

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

---

“Influencia de los niveles de actividad de la B-D-glucanasa y de la  
ramnogalacturonasa en el tiempo de cocción de diversos genotipos de  
frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)”

**T E S I S**

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

**PRESENTA  
ARIEL HERNÁNDEZ PÉREZ**

**MÉXICO, D.F.**

**de 2010**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Irma Ofelia Bernal Lugo

**VOCAL:** Hermilo Leal Lara

**SECRETARIO:** María Eugenia Torres Márquez

**1er. SUPLENTE:** Gloria Díaz Ruiz

**2° SUPLENTE:** Perla Deyanira Maldonado Jiménez

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Facultad de Química,  
edificio E, departamento de Bioquímica, laboratorio 104.

**ASESOR DEL TEMA:**

**Irma Ofelia Bernal Lugo**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**Carmen Jacinto Hernández**

**SUSTENTANTE:**

**Ariel Hernández Pérez**

## AGRADECIMIENTOS

---

**“El éxito no solo es de quien lo busca,  
es también de quienes ayudan a alcanzarlo”**

- Agradezco a Dios por haber puesto en mi camino un ejercito de personas increíbles y muy valiosas que han estado y estarán siempre conmigo ayudándome a vencer los obstáculos y pruebas que me salgan al paso.
- A la UNAM que desde hace 12 años me abrió sus puertas y adoptó en sus aulas.
- A la Facultad de Química que ha sido mi hogar estos últimos años.
- A la Dra. Bernal por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, su tiempo, su dedicación, sus consejos y sus enseñanzas.
- A mis compañeros del Lab-104 y a todos los compañeros del conjunto E de la FQ con los que conviví durante este tiempo.
- A la Dra. Carmen Jacinto y al INIFAP por proporcionarnos el material biológico necesario para la realización de este trabajo.
- A la Q. Laurel Fabela por las facilidades y el apoyo técnico.
- Agradezco al colegio de profesores de la Facultad de Química y a la sección 024 de la AAPAUNAM por el apoyo otorgado mediante la cátedra “Ángela Sotelo López”

- A mis padres que me han dado su confianza y las herramientas necesarias para alcanzar mis metas. Muy a su manera me han ayudado a ser una mejor persona, me han sabido escuchar, orientar y están siempre al pendiente de mí.
- A mi familia de quienes tanto he aprendido y aunque no todos pueden acompañarme hoy, siempre me respaldan, animan y de quienes tengo y siempre tendré su cariño e incondicional apoyo.
- A Joel, Paloma, Pollo, Ale, Alex, Jenny, Narmi, David, Lupis, Dianis, Sara, Maga, a Clau, a su familia, a todos mis amigos y personas especiales que nunca me han dejado solo y están conmigo en mis mejores y peores momentos para animarme, escucharme, acompañarme y aconsejarme.
- A Dana, Ame y Caro que sin dudarlo siempre me ayudaron en lo que necesitara y durante todo este tiempo han sido mi equipo y mi apoyo dentro y fuera de clases.
- A Dany que además de ponerme a estudiar contra mi voluntad, a pesar de mis reclamos y recordarme que tenía que hacer mis tareas y trabajos, ha sido una persona especial en mi vida.
- A los excelentes maestros que he tenido en especial a Marco Talavera, Oscar Rendón, Pedro Villanueva, Antonio Segura, Guillermo Delgado, Rodolfo Fonseca, Lucia Cornejo y a la Dra. Bernal, que más que enseñarme las cosas que aprendieron de los libros, compartieron las cosas que han aprendido de la vida, sus filosofías, su forma de ver las cosas y de enfrentar los problemas.
- Y finalmente quiero agradecer a esa persona especial que aunque pocas veces vi, su recuerdo me acompañó en mis largas noches de desvelo, en las pruebas y decisiones más difíciles de mi carrera y mi vida, siempre dándome la tranquilidad, paciencia, el impulso y el ánimo necesarios para seguir adelante. ¡Gracias Irene!

## ÍNDICE.

---

### Capítulo I:

Introducción.....	7
-------------------	---

### Capítulo II: Antecedentes.

2.1. Importancia del frijol en México.....	9
2.2. Nutrientes del frijol.....	10
2.3. Características del frijol.....	11
2.4. Inconvenientes para el consumo de la semilla.....	11
2.5. Procesamiento de la semilla.....	12
2.6. Proceso de remojo.....	13
2.7. Proceso de cocción.....	13
2.8. Pared celular.....	14
2.8.1. Función y estructura.....	14
2.8.2. Polisacáridos de la pared celular.....	16
2.8.3. Proteínas en la pared celular.....	19
2.9. Antecedentes inmediatos del proyecto.....	21

### Capítulo III:

3.1. Objetivo.....	22
3.2. Hipótesis.....	23

## **Capítulo IV: Metodología.**

<b>4.1. Determinación del tiempo de cocción.....</b>	<b>23</b>
<b>4.2. Preparación de la semilla.....</b>	<b>24</b>
<b>4.3. Obtención de la harina.....</b>	<b>24</b>
<b>4.4. Preparación del extracto enzimático.....</b>	<b>25</b>
<b>4.5. Determinación de proteína.....</b>	<b>25</b>
<b>4.6. Ensayo de glucanasa.....</b>	<b>26</b>
<b>4.7. Determinación de azúcares reductores.....</b>	<b>27</b>
<b>4.8. Actividad de Ramnogalacturonasa.....</b>	<b>29</b>
<b>4.9. Secado de semillas.....</b>	<b>29</b>
<b>4.10. Determinación de humedad.....</b>	<b>29</b>
<b>4.11. Tratamiento estadístico.....</b>	<b>30</b>
<b>4.12. Diagrama de la metodología.....</b>	<b>30</b>

## **Capítulo V: Resultados**

<b>5.1. Determinación de los tiempos de cocción.....</b>	<b>31</b>
<b>5.2. Determinación de proteína.....</b>	<b>35</b>
<b>5.3. Determinación de la actividad de Glucanasas y Ramnogalacturonasa.....</b>	<b>37</b>
<b>5.4. Deshidratación de semillas remojadas.....</b>	<b>43</b>

## **Capítulo VI: Conclusiones y bibliografía.**

<b>6.1. Conclusiones.....</b>	<b>46</b>
<b>6.2. Bibliografía.....</b>	<b>48</b>

## I. INTRODUCCIÓN

---

El frijol, es un cultivo tradicional en México que se siembra en todas las regiones agrícolas del país, además es un alimento típico de la comida mexicana y reconocido a nivel mundial.

Su consumo en México abarca todos los estratos sociales, especialmente, las clases media y baja debido a su relativo bajo costo y su valor nutritivo. El frijol es una fuente de carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales, además de tener un contenido bajo en grasas. Sin embargo también contiene factores anti nutricionales y cierta toxicidad que limitan su aprovechamiento, estos inconvenientes son eliminados mediante la cocción, este proceso, además, facilita su digestibilidad y suaviza la semilla. El tiempo que tarda el frijol en adquirir estas características se denomina tiempo de cocción (en las variedades que se comercializan actualmente son superiores a 60 min), el tiempo de cocción además está asociado con el consumo de combustibles, la integridad de las vitaminas y demás nutrientes termolábiles; por lo tanto si el tiempo de cocción del frijol es menor, entonces se consumirá menos combustible en el proceso y los nutrientes del frijol estarán más íntegros.

Actualmente, se busca desarrollar variedades mejoradas con adaptaciones específicas como resistencia a enfermedades, ciclo biológico corto y grano de mejor 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 factores genéticos que lo determinan. Se ha encontrado que sometiendo los frijoles a un proceso de remojo previo a la cocción, éstos 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. Sin embargo, estudios previos, de nuestro laboratorio, sugieren que durante el remojo del frijol, los polisacáridos de la pared celular se modifican por acción enzimática (Blancas 2001, Mendieta 2009; Ibáñez 2009), resultando en una pared celular más laxa. Aparentemente, las enzimas de pared celular más importantes en este proceso son la ramnogalacturonasa y la  $\beta$ -D-glucanasa (Rg-asa y la Glusa, respectivamente), lo cual se deduce de la cuantificación de azúcares constitutivos de la fracción de pectina realizado en nuestro laboratorio recientemente (Martínez et. al. Artículo en preparación) el cual muestra una disminución notable de ramnosa en la pectina extraída de las semillas remojadas con respecto a las semillas secas (ver tabla 1). Para corroborar que estas enzimas participan en la modificación de los polisacáridos de la pared celular durante el remojo, es necesario determinar su actividad específica en un número mayor de genotipos de frijol y correlacionarlo con la magnitud del efecto benéfico del remojo, previo a la cocción. Por lo anterior, en este trabajo se propone determinar la actividad de las polisacaridasas antes mencionadas y los tiempos de cocción de los diversos materiales. A los resultados se les aplicará un tratamiento estadístico para conocer la correlación entre estos parámetros.

## II. ANTECEDENTES.

---

### 2.1. Importancia del frijol en México.

El frijol es una planta originaria de Mesoamérica (que incluye México), la cual se viene cultivando desde hace alrededor de 8 mil años, desarrollándose durante ese tiempo una diversidad de tipos y calidades de frijoles. Se considera que en total existen alrededor de 150 especies, aunque en México estas ascienden a 50, destacando las cuatro especies que el hombre ha domesticado, como son el *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común), *Phaseolus coccineus* L. (frijol ayocote), *Phaseolus lunatus* L. (frijol comba) y *Phaseolus acutifolius* Gray (frijol tepari). En nuestro país, las especies más importantes, en cuanto a superficie sembrada y producción, son las dos primeras (SAGARPA 2009).

Por su gran importancia económica y social, el frijol es un producto estratégico dentro del desarrollo rural de México, ya que ocupa el segundo lugar en cuanto a superficie sembrada nacional y representa además la segunda actividad agrícola más importante en el país por el número de productores dedicados al cultivo (SAGARPA 2009). Es así, que como generador de empleo es relevante dentro de la economía del sector rural.

