



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**“CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE
PEROXIDASA, ÁCIDO FERÚLICO Y LIGNINA EN
PARED CELULAR DE FRIJOL DURANTE SU
ENDURECIMIENTO”**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

IVAN DE JÉSUS TINTOR PEREZ



MÉXICO, D.F.

2011



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: IRMA OFELIA BERNAL LUGO
VOCAL: SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
SECRETARIO: GLORIA DÍAZ RUIZ
1er. SUPLENTE: VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA
2° SUPLENTE: ARMANDO CONCA TORRES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 104, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

IRMA OFELIA BERNAL LUGO

SUPERVISOR TÉCNICO:

CARMEN JACINTO HERNÁNDEZ

SUSTENTANTE:

Ivan de Jesús Tintor Pérez



Agradecimientos.

A mis papas, por su apoyo incondicional durante mi vida estudiantil, por su paciencia cuando las cosas parecían no estar bien y todo su cariño a lo largo de mi vida. Los amo.

A Diana por estar a mi lado en los momentos buenos y malos, por su ayuda; pero sobre todo por dejarme ser parte de su vida.

A la Dra. Bernal por permitirme colaborar en su laboratorio y por todo lo que aprendí de usted en el tiempo que duro el proyecto.

A mis hermanos por que han estado cuando los necesito y sé que siempre lo estarán.

A mi tío Fernando Tintor por enseñarme cosas que no es posible aprender en ninguna escuela.

A mi familia por estar siempre al pendiente de mí. Yo siempre estaré al pendiente de ustedes.





A mis amigos de la facultad Pablo, Jorge, Juan José y Rafael ya que su enorme amistad solo es comparable con su enorme fealdad jajaja, además que aburrido hubiera sido todo este viaje sin ustedes. De igual modo quisiera mencionar a Rodrigo, Polo, Miguelon, Noel, Ariel, Monica, Ariadna, Karina, Paloma, Azalia, Ileri, Aaron y todas aquellas personas que conocí durante mi estancia en la facultad de química.

A Manuel, Yovanny, Ricardo, Erick, Abraham, Martin y Carlos por esos momentos donde uno puede dejar de preocuparse de las exigencias diarias y solo dedicarse a disfrutar de tan valiosas amistades.

También quiero agradecer a Miguel, Carmen, Iliana y Mariana por abrirme las puertas de su casa y brindarme su amistad.

Por último quiero externar mi gratitud a la UNAM por todos estos años de aprendizaje. Yo por mi parte prometo siempre honrar a mi alma mater.





Índice.

Resumen.	1
Abreviaturas.	3
Introducción	4
Antecedentes.	6
• Generalidades.	6
• Frijol en México.	6
• Estructura.	8
• Pared Celular.	8
• Peroxidasa.	10
• Ácido ferúlico.	10
• Lignina.	11
• Proceso de remojo.	12
• Proceso de cocción.	12
• Endurecimiento.	13
Hipótesis.	15
Objetivos.	16
Metodología Experimental.	17
• Material biológico	17
• Endurecimiento de la semilla.	17
• Determinación del tiempo de cocción.	17
• Obtención de la harina.	18
• Extracción de enzimas de pared celular.	19
• Determinación de proteína por el método de Lowry.	20
• Ensayo enzimático de la Peroxidasa (POX)	20
• Aislamiento y purificación de pared celular.	23





• Extracción de fenoles libres.	24
• Obtención de los fenoles de pared celular.	24
• Identificación y cuantificación de ácido ferúlico mediante la técnica de HPLC.	26
• Determinación del contenido de lignina en la pared celular.	27
Resultados y Discusión.	28
• Endurecimiento.	28
• Tiempo de cocción.	29
• Cuantificación de fenoles totales, ácido ferúlico y lignina.	30
• Actividad de POX.	35
Conclusiones.	40
Anexo I	41
Bibliografía.	43





Resumen.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) es altamente consumido en países en vías de desarrollo, debido a que es un alimento de bajo costo y representa un aporte importante de proteínas, carbohidratos y otras sustancias necesarias para la dieta diaria de los humanos. Para su consumo, esta semilla se remoja por 12-18 h y luego se cuece en agua caliente hasta alcanzar la textura y sabor agradable al consumidor. Éste cambio de textura se obtiene gracias a la separación de las células del cotiledón por efecto de la termosolubilización de la lamela media, estructura peptínica que mantiene unidas a las células adyacentes, y a la ruptura de puentes de hidrógeno entre los polisacáridos de la pared celular, lo que permite el aflojamiento de la pared celular. El tiempo necesario de tratamiento térmico para que la semilla sea palatable se denomina tiempo de cocción.

Cuando el frijol se almacena en condiciones inadecuadas de (temperatura >5 °C y humedad relativa > 50 %) ocurre un fenómeno que se conoce como endurecimiento o envejecimiento, teniendo como principal característica un aumento en el tiempo de cocción de la semilla. Por lo que el consumidor lo rechaza. A nivel molecular, este incremento en el tiempo de cocción se debe a la dificultad que presenta la lamela media para termosolubilizarse. Esta diferencia en termosolubilización de la lamela media podría deberse al entrecruzamiento de los polisacáridos por fenoles presentes en la pared celular. La formación de estos enlaces covalentes podría deberse a la actividad de las peroxidasas presentes en este mismo compartimento. En este trabajo se estudió el efecto del endurecimiento del frijol en la actividad de peroxidasa y en el contenido de fenoles de la pared celular del cotiledón. Para ello se aislaron las proteínas y los fenoles de la pared celular. Se encontró que la peroxidasa fue activa en semillas frescas y uno de sus sustratos fue el ácido ferúlico, polifenol de mayor abundancia en la pared celular.





Esta actividad enzimática disminuyó a medida que se incrementó el tiempo de endurecimiento de la semilla, pero siempre hubo actividad. Mientras que el contenido de ferúlico, esterificado a los polisacáridos de la pared celular, aumentó sólo hasta el momento en que el contenido de lignina se incrementó. A este tiempo, 90 d de almacenamiento, el endurecimiento del cultivar Bayo Mecentral fue de 1.6 veces y el contenido de lignina se incremento cuatro veces. Aparentemente el ácido ferúlico se utilizó como sustrato para la formación de aductos de ferúlico con lo cual los polisacáridos forman parte de una malla intramolecular que dificulta su termosolubilización, o bien el ferúlico da origen a los precursores de la lignina, con lo cual se formaría la lignina que también entrecruza a los polisacáridos. Los resultados anteriores indican que en la pared de las células del cotiledón existen elementos moleculares que permiten el entrecruzamiento de polisacáridos a través de enlaces covalentes formados entre polifenoles.





Abreviaturas.

- FM: Variedad Flor de Mayo.
- BM: Variedad Bayo Mecentral.
- TC: Tiempo de cocción.
- POX: Enzima Peroxidasa.
- [0]: Muestras control.
- [30]: Muestras almacenadas durante 30 días.
- [60]: Muestras almacenadas durante 60 días.
- [90]: Muestras almacenadas durante 90 días.
- AF: Acido Ferúlico.
- FT: Fenoles totales.
- FB: Fenoles hidrolizados en medio alcalino.
- FA: Fenoles hidrolizados en medio ácido.
- PC: Pared celular.
- HR: Humedad relativa.
- TA: Tiempo de almacenamiento.
- ERO: Especies reactivas de oxígeno.
- PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo





Introducción.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es altamente consumido alrededor del mundo, principalmente en países en vías de desarrollo, esto debido a que es un alimento de bajo costo y representa un aporte importante de proteínas, carbohidratos, minerales y otros componentes necesarios en la dieta diaria de los humanos. En poblaciones rurales de América Latina se estima que aporta el 50% de la proteína que se ingiere diariamente, además de contener minerales como calcio y magnesio, además de lisina un aminoácido esencial.

El frijol se puede preparar de distintas formas y también puede acompañar distintos tipos de platillos, no obstante, en todos los casos la semilla lleva un tratamiento previo el cual consiste en el remojo de la semilla y una cocción en agua hirviendo, hasta que se obtengan las características de textura y sabor deseadas.

Esto se consigue gracias a que hay una separación de las células de la semilla por efecto de la termosolubilización de la lamela media, estructura pectínica que mantiene unida a dos células adyacentes. La cocción también afloja la estructura de la pared celular y desencadena la gelatinización del almidón y la desnaturalización de las proteínas. El tiempo en ebullición requerido por la semilla para adquirir las características de palatabilidad exigidas por el consumidor, se le denomina tiempo de cocción.

Cuando el frijol se almacena en condiciones inadecuadas (temperaturas $>25^{\circ}\text{C}$ y humedades relativas $>50\%$) ocurre un fenómeno que se le conoce como endurecimiento o envejecimiento de la semilla, cuya principal característica es un aumento en el tiempo de cocción del frijol, afectando la calidad culinaria del mismo, por lo que el consumidor





lo rechaza. Al incrementar este tiempo de cocción también aumenta el consumo de energía en los hogares y a su vez genera una disminución en las propiedades nutrimentales del frijol. En casos de deterioro extremo el frijol tiene que ser desechado.

Investigaciones previas han demostrado que este fenómeno de endurecimiento ocurre debido a que en la semilla se generan cambios físicos, bioquímicos y estructurales que dificultan la termosolubilización de la lamela media, provocando que sea más difícil la separación celular.

En estudios anteriores se ha observado que el contenido de fenoles, principalmente ácido ferúlico y lignina, es mayor en paredes celulares de frijoles endurecidos que lo encontrado en muestras control. La lignina es un polímero de fenoles que se forma en la pared celular por la acción de la peroxidasa, enzima presente en esta estructura. Esta enzima utiliza como sustratos a los polifenoles esterificados a los polisacáridos de la pared celular. Este polímero podría contribuir a la dificultad para termosolubilizar la lamela media en frijoles endurecidos. Por lo tanto en este trabajo se busca estudiar cómo se modifica el contenido de polifenoles, principalmente de ácido ferúlico y lignina así como la actividad de la peroxidasa durante el endurecimiento del frijol en dos variedades de que crecieron bajo las mismas condiciones ambientales.





Antecedentes.

Generalidades.

Los frijoles son las semillas comestibles de *Phaseolus vulgaris* L. Una especie de la familia de las leguminosas, de la cual se consume tanto la vaina verde como el grano seco (Voysesst, 2000). Esta leguminosa se cosecha durante todo el año, en climas fríos y cálidos y suelos de baja salinidad.

