g frijol) |                        |
|-----------------------|--|------------------------|
|                       | Seco   | Remojado               |
| <b>Flor de Mayo</b>   | 0.71±0.05 <sup>a</sup>                             | 2.14±0.18 <sup>b</sup> |
| <b>2626</b>           | 0.49±0.04 <sup>a</sup>                             | 1.87±0.15 <sup>b</sup> |
| <b>Bayo Mecentral</b> | 0.47±0.05 <sup>a</sup>                             | 0.88±0.08 <sup>b</sup> |

<sup>§</sup> Los valores presentados son promedios de determinaciones triplicadas ± D. E.

Diferente letra entre tratamientos indica diferencia significativa (p<0.05)

1 unidad de celulasa libera 1.0 μ mol de glucosa de celulosa en 1 hora a pH 5.0 a 37 °C

Tabla 7. Coeficientes de correlación del TC<sub>50</sub> con las actividades enzimáticas

|                        | Actividad de<br>glucanasas | Actividad de<br>endoglucanasas | Actividad de<br>celulasas | Actividad de<br>α-amilasa |
|------------------------|----------------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>TC<sub>50</sub></b> | 0.985977                   | 0.816301                       | 0.628016                  | 0.924990                  |