Asimismo, es un alimento fundamental en la dieta de la población mexicana, sobre todo para las clases más desprotegidas del país, ya que junto con el maíz constituye la fuente principal de proteínas para dicho sector, pues tiene acceso limitado a la carne en la dieta diaria. Adicionalmente, la importancia ancestral de

su cultivo en el campo mexicano radica también en que forma parte de la cultura gastronómica de nuestro país, por lo que posee una gran demanda a nivel nacional. (SAGARPA 2009).

## 2.2. Nutrientes del frijol

El frijol es una rica fuente de proteínas e hidratos de carbono, además de ser una buena fuente de vitaminas del complejo B como son la niacina, la riboflavina, el ácido fólico y la tiamina. Igualmente proporciona hierro, cobre, zinc, fósforo, potasio, magnesio, calcio y además tiene un alto contenido de fibra. También es una excelente fuente de ácidos grasos poli insaturados, no contienen grasa saturada y proveen de importantes nutrientes tales como fibra, calcio, hierro, ácido fólico y potasio. Además el frijol es un alimento de bajo índice glicémico por lo que proporciona energía durante periodos más prolongados de tiempo al ir liberando lentamente glucosa al torrente sanguíneo.

**Tabla 1. Composición media del frijol**

<b>Abundancia en 100g de frijol</b>	
Energía	322 Kcal
Proteínas	21.8 g
Grasas	2.5 g
Carbohidratos	55.4 g
Tiamina	0.63 mg
Riboflavina	0.17 mg
Niacina	1.8 mg
Calcio	183 mg
Hierro	4.7 mg

(Tabla tomada de: <http://www.anhidro.com/?seccion=6>)

### **2.3. Características del frijol (*Phaseolus Vulgaris* L)**

El frijol es una planta herbácea anual que se desarrolla en climas templados. Tiene una raíz típica con nódulos bacterianos del género *Rhizobium*, fijadores de 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 también llamado 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 algunas veces redondeadas o esféricas y cilíndricas. Se distinguen numerosas variedades de frijol como amarillo, blanco, negro, etc., entre los cuales se encuentran incontables híbridos (citado en Blancas, 2001).

### **2.4. Inconvenientes para el consumo de la semilla.**

No obstante sus beneficios, la semilla presenta ciertas restricciones para su consumo debido a que contiene anti nutrientes como inhibidores de: proteasas, tripsina y amilasas. Además contiene lectinas, fitohemaglutininas, ácido fítico, taninos y poli fenoles condensados, éstos últimos se unen a proteínas resultando en una proteólisis insuficiente, y por tanto en un menor aprovechamiento de la proteína. Presenta además factores de flatulencia por la presencia de oligosacaridos no digeribles y ciertas proteínas. (Linder, 1995; Macrae et al., 1993). Se ha demostrado en cerdos que las dietas a base de cereales (como el maíz, sorgo y arroz) se pueden complementar con frijol (cocido), logrando un

mejor crecimiento de los animales, ya que la proteína que contienen los cereales como el maíz (que es el más empleado para la engorda de ganado) es pobre en lisina y triptófano. Estos aminoácidos los aporta la proteína del frijol obteniendo así una proteína de buena calidad (contiene todos los aminoácidos esenciales) (Bressani y Elias 1974). Sin embargo, otros estudios utilizando en la dieta de cerdos el frijol crudo demuestran que los animales disminuyen su peso corporal (debido a los factores anti nutricionales de la semilla cruda). Aunque algunos de éstos factores adversos se pueden eliminar remojando 24h la harina del frijol en presencia de cal activada al 4% m/v (B Ruiz Sesma, 2009), el aprovechamiento de los nutrientes aun se ve disminuido. Por lo que el beneficio del frijol se da únicamente en el frijol cocido, lo cual resulta muy costoso si se quiere utilizar el frijol para engorda de ganado. Una posible solución sería generar variedades de frijol que puedan ser utilizadas tal cual salen de la planta o bien, que todos los efectos tóxicos y anti nutricionales puedan ser eliminados mediante tratamientos más económicos (por ejemplo con el remojo en agua o en agua con cal).

## **2.5. Procesamiento del frijol.**

Las semillas crudas de frijol presentan una excesiva dureza lo que las hace difíciles de masticar, además presentan mal sabor, factores anti nutricionales y tóxicos; para su consumo, las semillas tradicionalmente, son sometidas a un proceso de remojo (8-16 horas en agua fría) y posteriormente a un proceso de cocción. Ambos tratamientos, modifican la micro estructura de la semilla de manera tal que se obtendrá un grano suave y agradable al paladar.

## **2.6. Proceso de remojo.**

El remojo de la semilla, suele ser usado para hidratarla y suavizarla, con el fin de disminuir su tiempo de cocción. El remojo también reduce el contenido de sustancias tóxicas en la semilla y por otro lado disminuye la contaminación superficial de ésta. El tiempo necesario de remojo varía entre cultivares y condiciones de almacenamiento; sin embargo, de manera tradicional, las semillas de frijol, son remojadas toda la noche por un periodo de 8-16 horas, en agua fría. Durante la imbibición, la semilla absorbe agua a través de la testa, seguida por la penetración en los cotiledones. Tras el proceso de remojo, se dan cambios en la semilla, como aumento de volumen, hidratación de los gránulos de almidón, solubilización de compuestos hidrosolubles de la pared celular y por consiguiente cambios en la dureza de la semilla (Macrae, et al., 1993; Blancas 2001).

## **2.7. Proceso de cocción.**

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

Los granos enteros pueden ser cocinados en agua a ebullición o a vapor; siendo más común el hervido a fuego lento, hasta obtener el grano con una suavidad y sabor deseados.

Durante la cocción, en la semilla ocurrirán los mayores cambios estructurales, pues las altas temperaturas generan difusión libre de agua dentro de la célula, pérdida de turgor e incremento de la suavidad del tejido por separación de las

células y solubilización de la lamela media, lo anterior resulta en daños mecánicos, estallido celular, gelatinización del almidón, desnaturalización de proteínas y por ultimo provoca la pérdida generalizada de la firmeza (Waldron, 2003).

Debido a que la composición química y la estructura de la pared celular son determinantes en los cambios fisicoquímicos inducidos por el tratamiento térmico al que se somete la semilla del frijol durante el tratamiento térmico, en la siguiente sección se describen algunas generalidades de la pared celular.

## **2.8. La pared celular**

### **2.8.1 Función y estructura.**

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

En la pared celular de las plantas superiores, se distinguen de manera general dos diferentes regiones conocidas como lamela media, y pared primaria. (Figura 1).

## PARED CELULAR

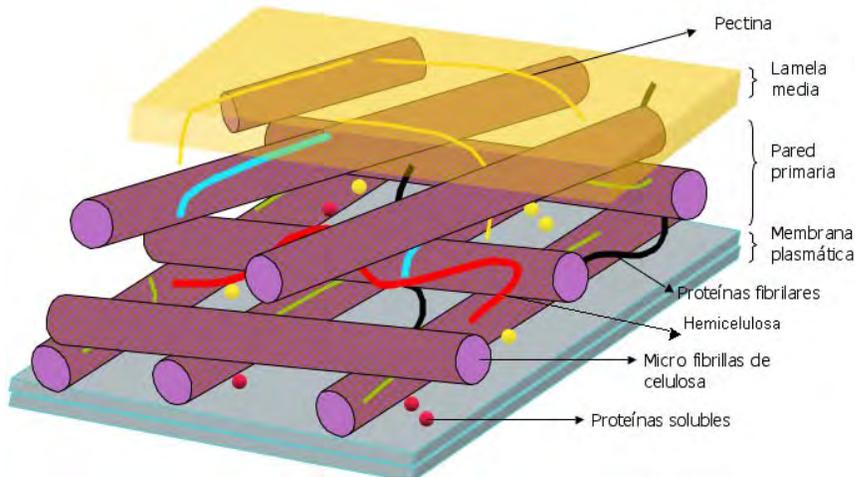


Figura 1. Pared celular

(Tomada de: <http://upload.wikimedia.org>)

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

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

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

### **2.8.2. Polisacáridos de la pared celular.**

Los principales polisacáridos de la pared celular se han agrupado en tres grandes categorías: celulosas, pectinas y hemicelulosas; éstos últimos se encuentran asociados a proteínas y compuestos fenólicos.

La celulosa es el más abundante y mejor conocido polisacárido presente en plantas; siendo el principal responsable de la rigidez estructural de las paredes celulares por su estabilidad y naturaleza cristalina y micro fibrilar. Es una molécula lineal constituida por  $\beta$ -D-glucosa, unidas con enlaces glucosídicos en posición  $\beta$  1-4, mismos que se unen formando micro fibrillas o un haz paralelo de cadenas, las cuales pueden mantenerse juntas y estables por formación de enlaces internos de puentes de hidrógeno (Lodish et al, 2005; Cosgrove, 2005).

Las pectinas constituyen un grupo heterogéneo de polisacáridos que se encuentran principalmente en la lamela media y en la pared celular primaria de

plantas dicotiledóneas (Brett y Waldron, 1990), y que de manera característica contienen azúcares ácidos como el ácido galacturónico y azúcares neutros como ramnosa, arabinosa y galactosa. Las pectinas son los polisacáridos más solubles de la pared celular, ya que pueden ser extraídos con agua caliente, ácidos diluidos o agentes quelantes de calcio (como el EDTA y CDTA) (Cosgrove 2006).

En la pared, las pectinas son grandes y complejas moléculas compuestas por diferentes dominios de polisacáridos, que se cree pueden estar unidos por enlaces covalentes o no covalentes (Cosgrove 2006)

Algunos dominios de polisacáridos pécticos como el homogalacturonano, poseen una estructura relativamente simple. Éste polisacárido también llamado ácido poligalacturónico, es un polímero de (1-4)  $\alpha$ -D-ácido galacturónico (Cosgrove, 2006).

