



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM  
POSGRADO 

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**“IDENTIFICACIÓN DE FACTORES  
BIOQUÍMICOS QUE PARTICIPEN EN EL  
INCREMENTO Y LA PÉRDIDA DE LA  
CALIDAD CULINARIA DEL FRIJOL (*Phaseolus  
vulgaris L.*)”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**P R E S E N T A:**

**M. en C. ENRIQUE MARTÍNEZ-MANRIQUE**

TUTORA: Dra. IRMA OFELIA BERNAL LUGO



MÉXICO, D. F.

MAYO/2012



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.



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
 EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PMDCB/520/2011

M. en C. ENRIQUE MARTÍNEZ MANRIQUE  
 Alumno del Doctorado en Ciencias Bioquímicas  
 P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 13 de Junio del presente, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS), con la réplica de la tesis "Identificación de factores bioquímicos que participen en el incremento y la pérdida de la calidad culinaria del frijol (*Phaseolus vulgaris* L)", dirigida por la Dra. Irma Bernal Lugo.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dra. Gladys Cassab López
VOCAL	Dr. Ernesto Moreno Martínez
SECRETARIO	Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
SUPLENTE	Dra. Sobeida Sánchez Nieto
SUPLENTE	Dr. Arturo Navarro Ocaña

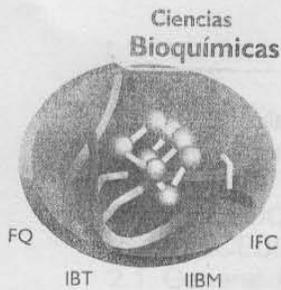
Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e  
 "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
 Cd. Universitaria, D.F., a 16 de Junio de 2011.  
 EL COORDINADOR DE ENTIDAD

  
 DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

C.c.p. Archivo

RRS\*1gg



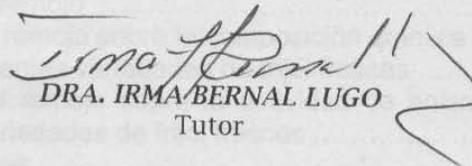
## PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**A LOS MIEMBROS DE  
JURADO DE EXAMEN**

Por medio del presente manifiesto que he revisado el texto que será sometido a su consideración del (a) alumno (a) de Doctorado en Ciencias Bioquímicas M. en C. ENRIQUE MARTINEZ MANRIQUE titulado:

**"Identificación de factores bioquímicos que participen en el incremento y la pérdida de la calidad culinaria del frijol (*Phaseolus vulgaris* L)"**

ATENTAMENTE

  
DRA. IRMA BERNAL LUGO  
Tutor

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección de la Dra. Irma Ofelia Bernal-Lugo en el laboratorio 104 del Conjunto "E", en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Gladys Cassab López	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Alberto Tecante Coronel	Facultad de Química, UNAM
Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce el apoyo en la realización de esta tesis de Víctor Hugo Blancas, Roberto Méndez, Leticia Pacheco, Valeria Martínez, Marcela Ríos.

Se reconoce el apoyo técnico brindado por la M. en C. Laurel Fabila Ibarra durante la realización del trabajo de tesis

Se reconoce el apoyo de Leticia García como secretaria del Posgrado en Ciencias Bioquímicas en la logística académico-administrativa durante la realización de esta tesis.

El proyecto fue apoyado por DGAPA-UNAM (No. 208998) y PAEP-UNAM (No. 202348). Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis y un complemento de beca otorgado por la DGAPA.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día      de mayo de 2012

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Gladys Cassab López	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dr. Ernesto Moreno Martínez	FES-Cuautitlán, UNAM
Secretario	Francisco Javier Plasencia de la Parra	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dra. Sobeida Sánchez Nieto	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Arturo Navarro Ocaña	Facultad de Química, UNAM