Se consume en mayor medida en países en vías de desarrollo debido a que es un alimento de bajo costo y representa un aporte importante de proteínas, carbohidratos, minerales y otros componentes de la dieta diaria de los humanos. En poblaciones rurales de América Latina se estima que aporta el 50% de la proteína que se ingiere diariamente, además de contener minerales como calcio y magnesio, además de lisina un aminoácido esencial (SAGARPA, 2009).

Frijol en México.

El frijol se cultiva en América Latina desde tiempos ancestrales, en México existen datos arqueológicos obtenidos en distintas localidades del país. En río Zape Durango, se encontraron restos con una antigüedad de 1300 años A.C., en la región de Ocampo, Tamaulipas la antigüedad de estos fósiles fluctúa entre los 6000 y 4300 años A.C. y los de la cueva de Coexcatlán situada en el valle de Tehuacán, Puebla, 7000 años A.C (Voysesst, 2000).

Actualmente a nivel mundial, México ocupa el quinto lugar entre los principales productores de frijol, detrás de Brasil, India, China y Myanmar (SAGARPA 2009). En





nuestro país, este cultivo ocupa el cuarto lugar de superficies sembradas y cosechadas, siendo los principales estados productores de esta semilla Sinaloa, Durango, Zacatecas, Chiapas, Chihuahua (Fig. 1), y en menor medida Nayarit, Guanajuato, Puebla, San Luis Potosí, Hidalgo y Oaxaca (SAGARPA, 2009). Según datos del INEGI, en México el 24% de la población vive en condiciones rurales, por lo que el consumo de esta semilla es fundamental para su alimentación, además su producción representa una importante fuente de trabajo para estas comunidades.



Figura 1. Principales estados productores de Frijol en México.

De la producción total de frijol en México sólo se comercializa un 75 %, ya que el 20 % es para autoconsumo y el 5 % restante representa pérdidas de la semilla durante su manejo poscosecha. Dentro del frijol comercializado, 39 % es para mayoristas los cuales distribuyen el frijol en tiendas de abarrotes mercados y tianguis, 26 % se va a las empacadoras para posteriormente llevarlo a las tiendas de autoservicio. La industria se queda con un 5 % y el 5 % restante se utiliza como semilla para futuras siembras (SAGARPA, 2009).





Estructura.

En el frijol al igual que en otras leguminosas se pueden distinguir dos regiones principales: La cáscara de la semilla o testa, donde se encuentran las características de color y diseño que distinguen a las familias de cada cultivar y la segunda región que es el embrión formado por los cotiledones y el eje embrionario. Los cotiledones representan el 90% del peso total de la semilla (Liu et al., 1995) y es aquí donde se realizan los cambios bioquímicos y fisicoquímicos inducidos por el endurecimiento así como por los procesos de remojo y cocción (Fig. 2).

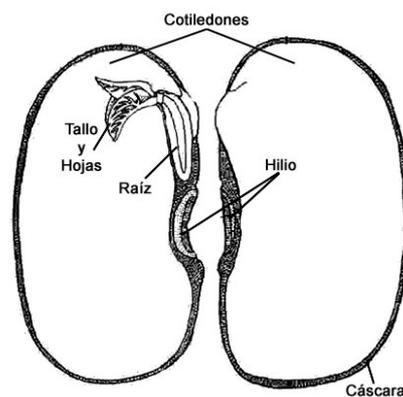


Figura 2. Corte transversal de una semilla de frijol.

(Imagen de internet.)

Pared celular.

La pared celular de tejidos vegetales en crecimiento está constituida por la pared celular primaria y la lamela media. Esta última es la responsable de mantener unidas a las células adyacentes.

Las células de los cotiledones de frijol tienen una pared primaria en la cual se distinguen dos fases: la microfibrilar y la amorfa. La primera constituida por celulosa y la segunda





por las sustancias pécticas y las hemicelulosas (Fig. 3), además la pared celular también contiene proteínas estructurales y catalíticas, compuestos fenolicos, agua y minerales.

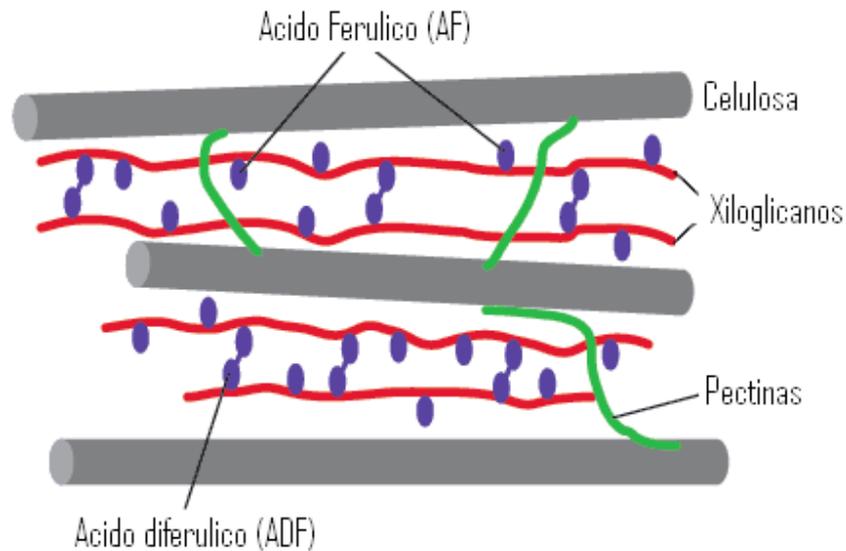


Figura 3. Estructura de la pared primaria donde se observa el acomodo espacial de la celulosa, hemicelulosa y pectinas.

Las microfibrillas de celulosa son el componente más resistente a la hidrólisis química así como a la acción enzimática presentes en la pared celular. Están compuestas de cadenas no ramificadas de β -(1-4)-D-glucano. La principal función de este polisacárido es la de proveer de forma y fuerza a la pared celular.

La hemicelulosa puede estar constituida de distintos polisacáridos, en el caso de las células de cotiledón, esta fracción está constituida principalmente de xilanos y xiloglicanos (Méndez, 2003).

La lamela media, estructura responsable de mantener unidas a las células adyacentes, se encuentra formada por pectinas. Las pectinas son polisacáridos de moléculas de ácido D-galacturónico, consta de 3 dominios característicos: homogalacturonanos, ramnogalacturonanos tipo I (más abundantes en dicotiledóneas) y ramnogalacturonanos tipo II (Bernal, 1994).





Peroxidasa.

De entre las muchas enzimas unidas a la pared celular, se encuentra la peroxidasa, la cual tiene como función la oxidación de compuestos fenolicos utilizando peróxido de hidrogeno como aceptor de electrones, tiene alta afinidad por ácidos hidroxicinamicos (Barceló, 1997) y se ha demostrado que está altamente distribuida en células que se están lignificando, por lo que se le asocia con la formación de lignina en células que han terminado su crecimiento (Barceló, 1997).

Ácido ferúlico.

Las células vegetales presentan diferentes vías metabólicas no existentes en células animales las cuales generan compuestos químicos que en primera instancia no son esenciales para la supervivencia de la célula (López, 2008). A este conjunto de vías metabólicas se les conoce como metabolismo secundario, y es en este en el que se generan los compuestos fenolicos, uno de estos es el ácido ferúlico. Este metabolismo secundario se activa por acción del estrés ambiental.

El ácido ferúlico (Fig. 4) es el principal ácido hidroxicinamico encontrado en paredes celulares. En dicotiledóneas se encuentra esterificado a residuos de arabinosa y galactosa de pectinas, por lo que se libera con disolventes alcalinos.

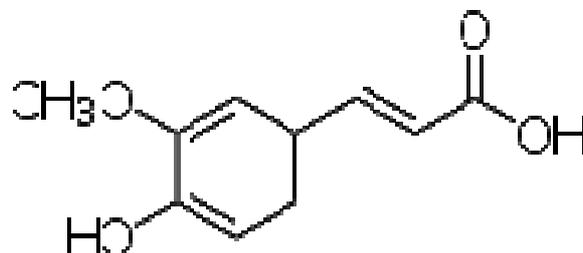


Figura 4. Estructura del ácido ferúlico.

(Imagen de internet.)





Lignina.

La lignina es un polímero en forma de malla de compuestos fenolicos (Fig. 5). Es un compuesto insoluble, no cargado que se una covalentemente a la hemicelulosa de la pared celular y de la lamela media (Barcelo, 1997), lo que genera que se incremente tanto la fuerza de interacción intra-elementos de la pared celular como la unión entre las células. La formación de la lignina depende de varios factores como son especie, tejido y tipo de célula, por lo que es un compuesto que varía mucho de especie en especie (Barceló, 1997).

La formación de este polímero confiere a las paredes celulares mayor resistencia a la degradación y se crea una barrera contra patógenos así como protección contra la luz ultravioleta.

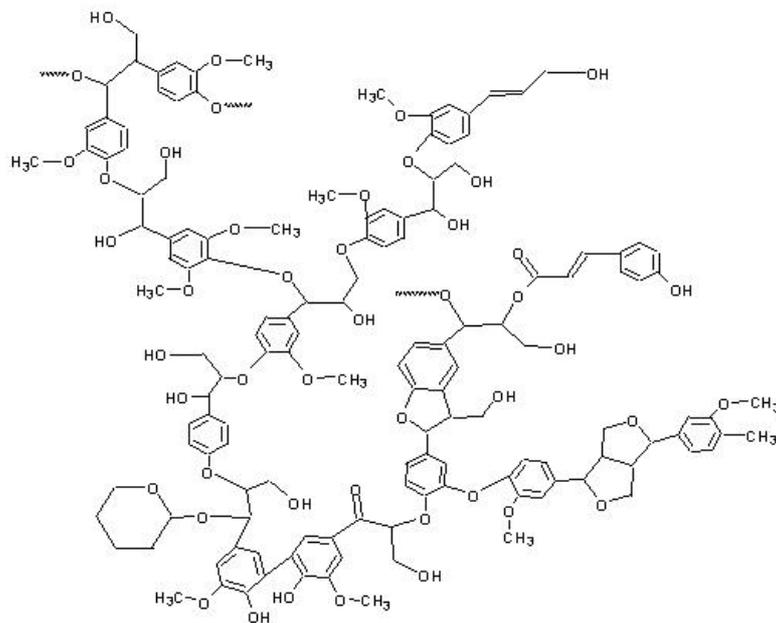


Figura 5. Ejemplo de un polímero de lignina.