Dentro de otro dominio también se encuentra el ramnogalacturonano I (RGI), el cual es un esqueleto largo de residuos alternados de (1-4)  $\alpha$ -D-ácido galacturonil y (1-2)- $\alpha$ -D-ramnosil. Ésta molécula es muy grande y a su cadena principal se encuentran unidas grandes cadenas laterales de otros polisacáridos como arabinanos y galactanos (Waldron, 2003). Otro polisacárido péctico considerado de mayor complejidad y altamente ramificado es el conocido como ramnogalacturonano II (RGII), el cual contiene un esqueleto de homogalacturonano decorado con cadenas laterales que comprenden al menos diez diferentes azúcares en un complicado patrón de enlaces. Aunque RGI y RGII tienen nombres similares, ellos poseen diferentes estructuras. Las unidades de RGII forman dímeros a través de enlaces de diésteres de borato, asociación que contribuye al buen mantenimiento de la resistencia y estructura de la pared

celular. Se ha visto que la carencia de estos dímeros, conduce a un mayor hinchamiento de la pared, incrementando su porosidad y debilitamiento de su estructura (Carpita y Mc Cain 2000; Cosgrove, 2006).

Las hemicelulosas están presentes tanto en paredes celulares primarias como secundarias y su presencia se ha comprobado en un gran número de semillas, entre las que están el maíz, la soya y el frijol común. Representan la fracción de azúcares neutros que son extraídos de paredes celulares despectinizadas, con álcalis fuertes en concentraciones de 2 a 4 M de NaOH o KOH (Brett y Waldron, 1990; Cosgrove, 2005).

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

Actualmente, se presume que las hemicelulosas juegan un papel importante dentro de los mecanismos modificadores de la arquitectura de la pared celular, pues se ha visto que algunas clases de hemicelulosas forman extensas redes de puentes de hidrógeno entre ellas mismas, con las pectinas y con las regiones externas de las micro fibrillas de celulosas, lo que puede repercutir en la plasticidad de las paredes, en la resistencia a la tensión y en los procesos de la elongación y la extensión de ésta durante su crecimiento (Waldron 2003).

### **2.8.3. Proteínas en la pared celular.**

Además de azúcares, en la pared celular, se encuentran una importante cantidad de proteínas las cuales pueden ser de naturaleza estructural o enzimática. Las proteínas estructurales de la pared celular han sido divididas en tres clases principales, proteínas ricas en prolina, proteínas ricas en glicina y proteínas conjugadas con pequeños oligosacáridos que dan lugar a las glicoproteínas, mismas que a su vez son ricas en un aminoácido poco usual como la hidroxiprolina. Dentro de éste último grupo, se localizan las extensinas, que son la familia de proteínas de la pared celular mas estudiadas (Cosgrove, 1997).

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

La degradación de los polisacáridos de la pared celular es dependiente de la acción de numerosas enzimas. Fry (2004), clasifica a éstas enzimas dentro de tres grupos: exopolisacaridasas, endopolisacaridasas y otras hidrolasas que no entran dentro de la clasificación de los dos primeros grupos. Las exopolisacaridasas inciden directamente sobre las ramificaciones o sustituciones de las cadenas laterales, liberando así monosacáridos y en ocasiones disacáridos. Las endopolisacaridasas atacan directamente en la cadena principal del polímero, en cualquier posición, dentro de ésta. Estas enzimas, tras su acción, tienen un inmediato y grande impacto sobre el peso molecular del polisacárido. Las hidrolasas del tercer grupo, pueden romper algunas sustituciones que no son carbohidratos unidas a diversos polisacáridos como grupos O- metil, O- acetil, O- feruloil, entre otros (Minic y Jouanin, 2006). Debido a que los polímeros de la pared celular son muy heterogéneos y complejos, el espectro de actividades enzimáticas que se pueden encontrar es muy amplia, pudiéndose encontrar las actividades de endo y exo para muchos casos.

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

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

Las principales enzimas hidrolíticas responsables de modificaciones en hemicelulosas son la endo- $\beta$ -D glucanasas (también conocidas como celulasas)

que rompen los enlaces  $\beta$ -(1,4) de la cadena de glucano en los xiloglucanos y también de la celulosa no cristalina. (Minic y Jouanin 2006).

Las endoglucanasas específicas para xiloglucano (xiloglucan endotransglicosidasas/hidrolasas. (XHTs), pueden exhibir ambas actividades de hidrolasas o endotransglicosidasas. Éstas parten la cadena de un xiloglucano donador, liberando fragmentos con extremos reductores y los vuelve a unir a otro oligosacárido aceptor. (Minic y Jouanin, 2006).

Endoxilanasas, Endo- $\beta$ -(1,4) xilanasas que rompen endolíticamente el esqueleto de xilano en las cadenas de arabinoxilano. Finalmente, las Glicosidasas que hidrolizan mono y disacáridos de extremos no reductores de oligo o polisacáridos de cadenas principales o sustituyentes.

## **2.9. Antecedentes inmediatos del proyecto.**

En nuestro laboratorio se ha demostrado que la abundancia de ramnosa es menor en las pectinas extraídas de frijol remojado que en las pectinas extraídas de frijoles sin remojo (Tabla 2, Martínez et. al artículo en preparación). Dado que el ramnogalacturonano constituye uno de los dominios de la fracción de pectina, la disminución de ramnosa se interpretó como una disminución en el peso molecular de este dominio. También en nuestro laboratorio se demostró que el peso molecular de la fracción de hemicelulosa disminuyó discretamente (Ibáñez, 2009). Por otro lado, se ha demostrado que los cambios en los polisacáridos de pared celular son debidos a la acción de polisacaridasas, por lo que en este trabajo se planteó explorar la posibilidad de que las enzimas que hidrolizan polisacáridos de

la pared celular podrían constituir algunos de los factores bioquímicos que participan en la calidad de cocción del frijol. En este trabajo se cuantificó la actividad de la ramnogalacturonasa y de la glucanasa, (una pectinasa y una hemicelulasa respectivamente), y se analizó la posible relación con la disminución en el tiempo de cocción del frijol. Así mismo se realizaron pruebas con frijoles remojados y posteriormente secados al vacío a fin de determinar si el efecto observado sobre el tiempo de cocción era únicamente debido al efecto físico de hidratación de la semilla.

**Tabla 2.- Abundancia de azúcares en pectinas extraídas de frijoles con dos tratamientos**

Azúcares	µg/ mg de pectina					
	AU	RAM	XIL	ARA	GLU	GAL
<b>Cultivares</b>						
<sup>3</sup> FM s/r <sup>1</sup>	136 <sup>*a</sup>	139 <sup>a</sup>	244 <sup>c</sup>	409 <sup>d</sup>	ND	73 <sup>f</sup>
FM rem <sup>2</sup>	124 <sup>a</sup>	34 <sup>b</sup>	222 <sup>c</sup>	374 <sup>e</sup>	16 <sup>h</sup>	230 <sup>g</sup>
<sup>4</sup> BM s/r	204 <sup>a</sup>	103 <sup>c</sup>	282 <sup>e</sup>	372 <sup>g</sup>	9 <sup>h</sup>	29 <sup>i</sup>
BM rem	179 <sup>b</sup>	43 <sup>d</sup>	135 <sup>f</sup>	354 <sup>g</sup>	12 <sup>h</sup>	277 <sup>j</sup>
II-2626 s/r	205 <sup>a</sup>	74 <sup>c</sup>	251 <sup>e</sup>	422 <sup>f</sup>	43 <sup>d</sup>	5 <sup>h</sup>
II-2626 rem	238 <sup>b</sup>	43 <sup>d</sup>	241 <sup>e</sup>	310 <sup>g</sup>	ND	165 <sup>i</sup>

<sup>1</sup>Sin remojo, <sup>2</sup>remojado, <sup>3</sup>Flor de mayo, <sup>4</sup>Bayo mecentral

\*Diferente letra entre tratamientos, indica diferencia significativa (p≤0.05)

### III. OBJETIVO E HIPÓTESIS

---

#### 3.1. Objetivo.

- Conocer la relación entre los niveles de actividad de las enzimas, Ramnogalacturonasa y Glucanasa, con la magnitud del efecto benéfico del remojo, en el tiempo de cocción del frijol
- Se pretende determinar si la disminución observada en los tiempos de cocción es debida o no únicamente al efecto de hidratación de la semilla.

#### 3.2. Hipótesis.

- Si la actividad de las enzimas estudiadas, se incrementa durante el remojo del frijol con la misma magnitud que disminuye el tiempo de cocción de los mismos, entonces existirá una relación entre estos dos factores.
- Si el tiempo de cocción de las semillas secas, es mayor que el tiempo de cocción de las semillas remojadas y posteriormente secadas (a una humedad similar a la de las semillas secas), entonces, podremos atribuir dicha disminución a factores distintos al simple efecto fisicoquímico de la hidratación de la semilla.

## IV. METODOLOGÍA

---

### 4.1. Determinación del tiempo de cocción de frijol

El tiempo de cocción fue determinado con un “cocinador Mattson”(figura 2) el cual consta de un soporte con 25 pocillos dentro de los cuales se colocan las semillas de frijol, sobre cada una de las semillas, se coloca una varilla metálica y sobre ésta una pesa de 200 g. Este sistema se introduce en una olla con agua a ebullición y se registra el tiempo en el que cada varilla va perforando una a una las semillas, hasta que el total de semillas son perforadas. Con estos resultados se construyó una gráfica de porcentaje de frijoles cocidos contra tiempo de cocción. Considerando que las 25 semillas utilizadas son el 100 % de las semillas a cocinarse, se calculó por interpolación el tiempo que tarda en cocerse el 50 % de los frijoles ( $TC_{50}$ ).



Figura 2. Cocinador Mattson

#### **4.2. Preparación de la semilla**

Al frijol, seco o remojado durante 16 horas, con ayuda de una pinza y una navaja, se le removió la testa y el eje embrionario.

#### **4.3. Obtención de harina**

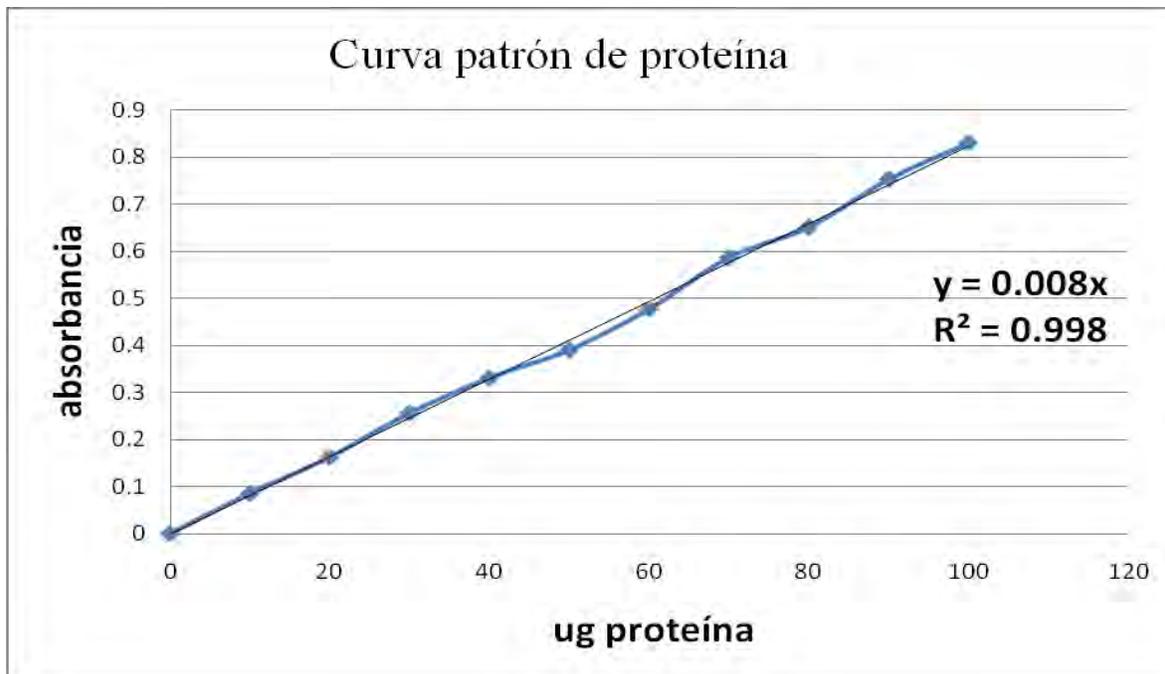
Los cotiledones sin eje embrionario ni testa fueron triturados en una licuadora en seco, hasta que toda la harina obtenida pasó por un tamiz de 80 micras. Posteriormente, esta harina fue homogenizada con nitrógeno líquido y triturado en un mortero. Finalmente se obtuvo la harina que se empleó para realizar la extracción de las enzimas.

#### **4.4. Preparación del extracto enzimático**

La harina del cotiledón del frijol (1g) se homogenizó con 15 mL de buffer de acetato de sodio 50 mM (pH= 5.5) conteniendo 1mM de  $\text{CaCl}_2$ . Posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm y el precipitado se resuspendió en 10 mL de buffer de acetato de sodio 50 mM (pH= 5.5) conteniendo 1.0 M de NaCl y 0.2 mM de PMSF, se colocó en agitación constante durante 1.5 h a 4 °C. El homogenizado se centrifugó a 15000rpm a 4 °C. El precipitado fue descartado y el sobrenadante se dializó en tres ocasiones, utilizando una membrana para diálisis de MWCO de 6 a 8 KDa (previamente activada con EDTA 0.01 M a ebullición durante un minuto y luego enjuagada en agua) una hora cada una, en 4 L de buffer de acetato de sodio 50 mM (pH = 5.5) a 4 °C. El extracto dializado fue centrifugado a 15000 rpm a 4 °C y el sobrenadante se utilizó para realizar los ensayos de actividad enzimática.

#### **4.5. Determinación de proteína**

Se utilizó el método de Lowry et al. (1951). En un tubo de ensaye se colocaron 50µL de extracto enzimático de pared celular, 1 mL de solución C (conteniendo Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 %, NaOH 0.4 %, tartrato de sodio y potasio 0.16 % y SDS 1% que constituyen la solución A; y CuSO<sub>4</sub> · (5H<sub>2</sub>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 este tiempo, se agregaron 100 µL de reactivo de Folin, se agitó e incubó nuevamente a temperatura ambiente por 30 minutos para desarrollar color. Éste se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm. 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 µg / ml. A continuación se muestra la gráfica patrón.



**Gráfico 1. Curva patrón de proteína**

Para generar la curva patrón de proteína, se realizaron al menos 3 repeticiones de cada punto, se promediaron, se graficaron y se determinó la ecuación de la recta

#### **4.6. Ensayo de glucanasas**

Se realiza mediante una adaptación del método descrito por Suda and Buckerdge et al. (2003). En un tubo de 10 mL se realizó la mezcla de reacción conteniendo, 0.12-0.25 mg de proteína dependiendo de la variedad, 200  $\mu$ L de CMC (carboximetilcelulosa) de baja viscosidad (SIGMA, C5013) preparado al 3 % en agua, 50  $\mu$ L de buffer de acetato de sodio 2.5 M (pH = 5.5), 50  $\mu$ L de NaCl 5 M y agua des ionizada c.b.p. 500  $\mu$ L. La mezcla se incubó a 35 °C durante 4 horas, transcurrido ese tiempo se determinó el poder reductor producido por el método de Nelson-Somogyi (1989).

#### **4.7. Determinación de azúcares reductores.**

Se empleó el método de Somogyi modificado por Nelson (1944) para determinar la cantidad de azúcares reductores producidos en cada una de las mezclas de reacción.

En tubos de 10 mL, se colocaron 0.5 mL de la mezcla de reacción de ramnogalacturonasas o glucanasas, posteriormente se adicionaron 0.5 mL de reactivo cúprico alcalino; tras una agitación fueron puestos en un baño de agua a ebullición durante 10 minutos, una vez transcurrido el tiempo, se enfriaron a temperatura ambiente para luego ponerlos en baño de hielo. Dentro del baño de hielo se le adiciona a cada muestra 500  $\mu$ L de reactivo de arsenomolibdato de amonio, tras un periodo de agitación, se transfirieron a tubos de 1.5 mL y se centrifugaron 8 min a 14000 rpm (centrífuga eppendorf), posteriormente se leyó el contenido de los tubos en un espectrofotómetro LKB Biochrom Ultrospec II a una longitud de 520 nm. El contenido de azúcares reductores de las muestras, fue obtenido de la ecuación de la recta de una curva patrón hecha a partir de una disolución de glucosa (Sigma) dentro de un intervalo de 0-100  $\mu$ g, para conocer los  $\mu$ g de reductores producidos.

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

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

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

Reactivo B; Para 50 mL se disuelven en agua 7.5 g de sulfato de cobre y 25  $\mu$ L de ácido sulfúrico concentrado.

Reactivo de arsenomolibdato. Para 100 mL, se disuelven 5 g de molibdato de amonio junto con 4.2 mL de ácido sulfúrico concentrado y 5 mL de una disolución de ortoarsenoacetato di sódico al 12 %; mezclar y antes de ajustar el volumen, la solución se incubó a 37 °C por 24 horas.

A continuación se muestra la gráfica de la curva patrón generada en este trabajo.



Gráfico 2. Curva patrón de glucosa

Para generar la curva patrón de glucosa, se realizaron al menos 3 repeticiones de cada punto, se promediaron, se graficaron y se determinó la ecuación de la recta.

#### **4.8. Actividad de ramnogalacturonasa**

En tubos de 10 mL se colocó una mezcla de reacción que contenía 0.15 mL de extracto enzimático, 0.3 mL de ramnogalacturonano de papa (MEGAZYME) al 1 % preparado en agua, y 0.15 ml de buffer de acetatos 0.05 M pH 5.5. La mezcla fue incubada a 35 °C por 4 horas, posteriormente, la actividad hidrolítica de la enzima fue determinada, cuantificando los azúcares reductores por el método, de Nelson Somogy, antes descrito. La actividad enzimática fue reportada como actividad específica,  $\mu\text{g}$  de reductores/ mg proteína /h.

#### **4.9. Secado de semillas**

Se colocaron lotes de 40 semillas remojadas (Previamente escurridas y secadas con toallas de papel), en un desecador conectado al vacío durante 12-16 horas hasta alcanzar una humedad cercana a la inicial para cada variedad y posteriormente se les determinó el tiempo de cocción.