(Imagen de internet.)





Proceso de remojo.

Los cambios que ocurren durante el remojo son dependientes de la cantidad de agua que absorba la semilla. Inicialmente el agua debe pasar a través de la testa y posteriormente la penetración y distribución homogénea del agua en los cotiledones (Quezada, 2005). Durante el remojo, los gránulos de almidón se hidratan y aumentan su volumen, los polisacáridos de la pared celular igualmente se hidratan causando una disminución en la adhesión intracelular, lo que genera una disminución en la dureza de la semilla (Fig. 6).

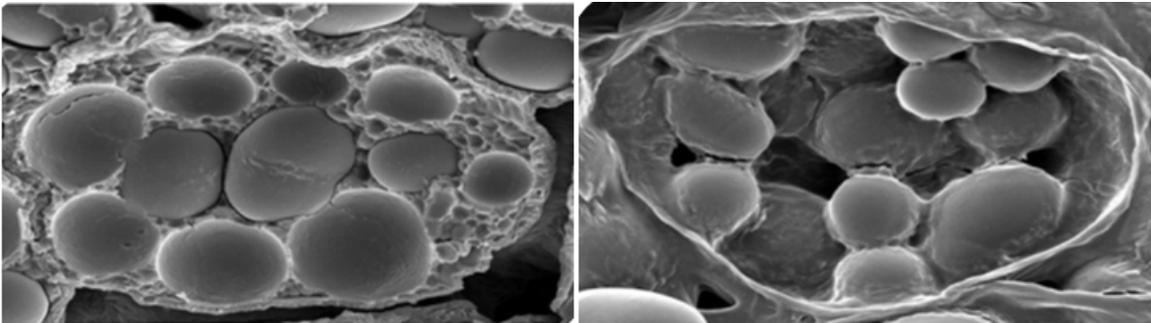


Figura 6. Fotografías de microscopía electrónica de una célula de cotiledón antes (izquierda) y después (derecha) del proceso de remojo.

Quezada 2005.

Proceso de cocción.

Durante la cocción del frijol la semilla se suaviza, pierde toxicidad, adquiere las características sensoriales deseables y aumenta su digestibilidad, lo cual se consigue gracias a los cambios fisicoquímicos que ocurren en los distintos compartimentos de las células del cotiledón.

El tratamiento térmico o cocción provoca tres cambios principales: Fractura y solubiliza la lamela media, separando las células adyacentes y disminuyendo la rigidez de la semilla (Fig. 7). En el citoplasma las proteínas se desnaturalizan y los gránulos de almidón se gelatinizan (Bernal, 1994).





Figura 7. Fotografía de microscopía óptica de varias células de cotiledón de frijol después del proceso de cocción.

Quezada 2005.

Endurecimiento.

Cuando la semilla es almacenada de manera inadecuada su tiempo de cocción se incrementa y se dice que el frijol se ha endurecido. Los principales factores que participan en el endurecimiento del frijol durante su almacenamiento son la humedad, la temperatura y el tiempo de almacenamiento. En estudios anteriores se ha demostrado que al aumentar la temperatura y la humedad relativa durante el almacenamiento, el proceso de endurecimiento se acelera (Bernal, 1994).

Debido a que el principal uso del frijol es para consumo humano y para ello debe cocinarse, el tiempo de cocción de la semilla es uno de los factores que más influye en la aceptabilidad de los diferentes genotipos del frijol. Durante la cocción ocurren cambios fisicoquímicos que producen que la semilla se suavice. En frijoles endurecidos resulta más difícil llevar a cabo estos cambios debido a que las estructuras que participan en el proceso de cocción se ven modificadas durante el endurecimiento (Machado, 2008). Estudios previos han demostrado que la cantidad de lignina es mayor en frijol endurecido que en fresco (Quezada, 2005). Esta mayor cantidad de lignina podría ser





uno de los factores que disminuyan la termosolubilización de la lamela media, lo cual se refleja en un aumento en el tiempo de cocción para los frijoles endurecidos ya que se ha demostrado que la velocidad de solubilización de la lamela media depende directamente del tamaño de las fibras de pectina, así como de las interacciones que se establezcan entre estos polisacáridos y las sustancias asociadas a la pared celular.





Hipótesis.

El frijol endurecido se caracteriza por un incremento en el tiempo de cocción, el cual se acompaña de un incremento en el contenido de lignina en la pared celular, respecto de su control. Dado que la lignificación de la pared celular requiere de la actividad de peroxidasa y de ácido ferúlico, en este trabajo se hipotetizó que durante el endurecimiento del frijol se debe incrementar el contenido de ácido ferúlico en la pared celular y en este compartimento celular debe estar activa una peroxidasa que utilice ácido ferúlico como sustrato.





Objetivos.

Objetivo general.

Establecer la presencia de peroxidasas y polifenoles en la pared celular del cotiledón en el frijol. Así como el efecto del endurecimiento de esta semilla en la actividad de la enzima y en el contenido de los compuestos aromáticos antes mencionados.

Objetivos particulares.

- Determinar para los cultivares Flor de Mayo y Bayo Mecentral los tiempos de cocción en muestras control y endurecidas.
- Medir la actividad de la POX en muestras control y endurecidas.
- Medir la cantidad de fenoles totales en muestras control y endurecidas.
- Cuantificar el ácido ferúlico en muestras control y endurecidas.
- Cuantificar el porcentaje de lignina utilizando el control y la muestra más endurecida.
- Determinar si hay un cambio en la actividad de peroxidasa, así como en la cantidad de ácido ferúlico y lignina durante el fenómeno de endurecimiento.





Metodología Experimental.

Material biológico.

Se utilizaron semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cosecha 2008, variedad flor de Mayo (FM) y bayo Mecentral (BM) provenientes del campo experimental Valle de México, INIFAP, Texcoco, Estado de México. Las semillas fueron donadas por la Dra. Carmen Jacinto.

Endurecimiento de la semilla.

Se colocaron las semillas en un recipiente de plástico de tal modo que no quedaran muy encimadas, el cual al fondo contenía 2 litros de una disolución saturada de cloruro de sodio, los frijoles no hacen contacto con la disolución. Ésta mantuvo una humedad relativa del 75% dentro del recipiente herméticamente cerrado. Los recipientes se guardaron en una incubadora a 30 °C durante 90 días, y se tomaron muestras a los 30, 60 y 90 días. Las muestras control se almacenaron a 4 °C

Determinación del tiempo de cocción.

La prueba de cocción se realizó utilizando un cocinador tipo Mattson (Varriano-Marston y cols., 1981), el cual está constituido por un soporte con 3 discos, los dos superiores con 25 perforaciones cada uno que coinciden en posición con los 25 pozos del disco inferior. Las semillas se colocaron en los pozos y se sujetaron con varillas que atraviesan los discos superiores y quedan apoyados por la punta afilada en la semilla. En el otro extremo de la varilla se colocó una pesa de 200 g. Una vez ensamblado, el sistema se introdujo en ollas de aluminio con agua en ebullición, de tal modo que al reblandecer la semilla la pesa provocó que la varilla atravesara la semilla y se consideró como cocida.





Se registro el tiempo de cocción de cada una de las semillas y se construyó una gráfica de porcentaje de frijoles cocidos contra tiempo de cocción (Fig. 8). El TC_{50} , se calculo al interpolar en estas graficas, el tiempo que tardó el 50% de la muestra en cocerse.

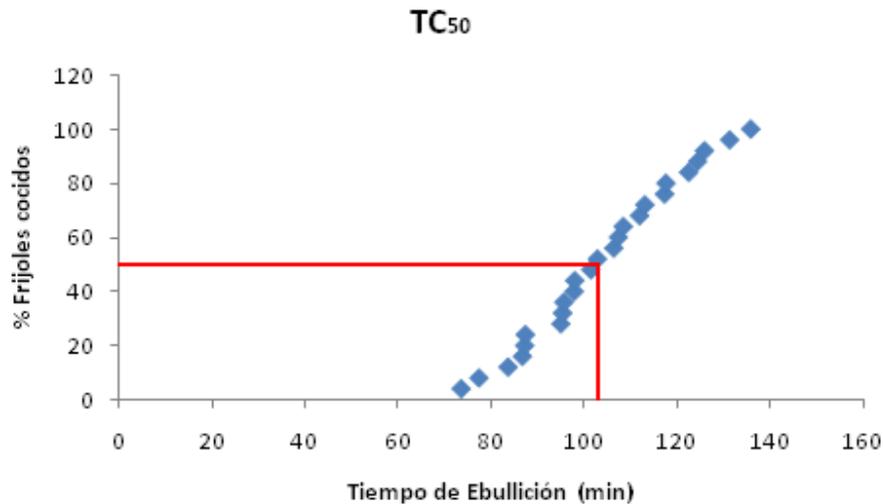


Figura 8. Porcentaje de frijoles cocidos de FM a diferentes tiempos de ebullición en el cocinador Mattson.

Obtención de la harina.

Se tomaron las semillas de frijol y con ayuda de una navaja se eliminaron las testas y los ejes embrionarios, dejando únicamente los cotiledones, los cuales se colocaron en una licuadora para hacer la harina, esto se realizo a una temperatura de 4°C. La harina se paso por un tamiz del N° 40 para asegurar que el tamaño de partícula fuese el mismo. La harina se almaceno a -70 °C.





Extracción de enzimas de pared celular.

Se peso un gramo de la harina y se homogeneizo en mortero con nitrógeno liquido. El polvo se transfirió a un matraz Erlenmeyer que contenía 15 mL de amortiguador A (acetato de sodio 0.05 M pH 5.8 y 0.2 mM de PMSF). Se agitó por cinco minutos a 4°C. Pasado este tiempo, se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un matraz Erlenmeyer limpio etiquetado como “enzimas de citoplasma” y se guardo a 4°C. Las pastilla se colocó nuevamente en un matraz que contenía 15 ml de amortiguador A dejando agitar por cinco minutos a 4°C. Nuevamente se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante se guardó en el mismo frasco que el sobrenadante anterior. La pastilla se colocó en un matraz Erlenmeyer que contenía 15 ml de amortiguador A conteniendo cloruro de sodio 1 M y se puso a agitar durante noventa minutos a 4°C. Pasado ese tiempo se centrifugo a 12000 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante se colocó en una bolsa de diálisis y se sumergió en un recipiente que contenía 4L del amortiguador A sin PMSF. La diálisis se realizó durante 3 horas a 4°C; el amortiguador se cambió cada hora.