#### **4.10. Determinación de humedad**

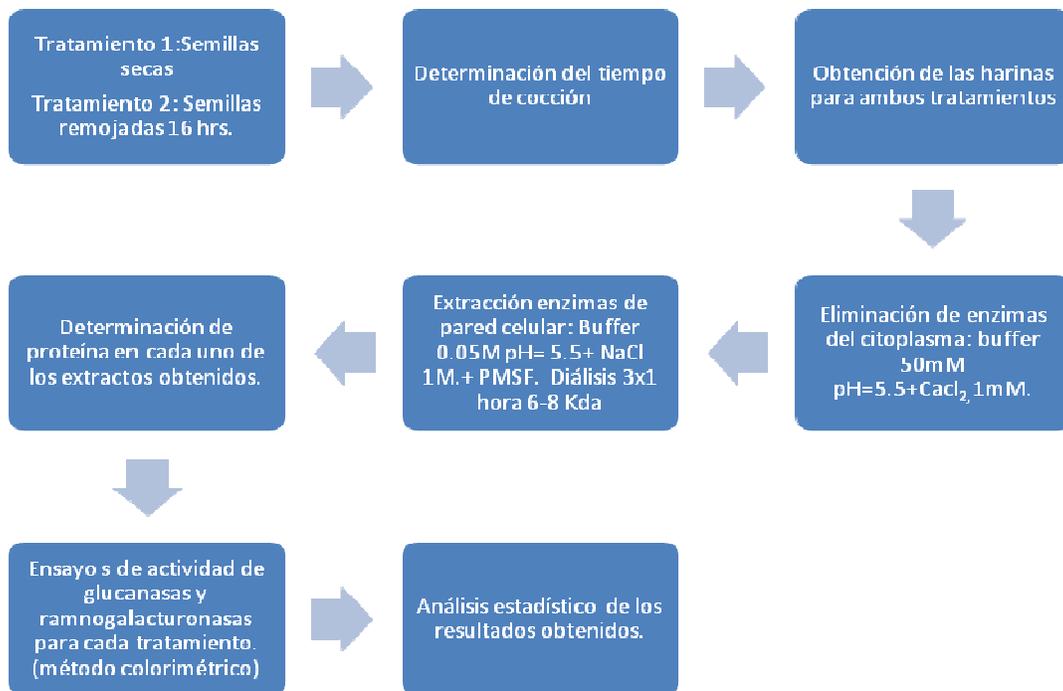
Se utilizó una estufa al vacío a 60°C para determinar la humedad de las semillas. Las semillas fueron puestas (5 g) en cajas de metal, las cuales previamente se secaron hasta peso constante, y posteriormente introducidos en la estufa, se dejaron un tiempo de 5 horas hasta que el peso de las muestras no variara (se tomaron lecturas cada hora). La humedad se reportó como porcentaje en peso de agua.

#### 4.11. Tratamiento estadístico.

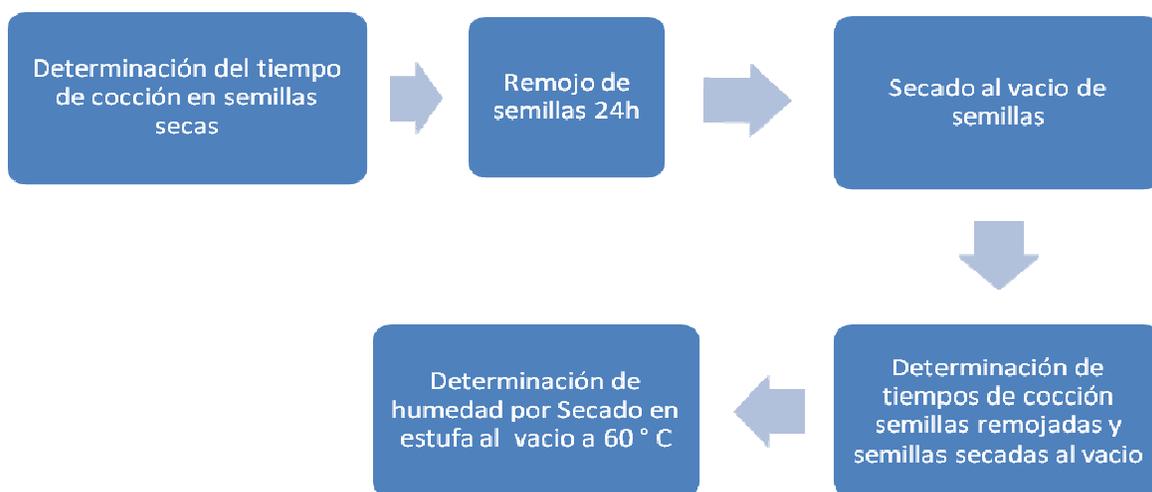
Con los resultados obtenidos se realizaron comparaciones de rangos múltiples por diferencias mínimas significativas (DMS) para buscar diferencias significativas entre las variedades con respecto a los parámetros analizados (tiempo de cocción, proteína, actividad de las enzimas). Finalmente se buscaron correlaciones entre la actividad de las enzimas estudiadas (Rg-asa y Glusa) con la disminución observada en el tiempo de cocción después del proceso de remojo empleando regresiones lineales en una hoja de cálculo.

#### 4.12. DIAGRAMA DE LA METODOLOGÍA

a)



b)



## V. RESULTADOS y DISCUSIÓN

---

### 5.1. Determinación de los tiempos de cocción.

En la tabla 3 se muestran los tiempos de cocción de diversos cultivares de frijol, bajo dos tratamientos: con y sin remojo. La determinación de este parámetro se realizó por triplicado utilizando en cada repetición 25 semillas. Se encontró que para que el valor del parámetro fuera reproducible se requería utilizar la misma fuente de calor y el mismo equipo Mattson en cada repetición.

**Tabla 3.- Efecto del remojo sobre el tiempo de cocción para diversas variedades de frijol.**

Cultivar	Tiempo de cocción (minutos)	
	Semilla seca	Semilla remojada
Flor de Mayo	100.6 ± 2.5 <sup>(a)</sup>	39.6 ± 1.5 <sup>(f)</sup>
Bayomex	97.0 ± 4.0 <sup>(b)</sup>	36.0 ± 3.8 <sup>(f)</sup>
Flor de durazno	94.6 ± 1.5 <sup>(b)</sup>	37.6 ± 1.5 <sup>(f)</sup>
Bayo Inifap	90.0 ± 2.5 <sup>(c)</sup>	27.0 ± 3.0 <sup>(g)</sup>
Bayo mecentral	85.0 ± 6.6 <sup>(c)</sup>	28.3 ± 0.6 <sup>(g)</sup>
Negro Otomí	76.0 ± 1.5 <sup>(d)</sup>	34.0 ± 0.6 <sup>(g)</sup>
NAM-38	71.0 ± 2.5 <sup>(d)</sup>	38.0 ± 1.5 <sup>(f)</sup>
Negro Jamapa	61.0 ± 3 <sup>(e)</sup>	43.0 ± 2.0 <sup>(f)</sup>

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

Como se puede observar, en todos los casos los tiempos de cocción del frijol sin remojo fueron mayores que los registrados para el frijol remojado, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura (Blancas, 2001; Mendieta, 2009; Ibáñez, 2009).

Tomando en cuenta las diferencias estadísticamente significativas de los tiempos de cocción de los frijoles, las semillas secas pueden ser clasificadas en 5 grupos (a-e). En contraste, para las semillas remojadas, los grupos se reducen a 2 (f y g). La magnitud del tiempo de cocción del frijol es un reflejo de la cantidad de energía que requiere la pared celular del cotiledón para modificar su micro estructura y que la semilla cocida sea suave y palatable. Partiendo de esta evidencia, La semilla que presenta mayor tiempo de cocción también posee mayor estructuración de la pared celular con respecto a la semilla con menor tiempo de cocción. Por lo que la clasificación, de los tiempos de cocción de la semilla seca en cinco grupos (tabla 3), sugiere que hay diferencias cuantitativas, cualitativas o ambas en la estructura microscópica de la pared celular entre los cinco grupos.

Estas micro estructuras en la pared celular se modificaron profundamente durante el remojo, ya que el tiempo de cocción de los frijoles remojados fue menor que el de los frijoles secos. Sorpresivamente, estas modificaciones fueron tales que los diferentes cultivares de frijol, una vez remojados presentaron sólo dos tiempos de cocción significativamente diferentes. Lo anterior indica que independientemente del grado de micro estructuración que inicialmente presentó la pared celular en las diferentes variedades de frijol, el remojo disparó los mecanismos bioquímicos y fisiológicos, necesarios para que se realicen los cambios que conducen a la nueva micro estructuración de la pared celular. Esta remodelación conduce a dos micro estructuras de pared celular significativamente diferentes. Para fines de discusión a la micro estructura de la pared celular que deben tener los frijoles con un tiempo de cocción mayor a 35 minutos, la llamaremos pared celular F (PCF), y la pared celular G (PCG), será el termino que se utilizará para referirse a la pared celular de los frijoles con tiempos menores a 34 min, donde el arreglo de la primera es ligeramente más estructurado que el de la segunda. Pues el tiempo de cocción de los frijoles que presentaron el arreglo de la PCF también presentaron mayor tiempo de cocción que los del arreglo de la PCG. Para establecer en qué consiste la diferencia en el arreglo micro estructural entre las paredes celulares de uno y otro grupo de frijoles remojados se requiere aislar la pared celular de las diferentes variedades y determinar la composición química de la misma. En un trabajo anterior se demostró que la abundancia de ramnosa fue menor en pectinas extraídas de frijol remojado que el obtenido de pared celular de frijol sin remojo. Mientras que la facilidad de extracción del ácido poligalacturónico se incrementó

(Martínez Et al artículo en preparación). Indicando que en frijol seco, la pared celular está más estructurada que la pared celular del frijol remojado.

En la tabla 4, se muestran los resultados de estimar la magnitud del beneficio del remojo en el tiempo de cocción del frijol. Esto se hizo, a través de calcular el porcentaje de disminución de este parámetro o bien por el número de veces que el tiempo de cocción disminuyó por efecto del remojo. Este último se denominó índice de beneficio. El porcentaje de disminución representa que tan parecida es la semilla remojada a la semilla cocida, tanto a nivel de micro estructura como a nivel macroscópico. Mientras que el índice de beneficio representa la cantidad de energía que se debe gastar para pasar de la micro estructura que tiene la pared celular de la semilla seca a la que presenta la semilla cocida, con respecto a la energía que se requiere para obtener el mismo efecto en la semilla remojada, ya que durante todo el tiempo que tardaron en cocinarse, las semillas estuvieron sumergidas en agua hirviendo a una temperatura constante de 96°C.