El contenido de la bolsa de diálisis (celulosa, 6000 – 8000 D) se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 15000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se guardo a 4°C. Éste constituyó el extracto enzimático enriquecido en proteínas de pared celular.





Determinación de proteína por el método de Lowry

Disoluciones

- Disolución A (Na_2CO_3 2%, NaOH 0.4%, tartrato de potasio 0.16% y SDS 1%).
- Disolución B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4%).
- Reactivo de Folin.

Para cuantificar la cantidad de proteínas presentes en el extracto enzimático se llevó a cabo el método de Lowry (Pacheco, 2003). En tubos de ensayo se colocaron 0.2 mL del extracto enzimático de frijol, 1 mL de disolución C (mezcla de disolución A y disolución B proporción 100:1) y 0.15 mL de agua destilada. Se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y se agregó 0.1 mL de reactivo de Folin (Sigma), se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente para desarrollar el color. Se leyó a una longitud de onda de 660 nm utilizando un espectro de UV-Visible marca Shimadzu modelo UV-1601. Siguiendo la misma metodología se preparó una curva estándar con una disolución de albumina serica bovina dentro de un intervalo de 0 – 100 μg .

Ensayo enzimático de la peroxidasa (POX).

Para este ensayo se siguió la metodología de Sigma, el cual es el proveedor de los reactivos utilizados.

Disoluciones

- Amortiguador de fosfato de potasio (NaH_2PO_4) 100 mM, pH 6.0.
- Peróxido de hidrogeno 0.50% (H_2O_2).
- Disolución de pirogalol 5%.
- Disolución de enzimas.





Se determino la actividad de peroxidasa de acuerdo a la siguiente reacción:



En tubos de ensayo limpios y secos se adicionaron los reactivos en el siguiente orden:

Tabla 1.

Reactivo (mL)	Blanco	Prueba
Agua desionizada	2.10	2.10
Amortiguador fosfatos	0.32	0.32
Peróxido de hidrogeno	0.16	0.16
Pirogalol	0.32	0.32

Se mezclaron por inversión, incubando a una temperatura de 20°C. Se monitoreo la $A_{420\text{nm}}$ en un equipo de UV-Visible marca Shimadzu modelo UV-1601 hasta que se mantuvo constante, generalmente la absorbancia tardo 3 minutos en estabilizarse y luego se añadió la enzima, según se indica abajo.

Tabla 2.

Reactivo (mL)	Blanco	Prueba
Amortiguador fosfatos	0.10	-----
Disolución de enzimas	-----	0.10

Se mezclo por inversión y se anoto el incremento de la absorbancia cada 20 segundos durante 5 minutos. Los datos de $A_{420\text{nm}}$ y el tiempo (en minutos) se graficaron y se calculó la pendiente al primer minuto del ensayo. La figura 9 nos muestra un ejemplo de la grafica obtenida para los ensayos enzimáticos.



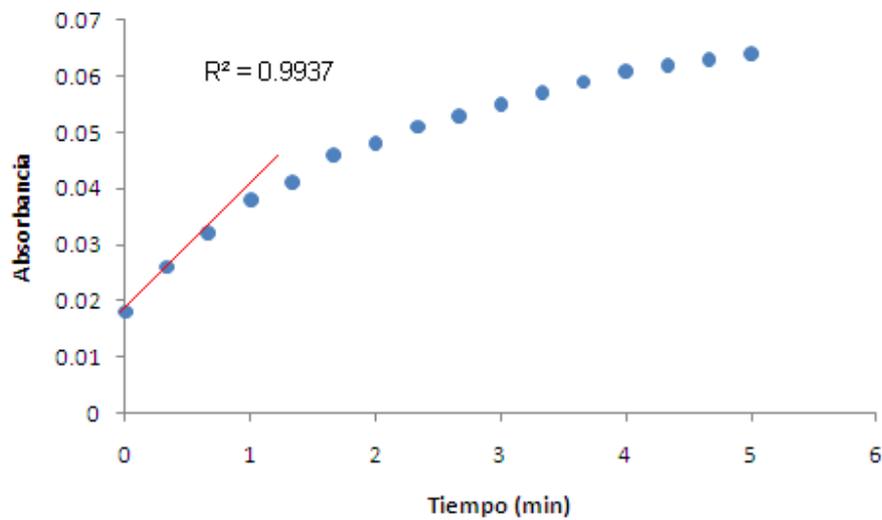


Figura 9. Grafico de la cinética enzimática para POX de BM

La actividad de la enzima se calculo en U, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia}}{\text{Tiempo (min)}} \times \frac{3}{0.1} \times \frac{1}{12}$$

Donde:

m= Pendiente obtenida de la grafica.

3= Volumen final del ensayo en mL.

12= Coeficiente de extinción para 1mg/mL de purpurogallin.

0.1= Volumen de enzima agregado en mL.

Una unidad de peroxidasa es la cantidad de enzima que produce un μg de pirogallina por minuto.





Para obtener la actividad específica ($U \text{mg}^{-1}$ de proteína). Las $U \text{ml}^{-1}$ se dividieron entre el contenido de proteína, expresada en mg, de un ml de extracto enzimático.

Para demostrar que la POX puede utilizar como sustrato al ácido ferúlico, el ensayo de esta enzima, también se realizó con ácido ferúlico. Se utilizaron como reactivos amortiguador de fosfatos 1 M pH 5.5, peróxido de hidrogeno 5 mM y una disolución de ácido ferúlico 2.5 mM. Los reactivos se agregaron de la siguiente manera:

Tabla 3.

Reactivo.	Cantidad (mL)
Amortiguador	0.1
Agua destilada	0.4
Ácido ferúlico	0.1
Peróxido de hidrogeno	0.1
Disolución de Enzimas	0.3

Se mezcló por inversión y se leyó el decremento en la absorbancia a 310 nm cada 30 segundos durante 10 minutos.

La actividad de la enzima se cálculo del mismo modo que con el pyrogalol, en este caso el coeficiente de extinción es de $11.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. En este caso la unidad de enzima se definió como la cantidad de enzima que consume un $\mu\text{mol} / \text{min}$.

Aislamiento y purificación de pared celular.

Para obtener las paredes celulares se tomaron 10 g de harina y se incubaron con 100 μL de α -amilasa termoestable/g de harina en 40 mL de una disolución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM pH 7.0 a 95 °C durante 30 minutos. La muestra se centrifugó a 4300 g durante 10 min, el sobrenadante (R1) se guardó a 4°C y la muestra se incubó por 60 minutos a 60 °C con 2.5 mg de proteasa/g de harina en 40 mL de una disolución





amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM pH 7.5. La muestra se lavó con agua desionizada agitando vigorosamente y se centrifugó a 4300 *g* por 10 min para retirar la proteasa en el sobrenadante. La pastilla se incubó por 60 minutos a 60 °C con 100 µL de amiloglucosidasa/g de harina en 40 mL de una disolución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM pH 3.0. La muestra se centrifugó a 4300 *g* por 10 min y se lavó con agua desionizada, acetona y metanol-cloroformo (1:1 v/v) consecutivamente. La muestra se colocó en un desecador para obtener la pared celular seca la cual se almaceno a 4 °C

Extracción de fenoles libres.

Se pesó 1 g de la harina de frijol y se colocó en un tubo de teflón junto con 20 mL de una disolución que consistía en 50% metanol, 48% agua destilada y 2% de ácido clorhídrico 6 M para extraer los fenoles libres. Se le adicionó gas nitrógeno al tubo y se dejó sonicando durante 1 hora. Pasado este tiempo la muestra se centrifugó a 9000 *g* durante 10 minutos. El sobrenadante correspondió al extracto de fenoles libres. La pastilla se desechó.

Obtención de los fenoles de pared celular.

Se tomaron 0.25 g de pared celular y se colocaron en un tubo de teflón junto con 10 mL de hidróxido de sodio 2 M, se le adiciono gas nitrógeno y se dejó en sonicación durante 2 horas. Posteriormente se le agregó 10 mL de una mezcla de 50% metanol, 48% agua y 2% de ácido acético y se colocaron nuevamente en sonicación por 15 minutos. La muestra se centrifugó a 9000 *g* por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se almacenó y se etiquetó como “fenoles alcalinos (FB)”, la pastilla se colocó nuevamente en el tubo de teflón junto con 10 ml de ácido clorhídrico 6 M, se le adicionó gas nitrógeno y se dejó en sonicación por 1 hora, Posteriormente se le agregaron 10 mL de una mezcla de 50% metanol, 48% agua y 2% de ácido acético y se dejó nuevamente en





sonicación por 15 minutos. La muestra se centrifugó a 9000 *g* por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se almacenó y se etiquetó como “fenoles ácidos (FA)”, la pastilla se almacenó a 4°C. Ambos extractos de fenoles se ajustaron a pH 3.

De las muestras FB y FA se midió el contenido de fenoles totales mediante el reactivo de Folin. Se tomaron 0.5 mL de cada extracto y se mezclaron con 0.75 mL de reactivo de Folin 1 N dejando en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos después de lo cual se agregaron 0.75 mL de carbonato de sodio al 20%. Se agitó fuertemente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 90 minutos. Después de este tiempo se midió la absorbancia a 760 nm. Siguiendo el mismo procedimiento se construyó una curva patrón a partir de ácido ferúlico.

Las muestras de FB y FA ya ajustadas a pH 3, se agitaron por 30 minutos con acetato de etilo en proporción 1:1, para llevar a cabo la extracción de los fenoles de la fase acuosa. La fase orgánica (acetato de etilo/compuestos fenolicos) se colectó y a la fase acuosa se le repitió el procedimiento anterior dos veces más, colectándose las fases orgánicas en el mismo frasco. Esta última muestra se llevó a sequedad utilizando un rotavapor marca Heidolph modelo R-78. Los fenoles de pared celular se disolvieron en 200 μ L de metanol grado HPLC.