**Tabla 4.- Beneficio del remojo en el tiempo de cocción de la semilla de frijol.**

<b>Cultivar</b>	<b>% Reducción Tc50</b>	<b>Índice de beneficio</b>
Bayo Inifap	70.0%	3.33
Bayo mecentral	66.8%	3.01
Bayomex	62.9%	2.69
Flor de mayo	60.6%	2.53
Flor de durazno	60.2%	2.51
Negro Otomí	55.3%	2.23
NAM-38	46.5%	1.87
Negro Jamapa	29.5%	1.42

## 5.2. Determinación de proteína en los extractos.

Las enzimas que se estudiaron en este trabajo se localizan en la pared celular. Dónde se encuentran unidas por enlaces iónicos. Por lo tanto para su extracción requirió de altas concentraciones de cloruro de sodio. Esta fuerza iónica también solubiliza las globulinas que son las proteínas de reserva de esta semilla. Con la finalidad de eliminar las globulinas de la extracción salina de proteínas, el extracto salino se dializó contra buffer de acetatos de forma que sólo las proteínas solubles en baja fuerza iónica (albuminas), quedaran en solución. Con esto se logró eliminar una gran cantidad de globulinas. En la tabla 3 se muestra la cantidad de proteína extraída de los diferentes cultivares de frijol y que además de otras proteínas contienen las enzimas de pared celular.

**Tabla 5.- Determinación de proteína en los extractos enzimáticos de pared celular.**

Cultivar	Cantidad de proteína (mg de proteína/g cotiledón)	
	Semilla seca	Semilla remojada
Bayo mecentral	13.9±1.59 <sup>(c)</sup>	13.1±0.17 <sup>(d)</sup>
Flor de mayo	15.7±1.74 <sup>(b)</sup>	17.5±0.71 <sup>(a)</sup>
Bayomex	17.1±0.74 <sup>(a)</sup>	17.6±0.71 <sup>(a)</sup>
Flor de durazno	8.5±0.22 <sup>(i)</sup>	9.2±0.23 <sup>(h)</sup>
Bayo Inifap	8.3±1.34 <sup>(i)</sup>	9.0±1.28 <sup>(h)</sup>
NAM-38	9.3±0.58 <sup>(h)</sup>	12.0±1.25 <sup>(e)</sup>
Negro Otomí	8.1±0.42 <sup>(i)</sup>	10.0±0.94 <sup>(g)</sup>
Negro Jamapa	9.8±1.00 <sup>(g)</sup>	10.8±0.29 <sup>(f)</sup>

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

En la tabla 5 se puede apreciar que en general la cantidad de proteína extraída se incrementó con el remojo, a excepción de las variedades bayo mecentral y bayomex en las cuales la cantidad de proteína disminuyó o se mantuvo sin cambios.

El aumento discreto en la cantidad de proteína observado en las semillas remojadas, da indicios de que durante el remojo, la facilidad de extracción de la proteína se incrementó, o la mayor cantidad de proteína en la pared celular se debió a una mayor deposición de proteína. Ésta podría provenir de síntesis *de novo* de hidrolasas de pared celular que son depositadas durante el remojo o bien que hidrolasas de pared celular ya presentes en el citoplasma sean re-localizadas en la pared celular; o bien que la proteólisis de proteínas de reserva se incrementó, teniendo como consecuencia una disminución en el peso molecular de las mismas, lo cual incrementó también su solubilidad. Las anteriores propuestas son probables ya que la semilla en presencia de agua y en las condiciones adecuadas de temperatura y aeración, se prepara para iniciar el proceso de germinación (que es la función principal de una semilla) siendo la síntesis de proteínas y la movilización de reservas (además de la respiración) los principales eventos metabólicos ocurridos durante el proceso de absorción de agua por parte de la semilla que corresponde al primer paso de la germinación (Breijo, 2008).

En el caso de las variedades en las que no se detectó un incremento en la cantidad de proteína, puede deberse a que estos cultivares cuentan con la cantidad y tipo de proteínas necesarias para la germinación y no realizan procesos que las incrementen. Por su parte, la disminución observada, pudo deberse a que

durante el remojo, la velocidad de la proteólisis de las proteínas de reserva fue mayor en este caso produciendo fragmentos menores de 10 KDa que fue el peso molecular de corte de la membrana de diálisis, por lo que durante la diálisis, salieron de la membrana y por lo tanto de nuestro extracto enzimático.

### **5.3. Determinación de la actividad de la B-d- glucanasa y ramnogalacturonasa.**

Para la cuantificación de la actividad de estas polisacaridasas, se empleó como fuente de la enzima, los extractos de frijol con y sin remojo. Los extractos se prepararon por triplicado para cada variedad y cada extracto se ensayo por triplicado. Los blancos se prepararon conforme a la metodología descrita en el apartado correspondiente. El tiempo de incubación para el ensayo enzimático (4 horas) fue elegido ya que a ese tiempo se tienen resultados fácilmente cuantificables de acuerdo con la sensibilidad de los métodos empleados, y a este tiempo la enzima no se inactiva ni el sustrato es limitante. Cuando la actividad se determinó a tiempos más largos (6 y 8 horas) se encontró que la máxima actividad se encontraba a las cuatro horas de incubación. Es preferible que el tiempo de incubación sea corto ya que entre más tiempo proceda la reacción, mayor será la interferencia con los azúcares producidos por la hidrólisis química del sustrato o por la producción endógena de azúcares a partir del mismo extracto enzimático (experimentalmente se encontró que conforme pasa el tiempo de almacenamiento del extracto enzimático a 4°C, se forman azúcares reductores), además que el

cálculo de la actividad específica se afectaría al considerar un tiempo en el que no se produjo actividad o ésta fue mínima.

En cuanto a la actividad de las glucanasas (tabla 6), se observan tres efectos significativamente distintos causados por el remojo, la variedad Bayo Inifap presenta la mayor actividad de esta enzima y dicha actividad (40 unidades) no se modificó con el proceso de remojo. En las variedades NAM-38, Flor de Durazno, Bayo Mecentral, y Flor de Mayo, la actividad detectada en la semilla seca fue menor que en el caso de Bayo Inifap (25-29 unidades), pero el remojo provocó un incremento en la actividad de esta enzima. La magnitud de este incremento fue cultivar dependiente. En los tres primeros fue de 28.3 %, 26.0 % y 23.5 %, respectivamente. Mientras que para Flor de mayo, el incremento en la actividad de glucanasa, fue de sólo el 7 %. En contraste, en las variedades Bayomex, Negro Otomí y Negro Jamapa, el remojo ocasionó una disminución en la actividad de la glucanasa con respecto a la observada en la semilla seca.

**Tabla 6.- Actividad de las B-D- glucanasas**

<b>Actividad específica (<math>\mu\text{g}</math> de reductores/mg proteína *h)</b>		
<b>Cultivar</b>	<b>Semilla seca</b>	<b>Semilla remojada</b>
Bayo Inifap	40.04 $\pm$ 2.8 <sup>(a)</sup>	40.31 $\pm$ 0.4 <sup>(a)</sup>
Bayomex	33.58 $\pm$ 0.9 <sup>(c)</sup>	27.89 $\pm$ 1.5 <sup>(d)</sup>
Flor de durazno	29.2 $\pm$ 1.1 <sup>(d)</sup>	39.40 $\pm$ 1.4 <sup>(a)</sup>
Negro Otomí	27.47 $\pm$ 2.3 <sup>(d)</sup>	22.12 $\pm$ 1.9 <sup>(f)</sup>
Bayo mecentral	27.39 $\pm$ 5.4 <sup>(d)</sup>	35.77 $\pm$ 4.1 <sup>(b)</sup>
NAM-38	26.19 $\pm$ 1.6 <sup>(e)</sup>	36.50 $\pm$ 2 <sup>(b)</sup>
Negro Jamapa	22.08 $\pm$ 1.2 <sup>(f)</sup>	19.47 $\pm$ 1.3 <sup>(g)</sup>
Flor de mayo	19.73 $\pm$ 2.2 <sup>(g)</sup>	21.08 $\pm$ 2.8 <sup>(f)</sup>

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

En la tabla 7 donde se muestran los resultados obtenidos de la determinación de la actividad de la ramnogalacturonasa, se aprecia primeramente que la actividad específica de la ramnogalacturonasa es aproximadamente la mitad que la de las glucanasas. A diferencia, de lo observado en las glucanasas, los cambios inducidos por el remojo solo son de dos tipos. La actividad de esta enzima se incrementó o disminuyó discretamente. Las tres variedades con la actividad mas alta en semilla seca que son NAM-38, Negro Jamapa y Negro Otomí, disminuyen su actividad con el remojo mientras que en las otras cinco, el remojo provoca un incremento en su actividad. Este incremento varió desde 20 % en flor de mayo hasta 42 % para Bayomex. Respecto a los cultivares que disminuyeron su actividad por efecto del remojo destaca Negro Otomí, ya que su actividad disminuyó en un 46 % y NAM-38 por presentar las mayores actividades tanto en extractos aislados de frijol seco así como en los aislados de fíjol remojado.

**Tabla 7.- Actividad de la ramnogalacturonasa**

<b>Actividad específica (<math>\mu\text{g}</math> de reductores/mg proteína *h)</b>		
<b>Cultivar</b>	<b>Semilla seca</b>	<b>Semilla remojada</b>
NAM-38	20.9 $\pm$ 2.4 <sup>(a)</sup>	18.7 $\pm$ 1.5 <sup>(b)</sup>
Negro Jamapa	12.4 $\pm$ 1.2 <sup>(d)</sup>	10.7 $\pm$ 1.0 <sup>(e)</sup>
Negro Otomí	10.4 $\pm$ 2.4 <sup>(e)</sup>	5.6 $\pm$ 1.3 <sup>(h)</sup>
Bayo mecentral	10.1 $\pm$ 0.4 <sup>(e)</sup>	14.4 $\pm$ 3.2 <sup>(c)</sup>
Bayo Inifap	9.1 $\pm$ 1.8 <sup>(f)</sup>	12.8 $\pm$ 2.9 <sup>(c)</sup>
Flor de mayo	5.7 $\pm$ 0.6 <sup>(h)</sup>	7.1 $\pm$ 0.4 <sup>(g)</sup>
Flor de durazno	4.8 $\pm$ 0.2 <sup>(i)</sup>	6.4 $\pm$ 0.6 <sup>(g)</sup>
Bayomex	4.3 $\pm$ 0.1 <sup>(i)</sup>	7.3 $\pm$ 1.0 <sup>(g)</sup>

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

No se encontró una correlación significativa al graficar los índices de beneficio en el tiempo de cocción de todos los cultivares contra el incremento de la actividad de las enzimas inducidas por el remojo, ya que en algunos casos esta actividad disminuyó o no se presentó ningún cambio. Sin embargo, en estudios anteriores se demostró utilizando sólo tres cultivares de frijol, existía correlación entre el incremento en la actividad de glucanasa (0.98) con la disminución en el tiempo de cocción y de la actividad de ramnogalacturonasa con el tiempo de cocción (0.91), lo cual sugería que en algunos cultivares la hipótesis planteada en el trabajo era válida, ya que en aquella ocasión utilizamos un cultivar tipo Bayo, otro del tipo Flor y una línea de tipo Peruano, por lo que se decidió hacer otro tipo de tratamiento a nuestros resultados y formar grupos a partir de las ocho variedades estudiadas según el comportamiento de los parámetros analizados en el presente trabajo.

Si con los resultados obtenidos se grafica el índice de beneficio en función de la actividad de glucanasa para las semillas remojadas (Se empleó la actividad de las semillas remojadas ya que el efecto benéfico sobre el tiempo de cocción, se observó después del remojo), se distinguen dos grupos uno en el que se localizan los tres cultivares Bayos, Flor de mayo y negro Otomi en este grupo la correlación es de 0.908. Mientras que el segundo grupo con una correlación más bajo (0.779) está formado por las variedades Flor de Durazno, Negro Jamapa Y NAM-38.

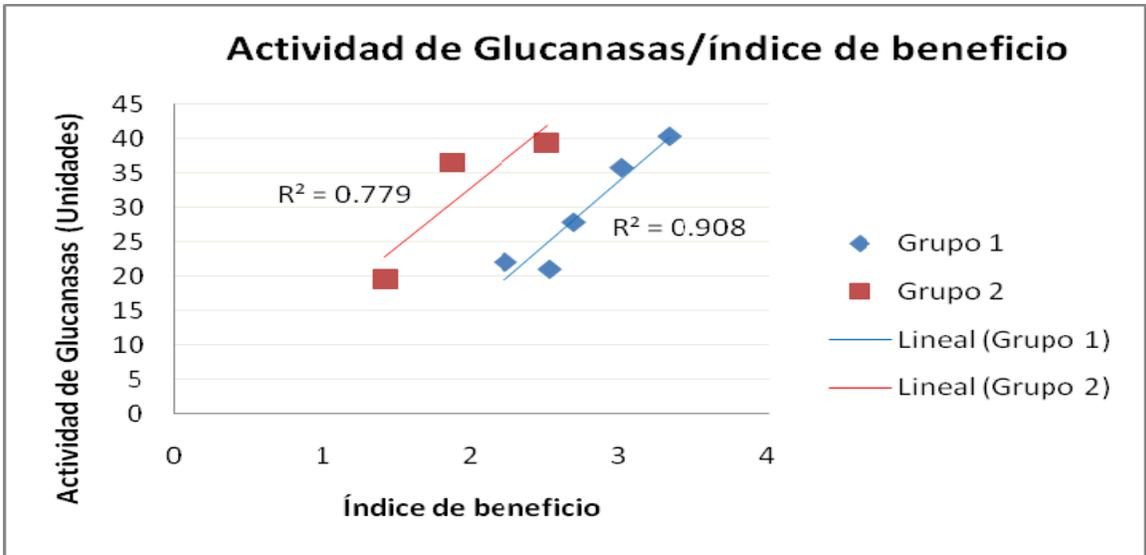


Gráfico 3. Índice de beneficio en función de la actividad de las glucanasas para las semillas remojadas.

Aplicando el mismo procedimiento para la actividad de ramnogalacturonasa sólo podemos encontrar un grupo formado por Bayo Inifap, Bayomex, Flor de Mayo, Flor de Durazno y Negro Otomi, con una correlación de 0.957.

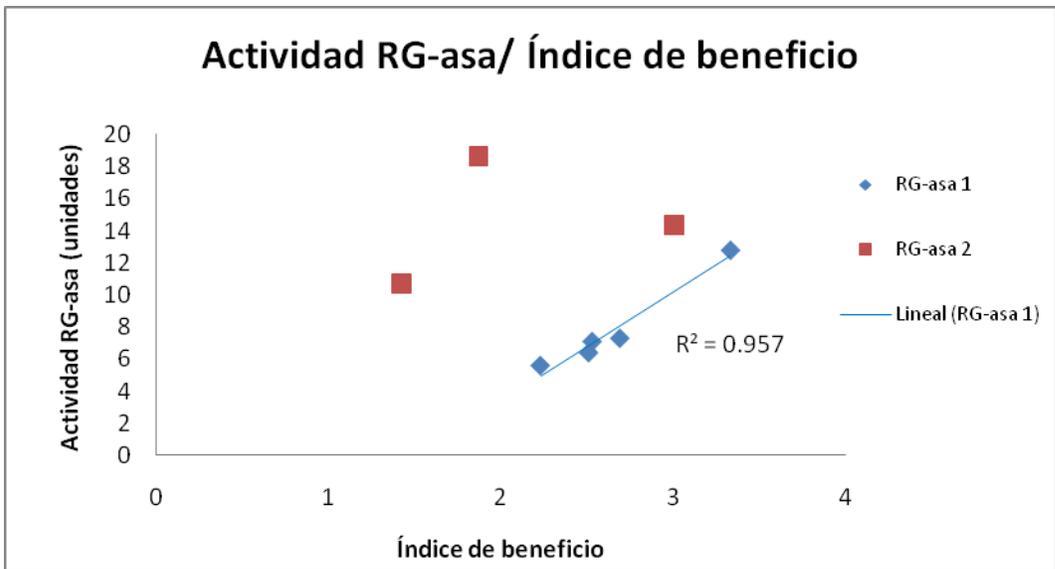


Gráfico 4. Índice de beneficio en función de la actividad de la ramnogalacturonasa en semillas remojadas de frijol.

El hecho de que los cultivares Bayo Inifap, Bayomex, Flor de Mayo y Negro Otomi sean comunes en uno de los grupos formados por Glucanasas y en el único grupo encontrado para ramnogalacturonasa fue interpretado como que en estos cultivares la remodelación de la pared celular ocasionado por la acción de las glucanasas y la ramnogalacturonasa, es uno de los eventos bioquímicos más importantes que ocurren durante el remojo de la semilla y que dan como consecuencia la reducción en el tiempo de cocción.

Como se mencionó anteriormente no todas las variedades estudiadas se comportaron de acuerdo a nuestra hipótesis inicial, por lo que en un intento para demostrar que las enzimas son las responsables de la disminución en el tiempo de cocción por acción del remojo, se intentó inactivar las enzimas presentes en el frijol por medios químicos, utilizando al fenol como inhibidor de enzimas. (Las semillas se remojaron en fenol al 1 %). También se intentó utilizando hipoclorito de sodio al 6% y finalmente se probó precipitando la enzima con EtOH a ebullición por una hora (logrando con este último método una purificación efectiva de la enzima glucanasa). Ninguno de los experimentos anteriores fue exitoso en la inactivación enzimática, por lo que se diseñó un experimento alternativo que ayudase a corroborar que el beneficio del remojo en el tiempo de cocción era producto de la acción enzimática y no se debía únicamente al efecto de hidratación de la semilla. Así mismo este experimento nos permite saber si los cambios observados en las semillas remojadas son reversibles y en que proporciones.

El experimento consistió en remojar las semillas de diferentes cultivares de frijol durante un periodo de 24 horas y posteriormente secarlas al vacío hasta llegar a la humedad inicial de las semillas secas. Determinar los tiempos de cocción de las

semillas sometidas a los tres tratamientos realizados (secas, remojadas 24 horas y las remojadas y posteriormente secadas al vacío) y comparar los tiempos de cocción entre los diferentes tratamientos (se describe ampliamente en el apartado de la metodología).

#### **5.4. Deshidratación de semillas remojadas.**

Se tomaron alrededor de 100 semillas (para cada variedad) de cada una de las variedades empleadas y se dividieron en tres partes (30 c/u) a las cuales se les dieron los siguientes tratamientos:

Lote 1.- Se determinó nuevamente el tiempo de cocción en semilla seca y se determinó humedad por secado en estufa al vacío.

Lote 2.- Se sometió a remojo durante 24 horas y se determinó tiempo de cocción. También se determinó la humedad por secado en estufa al vacío.

Lote 3.- Se sometieron a remojo durante 24 horas y posteriormente se secaron al vacío durante 24 horas hasta alcanzar un tamaño y humedad similares a los iniciales, se les determinó el tiempo de cocción.

Se realizó este experimento bajo la hipótesis de que si la disminución en el tiempo de cocción de la semilla es debida únicamente al efecto de hidratación de la semilla, entonces al secar la semilla hasta su humedad inicial, el tiempo de cocción será similar al de la semilla seca. Pero si por el contrario, el tiempo de cocción de la semilla secada al vacío es menor al de la semilla seca, entonces hay algún factor de carácter bioquímico (acción de alguna enzima).