Identificación y cuantificación de ácido ferúlico mediante la técnica de HPLC.

Para la identificación y cuantificación de ácido ferúlico en las muestras se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (método modificado de Barcelo, 1997), utilizando un equipo marca Waters, con un sistema de bombeo modelo Waters 510. La fase móvil o eluyente que se utilizó fue acetato de sodio 0.01 M/ácido acético en proporción 96:4. La fase móvil se ajustó a un pH de 3 y fue filtrada usando el sistema Millipore y desgasificada en un sonicador durante 30 minutos. El flujo utilizado fue de 1





ml/min, el volumen de muestra inyectado fue de 20 μL y se leyó a una $\lambda = 280 \text{ nm}$ utilizando un detector integrado al equipo modelo Waters 486. La fase estacionaria fue una columna C18. Se realizó una curva de calibración para el ácido ferúlico bajo las condiciones mencionadas anteriormente utilizando concentraciones de 50 – 600 ng, haciendo lecturas cada 50 ng. En la figura 10 se ven los cromatogramas obtenidos para el AF estándar y dos muestras trabajadas.

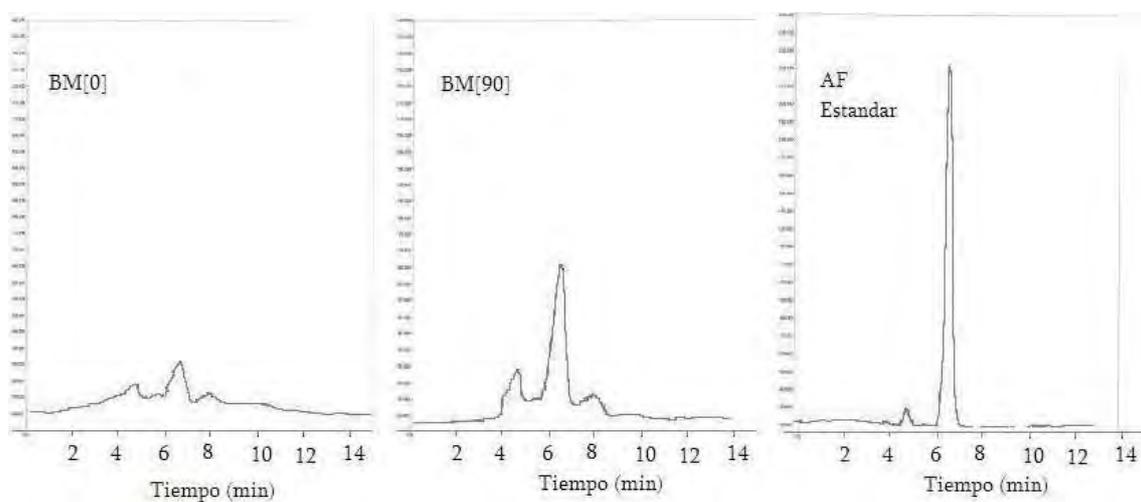


Figura 10. Cromatogramas para AF estándar y muestras de BM para 0 y 90 días de almacenamiento. En el eje de las ordenadas la escala es de 20 – 500 mV.

Determinación del contenido de lignina en la pared celular.

El contenido de lignina se determinó en las paredes celulares por el método de Liyama y Wallis (1990). Se pesaron 50 mg y se resuspendieron en 2 mL de cloruro de acetilo/ácido acético glacial (1/3) y 80 μL de ácido perclórico en un tubo de ensayo con rosca, dentro de un tubo de hierro sellado a 70 °C durante 30 minutos. Los tubos se agitaron cada 10 minutos. Después de terminar la digestión, los tubos se enfriaron en hielo y se centrifugaron a 1000 rpm por 1 min. Del sobrenadante se tomaron 500 μL y se transfirieron a un tubo de ensayo, adicionando 2 mL de ácido acético y 500 μL de





hidróxido de sodio 2 M. El contenido de lignina se estimó midiendo la absorbancia de la muestra a una $\lambda = 280$ nm utilizando un espectro marca Shimadzu modelo UV-1601. El contenido de lignina se calculo con la misma ecuación que utilizaron Liyama y Wallis en sus experimentos donde 20.91 es el factor de absortividad de la lignina.

$$\text{Porcentaje de Lignina} = 5.12 \times \text{absorbencia} / 20.91 - 0.74$$





Resultados y Discusión.

Endurecimiento.

De las variedades de frijol de FM y BM se tomaron las muestras de 0 y 90 días de almacenamiento en condiciones adversas (75% HR y 30 °C) y se comparó el cambio en su pigmentación. En ambos casos (Fig. 11 y 12) se pudo observar que las muestras con 90 días de endurecimiento incrementaron su color café con respecto a la coloración del frijol control, esto debido a que en la testa durante el endurecimiento ocurre un fenómeno conocido como oscurecimiento en el cual participan los fenoles y una enzima llamada polifenoloxidasa, provocando el cambio de pigmentación de la testa (Chang 1990).



Figura 11. Comparación FM [0] y FM [90] en la cual se observa el cambio en el color de la testa durante el endurecimiento.



Figura 12. Comparación BM [0] y BM [90] en la cual se observa el cambio en el color de la testa durante el endurecimiento.





Tiempo de cocción.

Para ambas variedades se tomaron muestras a los 0, 30, 60 y 90 días de almacenamiento y se les determino el tiempo de cocción, obteniendo los resultados que se presentan en el figura 13. Los resultados indican que el tiempo de cocción de ambos cultivares se incrementó a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, la velocidad con que este cambio ocurrió fue mayor para el cultivar BM (1.6X) que para el FM (1.2X)

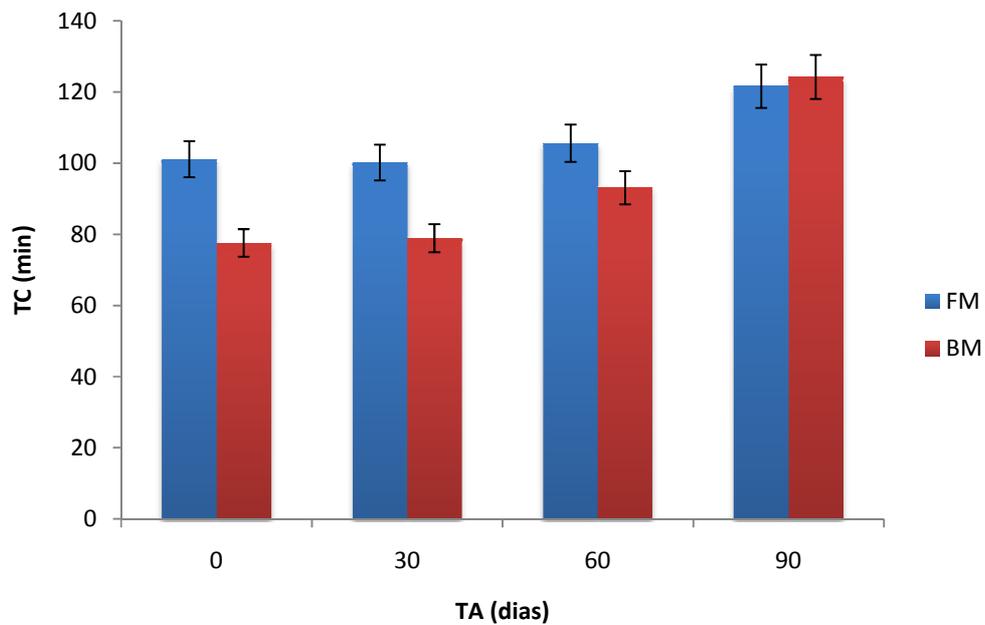


Figura 13. Cambio del TC₅₀ para BM y FM en relación con el tiempo de almacenamiento. Se muestra el promedio de 3 repeticiones.





Cuantificación de fenoles totales, ácido ferúlico y lignina.

Diversos autores han reportado que el endurecimiento del frijol es un fenómeno multicausal y que una de estas es la formación de enlaces covalentes entre los fenoles presentes en la pared celular del cotiledón (Garcia y cols., 1998), lo que conduce a la lignificación de la pared celular, dificultando y algunas veces impidiendo la termosolubilización de los polímeros de la pared celular. Para demostrar si algo similar estaba sucediendo en los cultivares estudiados, se cuantificaron los fenoles totales presentes en pared celular y por HPLC se cuantificó el contenido de ácido ferúlico (AF) ya que en frijol carioca y en semillas de frijol cultivadas en USA se demostró que este fenol es el más abundante en la pared celular frijol (Machado y cols., 2008).

Los fenoles de la pared celular se obtuvieron mediante una hidrólisis ácida y una básica, sin embargo la concentración de fenoles totales en medio ácido fue muy baja en comparación con los obtenidos de la hidrólisis en medio básico y en la primera no se detectó la señal del ácido ferúlico en el HPLC por lo que en la figura 14 solo se presentan los resultados para la hidrólisis básica.

El contenido de fenoles totales en ambos cultivares fue semejante y a medida que se incrementó el tiempo de almacenamiento en condiciones adversas, estos compuestos se incrementaron (fig. 14). Sin embargo, la velocidad de este aumento fue mayor en el cultivar BM, cultivar que presentó la mayor velocidad de endurecimiento, no obstante la magnitud del incremento fue similar. El cultivar FM a los 90 días de endurecimiento presentó un incremento en el contenido de fenoles de 2.8 veces, mientras que para BM el máximo incremento se presentó a los 60 días y fue de 2.4 veces.



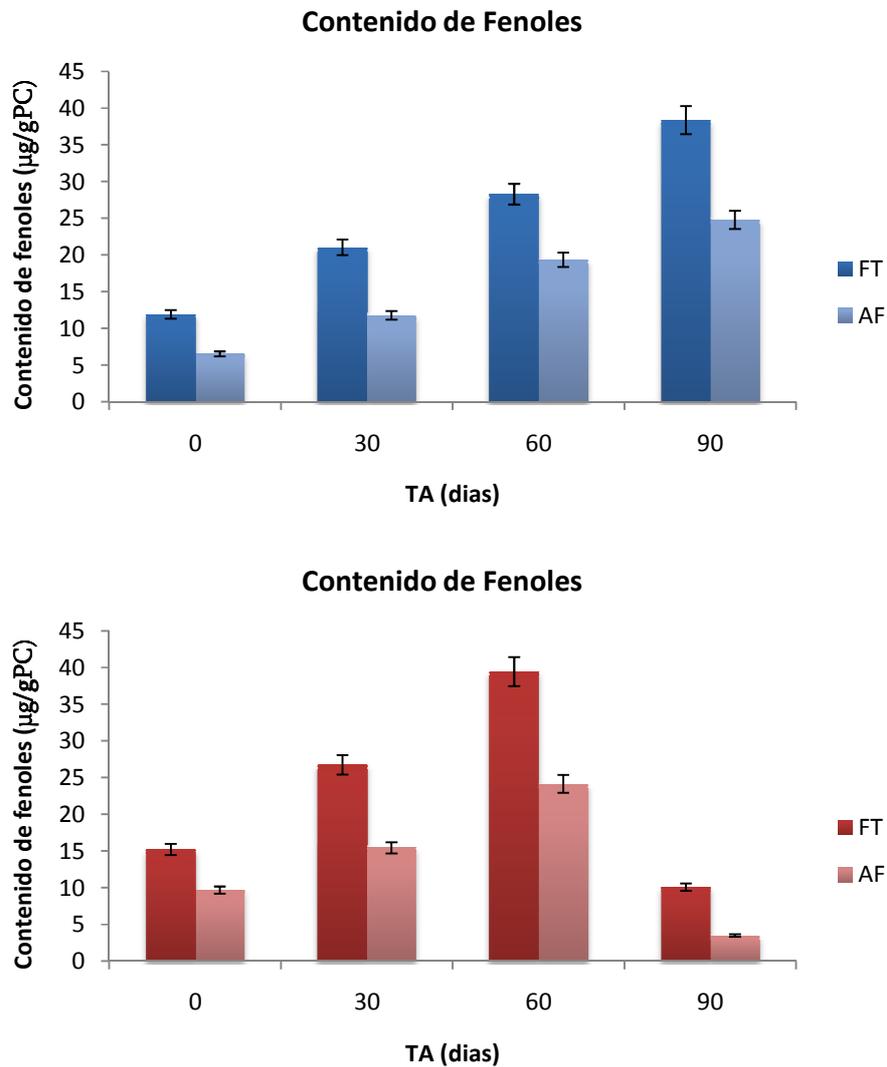


Figura 14. Cambio en el contenido de fenoles totales y ácido ferúlico en pared celular para FM (azul) y BM (rojo) durante el periodo de almacenamiento.

Los resultados en la figura 14 también muestran que el ácido ferúlico representa entre el 55% al 65% de los fenoles totales. En ambos cultivares se observa que la cantidad de ácido ferúlico detectado, al igual que la de fenoles totales, aumenta con respecto al tiempo de almacenamiento, sin embargo a los 90 días de almacenamiento en el cultivar BM tanto los fenoles totales, como el ácido ferúlico no solo no incremento, si no que





disminuyo de manera muy importante (96%) con respecto al mayor contenido de AF que fue a los 60 días de almacenamiento. También se grafico el contenido de ácido ferúlico contra el tiempo de cocción de frijol a los diferentes periodos de almacenamiento en condiciones adversas, encontrándose una correlación de 0.994 para el cultivar FM y de 0.993 para BM (fig. 15). En este último solo se tomaron en cuenta los tiempos de almacenamiento en los cuales se incremento el contenido de ácido ferúlico.

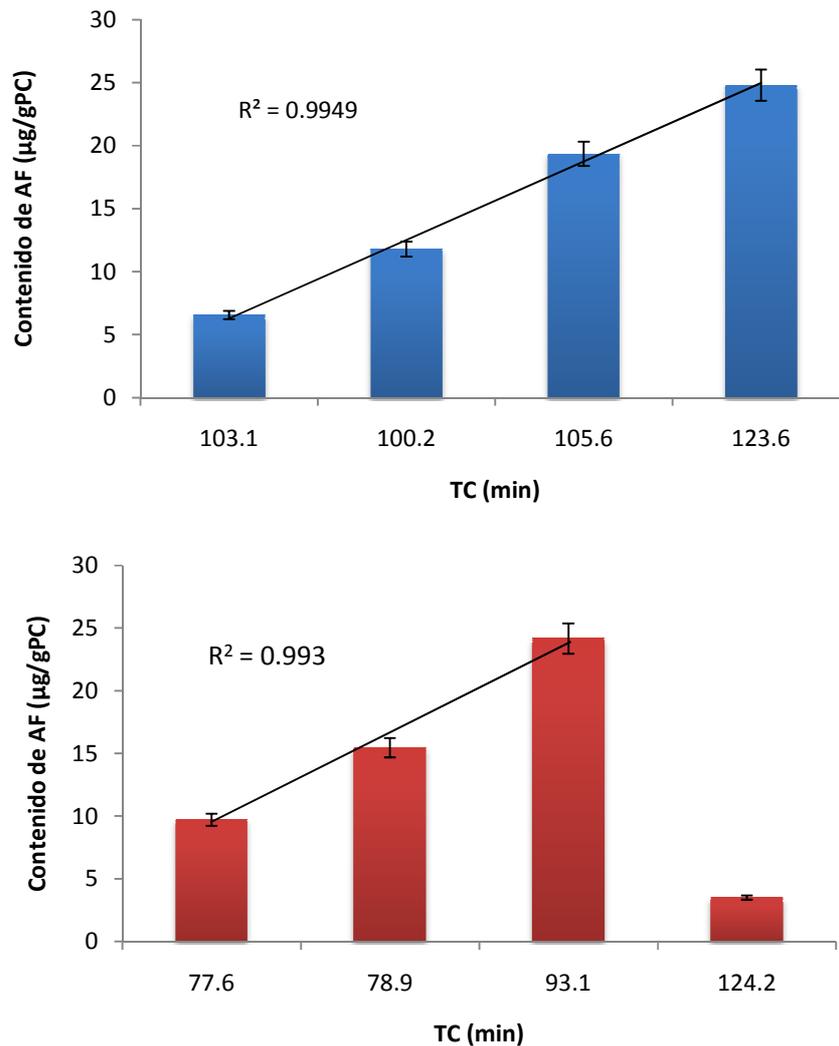


Figura 15. TC contra contenido de ácido ferúlico para los cultivares FM (azul) y BM (rojo) durante su endurecimiento.





El origen del incremento del ácido ferúlico en la pared de las células del cotiledón es difícil de explicar, dado que durante el almacenamiento no hay metabolismo celular, porque el contenido de agua de la semilla es menor al 20% (Vertucci, Leopold, 1986). Sin embargo, se debe considerar que dada la hidrofiliidad de la pared celular es muy probable que la A_w en la misma sea de tal magnitud que permita la actividad de algunas enzimas de pared celular que utilicen algún precursor del ácido ferúlico. Este polifenol podría formarse a través de la metilación del ácido cafeico (Lam y cols., 1996). Desafortunadamente no se cuantificó este metabolito, ni se conoce si en la pared celular se encuentra alguna actividad de O – metil transferasa que utilice como sustrato el ácido cafeico. Aunque se cree que el ferúlico presente en la pared se esterifica al arabinoxilano antes de ser secretado (Bunzel y cols., 2004). Tomando en cuenta esta última sugerencia, la otra posibilidad para explicar que el AF se incremente en la pared celular durante el almacenamiento de las semillas es a través de que se depositen nuevas fibras de arabinoxilanos esterificadas con AF. Estas podrían estar presentes en vesículas membranales, las cuales podrían provenir del aparato de Golgi y estar localizadas muy cerca de la membrana plasmática y que por efecto de la hidratación de la pared celular durante el almacenamiento se generase alguna señal que indujera la secreción de las fibras de arabinoxilanos esterificados con AF. Aparentemente los fenoles presentes en citoplasma podrían estar contribuyendo al incremento de fenoles en pared celular, ya que estos disminuyen al incrementar el tiempo de almacenamiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Concentración de fenoles libres en FM y BM sin y con almacenamiento por 90 días. Valores con letras diferentes en una misma columna presentan diferencias significativas entre ellos ($\alpha = 0.05$). Promedio de 3 repeticiones.

TA (días)	FL ($\mu\text{g FL/g Harina}$)	
	FM	BM
0	81.169 \pm 0.358 ^a	109.063 \pm 0.562 ^a
90	50.612 \pm 0.434 ^b	66.981 \pm 0.712 ^b





Con la finalidad de explicar porqué en el cultivar BM el contenido de AF desciende a los 90 días de almacenamiento, se cuantificó en ambos cultivares, el contenido de lignina en la pared celular aislada de la semilla control y la de 90 días de almacenamiento.

En la figura 16 se puede apreciar que la cantidad de lignina en la pared celular aislada de las semillas control fue mayor en FM (0.29%) que en BM (0.17%). Aparentemente el tiempo de cocción de frijol fresco está asociado con el contenido de lignina inicial ya que el cultivar que presentó mayor contenido de lignina fue aquel que también presentó un mayor tiempo de cocción. El almacenamiento por 90 días, de la semilla BM incremento 4 veces el contenido de lignina, mientras que en el mismo período de almacenamiento en el cultivar FM sólo se incremento en 1.3 veces. Estos resultados sugieren que la capacidad de lignificación está asociada con la velocidad de endurecimiento. Ya que el BM que es el cultivar que presentó mayor velocidad de endurecimiento y también fue el que mostró mayor capacidad para formar lignina.