**Tabla 8.- Tiempo de cocción de semillas con 3 tratamientos diferentes.**

Cultivar	Tratamiento		
	Remojado TC (min)	Secado al vacío TC (min)	Seco TC (min)
Bayomex	36± 2.0 <sup>(b)</sup>	56± 2.0 <sup>(d)</sup>	97± 2.0 <sup>(h)</sup>
Bayo Inifap	21± 3.3 <sup>(a)</sup>	57± 1.5 <sup>(d)</sup>	88± 1.5 <sup>(g)</sup>
Bayo mecentral	27± 1.5 <sup>(a)</sup>	49± 3.7 <sup>(c)</sup>	70± 2.5 <sup>(f)</sup>
NAM-38	32 ± 1.0 <sup>(b)</sup>	71± 4.0 <sup>(f)</sup>	73 ± 3.0 <sup>(f)</sup>
Jamapa	36 ± 2.0 <sup>(b)</sup>	50 ± 1.0 <sup>(c)</sup>	61 ± 2.5 <sup>(e)</sup>
Flor de Durazno	47 ± 1.0 <sup>(c)</sup>	57 ± 5.0 <sup>(d)</sup>	66 ± 3.3 <sup>(e)</sup>

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

En la tabla 8 se observa que las semillas remojadas y luego secadas al vacío, conservan parte del beneficio otorgado por el remojo inicial, con excepción de la variedad NAM-38 que volvió al TC inicial de semilla seca.

Este beneficio es menor al observado en las semillas remojadas y de inmediato cocidas, lo cual nos dice que hay un efecto debido únicamente al efecto físico del remojo. La entrada de agua a la semilla puede solubilizar algunos azúcares u otros compuestos constitutivos del frijol, quizá interactuar con el almidón que se encuentra en gran cantidad en la semilla, dando como consecuencia una semilla más blanda, también se observa que la testa es más suave en las semillas remojadas. Estos efectos se pierden cuando se seca la semilla hasta la humedad original.

La otra parte del beneficio, el cual permanece aun después de que la semilla ha sido secada, puede atribuirse a cambios de carácter bioquímico, por ejemplo la acción hidrolítica de algunas enzimas (es probable que las enzimas propuestas en este trabajo no sean las únicas responsables del efecto observado) las cuales actúan de forma irreversible degradando algunas estructuras del frijol. En el caso de la variedad NAM-38, llama la atención que tuvo la mayor actividad de ramnogalacturonasa (en ambos tratamientos) y en semilla remojada tuvo uno de los mayores incrementos de la actividad de glucanasas, es decir que sus enzimas se encuentran en buena cantidad y con buena actividad, sin embargo al momento de secar la semilla remojada, es la única variedad que regresa al tiempo de

cocción de la semilla seca. Investigando acerca del origen de esta variedad, encontramos que proviene de la región de los andes (Sudamérica) de ahí que su comportamiento sea tan diferente al de las semillas de la región Mesoamericana. Su comportamiento puede deberse a que debido a las condiciones de humedad y temperatura de su región de origen, la semilla cuenta con mecanismos diferentes para su supervivencia (o procesos similares pero más eficientes), como su actividad hidrolítica en la semilla remojada es alta, la primer suposición que viene a la mente es que quizá durante el proceso de secado, se activen enzimas ligasas que vuelvan a unir los sitios cortados por las hidrolasas o bien, que las mismas enzimas tengan ambas actividades según la disponibilidad de agua.

Las observaciones hechas en este último experimento nos invita a proponer una aplicación industrial, si aplicamos este mismo proceso de remojo y secado del frijol, podemos tener un producto de apariencia similar al original como se puede apreciar en la figura 3 (excepto en los frijoles negros y pintos donde se pierde parte del color original de la testa), pero con un tiempo de cocción menor al del producto original, la ventaja de este producto es que el consumidor tiene la libertad de prepararlo a su gusto a diferencia de los productos disponibles en la actualidad (frijoles enlatados, refritos, en pasta, etc.), además como se mencionó en la introducción del presente trabajo, con este pre-tratamiento se eliminan los factores de flatulencia presentes originalmente en la semilla.

### **Frijol Negro Otomí con tres diferentes tratamientos**



**Semilla seca**



**Semilla remojada**



**Semilla remojada  
y secada al vacio**

Figura 3. Comparación de semillas con los diferentes tratamientos aplicados.

## VI. CONCLUSIONES Y BIBLIOGRAFÍA

---

### 6.1. Conclusiones.

- Independientemente del cultivar, el proceso de remojo reduce el tiempo de cocción de las semillas de frijol significativamente.
- La magnitud del beneficio del remojo es cultivar dependiente.
- El incremento de la actividad de las enzimas ramnogalacturonasa y glucanasa durante el remojo, se relaciona directamente con la disminución del tiempo de cocción en las variedades Bayo Inifap y Bayo Mecentral.
- Se encontró una relación directa entre la actividad de las glucanasas en semillas remojadas y el índice de beneficio, dicha relación comprende dos grupos bien definidos, es decir que existen dos tipos de relaciones entre estos parámetros, uno de los grupos comprende cinco de las ocho variedades y tiene una correlación superior a 0.90. El segundo grupo comprende las tres variedades restantes y su correlación es de 0.77
- Se encontró una relación directa entre la actividad de la ramnogalacturonasa en semillas remojadas y el índice de beneficio, esta relación (0.95) solo se encontró en cinco de los cultivares estudiados, para el resto no se encontró una relación significativa.
- El beneficio del remojo sobre el tiempo de cocción, en parte se debe al efecto físico de hidratación de la semilla.

- Se demostró que una parte del beneficio obtenido con el remojo, se conserva aun después de volver a secar la semilla. Lo cual sugiere que este beneficio se debe, al menos parcialmente, a fenómenos de tipo bioquímico (acción enzimática).
- Se observó que aunque el comportamiento de las enzimas glucanasa y ramnogalacturonasa es diferente en cada cultivar estudiado (incluso llegan a disminuir su actividad con el remojo), el remojo de las semillas siempre tiene como consecuencias una disminución en el tiempo de cocción, un ablandamiento de la semilla además de la testa y finalmente en las variedades oscuras o pintas (NJ, NO, NAM-38) una decoloración de la testa.
- Existe evidencia experimental suficiente para aseverar que los niveles de actividad de ramnogalacturonasa y de las glucanasas no son decisivos, ni los únicos factores a considerar para predecir la magnitud de la disminución en el tiempo de cocción de las semillas con el proceso de remojo.
- Es necesario establecer metodologías adecuadas que nos permitan cuantificar eficientemente la actividad de las enzimas en las diferentes etapas de remojo y de ser posible, determinar la actividad “in situ” de las mismas.

## 6.2. Bibliografía.

- Blancas, M. V. H. Estudio de las modificaciones en la pectina que ocurren durante el remojo de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Tesis de licenciatura UNAM, México D.F. pág. 3-17, 2001.
- Brett C., Waldron K. (1990) "Physiology and Biochemistry of Plants Cell Walls". Uniwin Hyman, London England, pp. 4-44.
- Breijo, F. G. (2008). *Universidad Politécnica de Valencia*. Recuperado el 25 de mayo de 2010, de [http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema\\_17.htm#Proceso de Germinación](http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema_17.htm#Proceso de Germinación).
- B. Ruiz Sesma, F. B.-C.-N.-L.-L. (2009). EVALUACIÓN DEL FRIJOL TERCIOPELO (*Stizolobium deeringianum*) REMOJADO, EN DIETAS PARA CERDOS EN CRECIMIENTO. *Universidad y ciencia* , 141-150.
- Carpita, N.C. McCann, M. (2000). The cell wall. In Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L. (Eds), "Biochemistry and Molecular Biology of Plants" (1<sup>st</sup> Edition). American Society of Plant Physiologist pp. 52-83.
- Cosgrove D.J. (1997). "Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants". *The Plant Journal*. 27-38.
- Cosgrove D. J. (1999). Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu. Rev. Plant Mol. Biology*, 50:391-417.

- Cosgrove D.J. (2005). "Growth of the plant cell wall". *Nature Reviews*. 6, 850-861.
- Cosgrove D. J. (2006). "Cell Walls: Structure, Biogenesis and Expansion". In Taiz L., Zeigel E. (Eds) "Plant Physiology" (Fourth Edition). Sinauer Associates, Inc. 350-360.
- Ibáñez, L. Y. Detección de hemicelulasas y su participación en la calidad culinaria de las semillas de frijol. Tesis de licenciatura UNAM. México D.F. pág. 15-23. 2009.
- Linder E. (1995) "Toxicología de Alimentos". 2ª Edición, Acribia, España.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser A. C., Krieger M. (2005) "Molecular Cell Biology." Freeman and company USA, pp. 231-232.
- Mattheus R. H. 1989. Legumes: Chemistry, technology and human nutrition. Ed. Borrad, New York. Pág. 187-196
- Mendieta, L.L. Participación de la beta-glucanasa y la alfa-amilasa en la calidad culinaria del frijol. Tesis de licenciatura UNAM. México D.F. pág. 24-39. 2009.
- Macrae R., Robinson R.K. Sadler M. J. (1993) "Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. Academic Press, USA, Vol. 1 y 4, pp 80-95.
- Minic, Z., Jouanin L. (2006) "Plant glycoside hydrolases involved in cell wall polysaccharide degradation", *Plant Physiology and Biochemistry*, pp. 44, 435-449.

- Nelson N. (1944) “a photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose”, *Journal Biol. Chem.*, 153, 375-379.
- Peña C., García H. E. (1995) “La pared celular” México: Universidad Autónoma de Chapingo, pp. 6-30.
- SAGARPA 2009  
[http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/sispro/IndModelos/SP\\_AG/Frijol/Descripcion.pdf](http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/sispro/IndModelos/SP_AG/Frijol/Descripcion.pdf)
- Srivastava M. L. (2002) “Plant Growth and Development”, Academic Press, USA, pp. 23-38.
- Suda N. K., Buckeridge S. M., Giogini J. F. (2003) “Cell Wall Hydrolases in seeds of *Euphorbia heterophylla*” *Brazilian Journal Plant Physiology*, 15, 3, 135-143.
- Waldron K. W. y Parker M. L. (2003) “Plant Cell Walls and Food Quality”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2,101-116.