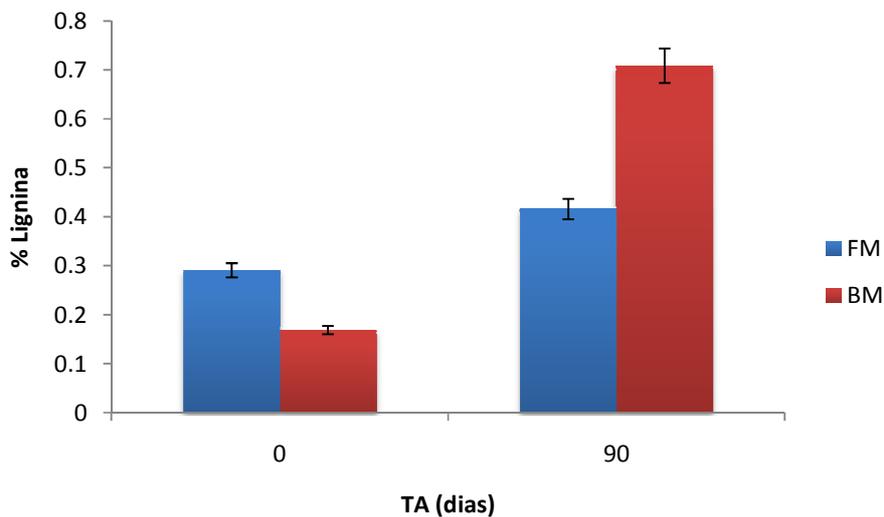


Figura 16. Cambio en el porcentaje de lignina para FM y BM a los 0 y 90 días de almacenamiento. Promedio de 3 repeticiones





Se ha demostrado que el ácido ferúlico esterificado a polisacáridos de pared celular es quien sirve de enlace para formar los puentes de éter con los monómeros de la lignina como son los alcoholes sinapilo y siríngiclo (Bunzel y cols., 2004). La formación de este último enlace se forma extracelularmente por acción de las peroxidasa presentes en la pared celular. Por lo que se cuantificó la actividad de POX en la pared celular de estos cultivares.

Actividad de POX.

La actividad enzimática de la POX se cuantificó determinando la formación de pirogalin durante cinco min, basándonos en la metodología propuesta por el proveedor (Sigma) de los reactivos. La reacción se inició por la adición del extracto enzimático (ver métodos) y se gráfico el cambio en D.O. vs tiempo (fig. 17). Un análisis cuidadoso de estas gráficas mostró que en el cultivar FM a los 30 días de almacenamiento y las generadas para el cultivar BM, mostraron dos pendientes, aún cuando la concentración del sustrato (pirogalol 40 mM y H₂O₂ 14.7 mM), utilizadas estaban al menos 10 veces por enzima de los Kms reportadas para cada reactivo participante en la reacción (Suzuki y cols., 2006). Dado que en este trabajo, el ensayo de actividad de peroxidasa , se realizó en condiciones de saturación de la enzima, las dos pendientes en el curso de la reacción enzimática podrían deberse a que 1) la reacción es muy rápida y la velocidad inicial incluye sólo los primeros tiempos del curso de reacción; 2) la reacción es reversible, por lo que después de cierto tiempo el producto podría desplazar el equilibrio hacia los sustratos y por eso se observa una velocidad más lenta; 3) Una vez que se termina el peróxido de hidrógeno probablemente el pirogalol o la pirogalin se oxiden lentamente con el oxígeno del aire; 4) El peróxido esta cambiando rápidamente, es decir que en el extracto haya algún sustrato o enzima que también use este peróxido. Por lo anterior,





para calcular la actividad de la POX presente en la pared celular de la semilla de frijol se consideró sólo la pendiente inicial es decir el primer minuto en todos los casos.

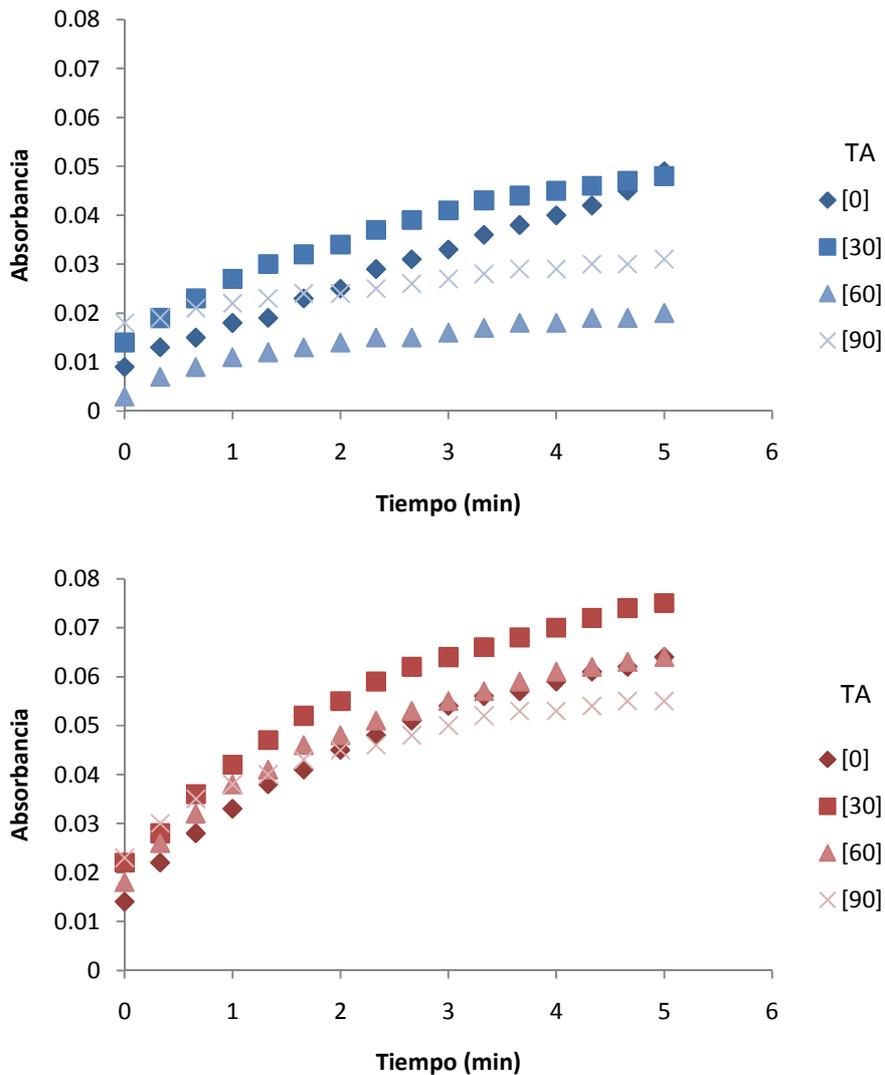


Figura 17. Cambio en la absorbancia durante el ensayo enzimático para FM (azul) y BM (rojo) durante el endurecimiento.

En la semilla control de FM se detectó una actividad específica de POX menor que la detectada en BM. En ambos cultivares la actividad de la enzima permanece constante hasta los 30 días de almacenamiento. En el caso de FM la actividad tiene un pequeño





descenso a los 60 días de almacenamiento y es a los 90 días cuando tiene un descenso alrededor del 50%, para el cultivar BM la enzima conserva la misma actividad hasta los 60 días de almacenamiento, y es hasta los 90 días cuando está disminuye un 34% (figura 18). El hecho de que la actividad de POX fuese detectada en la semilla control indica que la POX es una enzima latente, depositada en la pared celular durante el desarrollo de la semilla, al igual que otras actividades enzimáticas y que sólo se necesitan de la hidratación de la semilla para reactivarse (Drapron, 1985).

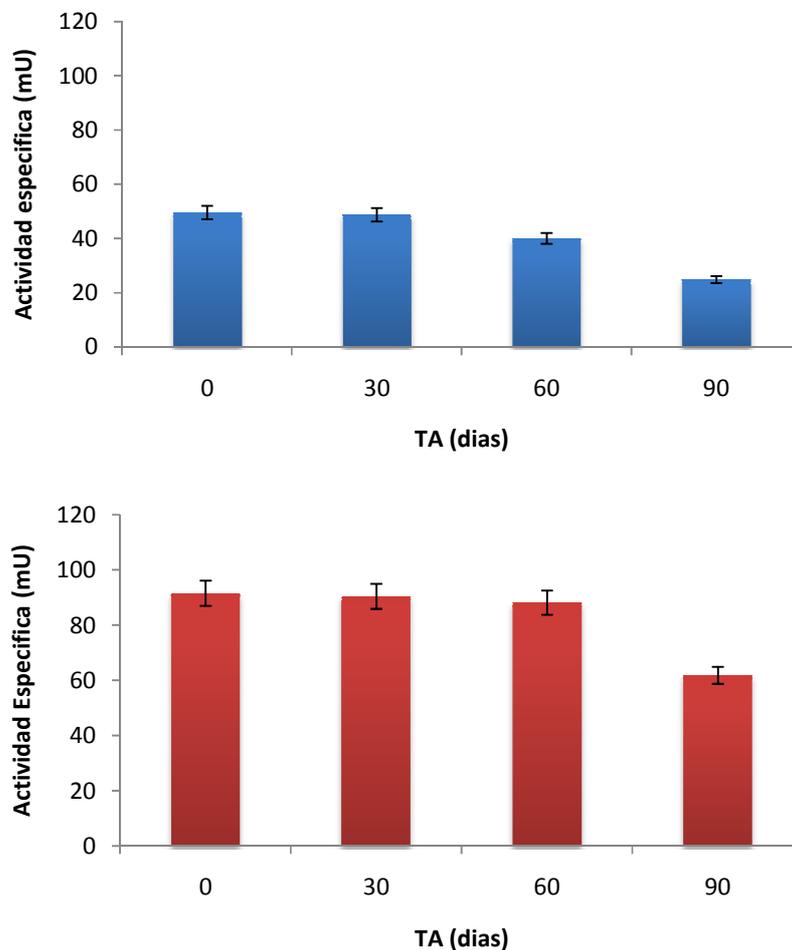


Figura 18. Cambio en la AE de POX para FM (azul) y BM (rojo) durante el almacenamiento.





Esta disminución en la actividad de la POX puede ser consecuencia de reacciones de Maillard (Wettlaufer y Leopold, 1991) o por la reacción de algunos de los aminoácidos de las proteínas con las sustancias volátiles (acetaldehído y formaldehído) que generan las semillas durante su almacenamiento y que modifican la estructura de la proteína “in situ” (Zhang y cols. 1997).

Diversos autores han demostrado que en diversos tejidos en crecimiento y antes de que se realice la lignificación de los internodos, se detectan peroxidasas capaces de catalizar la formación de lignina utilizando como núcleos de lignificación los grupos de ferúlico esterificado a las pentosas que forman parte de las hemicelulosas (Lam y cols., 1996). Con la finalidad de determinar si en el extracto enzimático de POX de pared celular aislada de frijol BM estaba presente una peroxidasa capaz de utilizar AF como sustrato, se realizó la determinación de esta enzima utilizando este sustrato, en el cuadro 2 se observa que efectivamente el extracto enzimático contenía una peroxidasa con tales características, cuya actividad disminuyó por efecto del almacenamiento. Esta disminución se explica porque al formarse la lignina, la POX que la sintetiza queda atrapada en esta malla y ya no es soluble en amortiguadores con alta fuerza iónica que fue el método utilizado en este trabajo para extraer la POX de la pared celular.

Cuadro 2. Efecto del almacenamiento sobre la AE de BM utilizando ácido ferúlico como sustrato. Valores con letras diferentes en una misma columna presentan diferencias significativas entre ellos ($\alpha = 0.05$). Promedio de 3 repeticiones.

TA (días)	AE (mU)
0	15.70 ± 0.72 ^a
90	9.77 ± 1.79 ^b





Los resultados anteriores se pueden integrar en el siguiente modelo. En condiciones adversas de almacenamiento la semilla de frijol se endurece. La velocidad de este endurecimiento depende de la capacidad del cultivar para formar lignina. Esta capacidad a su vez depende de la actividad de peroxidasa de pared celular y de la velocidad con que acumule ácido ferúlico en la pared celular.





Conclusiones.

- La velocidad de endurecimiento fue mayor para el cultivar Bayo Mecentral que para Flor de Mayo.
- La concentración de fenoles totales y ácido ferúlico es mayor en el cultivar Bayo Mecentral que en Flor de Mayo.
- El ácido ferúlico representa alrededor del 60% de la concentración de fenoles totales para ambos cultivares.
- La actividad de Peroxidasa de guaiacol es mayor en Bayo Mecentral que en Flor de Mayo.
- La Peroxidasa aislada de BM es capaz de utilizar al ácido ferúlico como sustrato.
- El porcentaje de lignina en pared celular aumenta 4 veces en el cultivar Bayo Mecentral durante el endurecimiento en relación con el control, mientras que en Flor de Mayo solo cambia 1.2 veces.
- El contenido de fenoles libres de citoplasma disminuye durante el endurecimiento para los dos cultivares, por lo que es probable que estos fenoles migren a la pared celular durante el periodo de almacenamiento.
- El cambio en los compuestos estudiados es dependiente del genotipo y no solo de las condiciones en las que creció la semilla.
- Como el cultivar Bayo Mecentral tiene la velocidad endurecimiento mayor y a su vez presenta una mayor concentración de ácido ferúlico y lignina en pared celular, podemos concluir que es muy probable que estos compuestos estén asociados con el aumento en el tiempo de cocción del frijol.





Anexo 1.

Tablas de datos experimentales.

En el cuadro 3 se encuentran los tiempos de cocción para BM y FM durante su endurecimiento.

Cuadro 3. Efecto del almacenamiento sobre el tiempo de cocción de FM y BM. Valores con letras diferentes en una misma columna presentan diferencias significativas entre ellos ($\alpha = 0.05$). Promedio de 3 repeticiones.

TC (min)		
TA (días)	FM	BM
0	101.1a	77.6a
30	100.2a	78.9a
60	105.6a	93.1b
90	121.6b	124.2c

En el cuadro 4 se muestran los resultados obtenidos para los valores de AE para FM y BM durante el fenómeno de endurecimiento.

Cuadro 4. Efecto del almacenamiento sobre la AE de FM y BM. Valores con letras diferentes en una misma columna presentan diferencias significativas entre ellos ($\alpha = 0.05$). Promedio de 3 repeticiones.

AE (mU)		
TA (días)	FM	BM
0	49.75 ± 5.06a	95.91 ± 7.00a
30	49.27 ± 2.88b	99.64 ± 1.59a
60	36.07 ± 1.88b	87.48 ± 1.08a
90	24.59 ± 3.13c	52.84 ± 2.58b





Los datos obtenidos de la concentración de fenoles totales y de ácido ferúlico para cada cultivar durante el endurecimiento se presentan en el cuadro 5.

Cuadro 5. Concentración de FT y AF en pared celular de cotiledón para FM y BM. Valores con letras diferentes en una misma columna presentan diferencias significativas entre ellos ($\alpha = 0.05$). Promedio de 3 repeticiones.

TA (días)	FM		BM	
	FT ($\mu\text{g/g PC}$)	AF ($\mu\text{g/g PC}$)	FT ($\mu\text{g/g PC}$)	FB ($\mu\text{g/g PC}$)
0	11.930 \pm 0.265a	6.555 \pm 0.324a	15.241 \pm 0.158a	9.708 \pm 0.286a
30	21.060 \pm 0.228b	11.787 \pm 0.269b	26.760 \pm 0.202b	15.463 \pm 0.517b
60	28.303 \pm 0.219c	19.359 \pm 0.375c	39.473 \pm 0.170c	24.169 \pm 0.359c
90	38.380 \pm 0.252d	24.813 \pm 0.415d	10.106 \pm 0.189d	3.507 \pm 0.168d

La cuantificación de lignina se realizó en ambas variedades para las muestras control y la muestra de 90 días de endurecimiento, los resultados se presentan en el cuadro 6.

Cuadro 6. Porcentaje de lignina en pared celular para FM y BM en muestras control y con 90 días de almacenamiento. Valores con letras diferentes en una misma columna presentan diferencias significativas entre ellos ($\alpha = 0.05$). Promedio de 3 repeticiones.

TA (días)	Lignina (%)	
	FM	BM
0	0.291 \pm 0.008a	0.169 \pm 0.009a
90	0.416 \pm 0.010b	0.709 \pm 0.009b





Bibliografía.

- Barceló, R., “Lignification in Plant Cells Walls”, International review cytology, Vol 176, pag 87 – 132, 1997.
- Bernal-Lugo, I., “Eventos Moleculares Asociados al Endurecimiento del Frijol”, en Bioquímica Vegetal, Vázquez, J. (ed), UNAM, Facultad de Química, Primera edición, México, D.F., pag 129 – 139, 1994.
- Bunzel M., Ralph, J., Steinhart, H., “Phenolic Compounds as Cross-Links of Plant Derived Polysaccharides”, Proc. Chemical Reaction in Food, 29, 9 – 1, 2004.
- Chang, Y., “Enzymatic Browning in Relation to Phenolic Compounds and Polyphenoloxidase Activity Among Various Peach Cultivars”, J. Agric. Food Chem., Vol 38, 99 – 101, 1990.
- Drapron, R, “Enzyme activity as a function of water activity, En eds. D Simator, JL Mutton, properties of water in foods. Martinus Nijhoff, The hague, Suzuki T, Honda Y Mukasa Y, Kim SJ The Netherlands, 171-190, 1985
- Esquivel, C., López, L., Márquez, J., Mateos, G., Bernal-Lugo, I., “Chemical Composition and Structure of Two Mexican Bean (*Phaseolus vulgaris L.*) Cultivars in Relation to Cooking Time”, PHYTON, 143-153, 1992.





- Garcia, E., Filisetti T., Udaeta J., Lajolo F., “Hard-to-Cook Beans (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of Phenolics Compounds and Pectates”, J. Agric. Food Chem., Vol 46, 2110–2116, 1998.
- Gutiérrez, A., M., Ortiz G. C., Mendoza C. A., “Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal”, Simposio de Metrología, SM2008-M220-1108. 1-5, 2008.
- Hendry, G., “Oxygen, Free Radical Processes and Seed Longevity”, Seed Science Research, 3: 141 – 153, 1993.
- Lam, T.B.T., Iiyama, K., Stone, B., “Caffeic Acid: O-Metiltransferases and the Byosynthesis of Ferulic Acid in Primay Cells Walls of Wheat Seedlings”, Phytochemistry, 41, 1507 – 1510, 1996.
- Liu, K., “Cellular, Biological and Physicochemical Basis for the Hard to Cook Defect in Legume Seeds”, Critical Reviews of Food science and Nutrition, 35, 263 – 298, 1995.
- Lopez M., “Toxicidad volátil de monoterpenoides y mecanismos bioquímicos en insectos plaga del arroz almacenado”, Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, España, Murcia, 2008.
- Méndez, R.F., “Influencia del remojo en las pectinas de la lamina media del cotiledón de los frijoles deteriorados”, Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., 2003.





- Machado, C. M., Ferruzi M. G. Nielsen S.S., “Impact of the Hard-to-Cook phenomenon on phenolic antioxidants dry beans (*Phaseolus vulgaris*)”, J. Agric. Food Chem., Vol 56, 3102 – 3110, 2008.
- Quezada, M.Y., “Relación entre el endurecimiento 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., 2005.
- SAGARPA, “Servicio de información agroalimentaria y pesquera” [En línea. Disponible en <http://www.frijol.gob.mx/index.php?portal=frijol>; accesado el 25 de mayo de 2010].
- Sánchez M, Peiía MJ, Revilla G, Zarra I “Changes in Dehydrodiferulic Acids and Peroxidase Activity against Ferulic Acid Associated with Cell Walls during Growth of *Pinus pinaster* Hypocotyl” Plant Physiology. 111: 941-946, 1996.
- Suzuki T, Honda Y, Mukasa Y, Kim SJ., “Characterization of peroxidase in buckwheat seed” Phytochemistry 67, 219–224. 2006.
- Varriano-Marston E., Jackson, T. “Hard to Cook Phenomenon in Beans: Structural Changes During Storage and Imbibition”, Journal of Food Science, 46, 1379 – 1385, 1981.
- Vertucci C.W., Leopold A.C., “Physiological activities associated with hydration levels in seeds”, En AC Leopold Ed. Membranes, metabolism and dry organisms. Cornell University Press, Ithaca NY PP3 5-49, 1986.





- Voysest, V. O., “Mejoramiento Genético del Frijol (*Phaseolus vulgaris*): Legado de variedades de América Latina”, Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia, 2000, 1-6, 9-12.
- Wettlaufer SH, Leopold AC., “Relevance of Amadori and Maillard reactions to seed deterioration” *Plant Physiology* 97, 165-169.
- Zhang, M. Nagata S, Miyazawa K, Kikuchi H, and Esashi Y, “A Competitive Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay to Quantify Acetaldehyde-protein Adducts That Accumulate in Dry Seeds During Aging”, *Plant Physiol*, 113, 397 – 402, 1997.