# ÍNDICE

Índice de tablas .....	III
Índice de figuras .....	IV
Abreviaturas .....	V
RESUMEN .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	3
2. ANTECEDENTES .....	6
2.1. Generalidades del frijol .....	6
2.1.1. Estructura de la semilla de frijol .....	6
2.1.2. Producción del frijol .....	8
2.1.3. Almacenamiento del frijol .....	10
2.1.4. Composición Química del Grano .....	11
2.2. Procesamiento del frijol. ....	12
2.2.1. Proceso de remojo. ....	13
2.2.2. Proceso de cocción. ....	14
2.3. Calidad culinaria del frijol .....	14
2.4. Eventos bioquímicos y estructurales que conducen al endurecimiento de la semilla de frijol .....	15
2.4.1. Composición de pared celular y estructura de sus polisacáridos .....	18
2.4.2. Modelos que tratan de explicar el mecanismo del endurecimiento de la semilla de frijol y que involucran la pared celular....	22
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	28
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
4.1. Material Biológico .....	30
4.2. Determinación del Tiempo de Cocción .....	30
4.3. Determinación de la influencia de la testa y el cotiledón sobre el tiempo de cocción. ....	31
4.4. Endurecimiento de las semillas .....	32
4.5. Obtención de los cotiledones .....	33
4.6. Calorimetría Diferencial de Barrido .....	33
4.7. Extracción de Pectina .....	34
4.8. Cromatografía de filtración en gel .....	34
4.9. Composición de Azúcares.....	35
4.10. Extracción de Enzimas de pared celular .....	35
4.11. Actividad de las enzimas .....	36
4.11.1. Cuantificación de proteínas .....	36
4.12. Análisis estadístico .....	37
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
5.1. Mecanismo del efecto benéfico del remojo de la semilla en el tiempo de cocción .....	38
5.1.1. Introducción .....	38
5.1.2. Caracterización del material biológico .....	39
5.1.3. Identificación de los componentes de la semilla responsables del efecto benéfico del remojo .....	41

5.1.4. Efecto del remojo sobre la composición química de la fracción de pectinas de las diferentes variedades de frijol frescas .....	43
5.1.5. Efecto del remojo sobre la actividad de enzimas de pared celular de diferentes variedades de frijol frescos .....	50
5.1.6. Conclusiones .....	53
5.2. Identificación de los dominios pecticos que contribuyen a la mayor rigidez de la pared celular del frijol endurecido y las causas que modifican su interacción. ....	54
5.2.1. Introducción .....	54
5.2.2. Endurecimiento del frijol por almacenamiento de las semillas en condiciones inadecuadas .....	55
5.2.3. Identificación de la región de la semilla de frijol que contribuye en mayor proporción al endurecimiento .....	57
5.2.4. Efecto del endurecimiento del frijol en el peso molecular promedio de pectinas .....	58
5.2.5. Actividad de diversas pectinasas en semillas de frijol endurecido .....	60
5.2.6. Efecto del endurecimiento sobre la composición química de la fracción de pectinas de diferentes variedades de frijol remojadas. ...	61
5.2.7. Discusión .....	65
5.2.8. Conclusiones .....	68
5.2.9. Perspectivas .....	69
6. REFERENCIAS.....	70
7. ANEXOS .....	77
ANEXO 1. ....	77
ANEXO 2 .....	78
Artículo Publicado .....	78

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Clasificación de variedades de frijol por su preferencia de consumo	9
TABLA 2. Composición química de algunas variedades comerciales de frijol	11
TABLA 3. Efecto del remojo en el tiempo de cocción de diferentes variedades de frijol .....	40
TABLA 4. Entalpía del proceso térmico de diferentes variedades de frijol ...	43
TABLA 5. Cantidad de ácido galacturónico (AGal) como homogalacturonano (HG) en pectina de frijol .....	48
TABLA 6. Efecto del remojo sobre la actividad de poligalacturonasa y pectin-metil-esterasa de pared celular de las diferentes variedades de frijol frescas .....	51
TABLA 7. Efecto del remojo sobre la actividad de ramnogalacturonasa y galactanasa de pared celular de los diferentes genotipos de frijol .....	52
TABLA 8. Efecto del almacenamiento inadecuado en el TC <sub>50</sub> de diversos genotipos de frijol .....	56
TABLA 9. Influencia del cotiledón y la testa en los tiempos de cocción de diferentes variedades de frijol control y deteriorado .....	57
TABLA 10. Actividad de ramnogalacturonasa y galactanasa de pared celular aislada de frijol control y endurecido remojados .....	60
TABLA 11. Efecto del almacenamiento en la actividad de pectinasas en la variedad Flor de Mayo .....	61
TABLA 12. Cantidad de ácido galacturónico (AGal) como homogalacturonano (HG) en pectina de frijol.....	64
Tabla 13. Composición de azúcares de la fracción de pectinas extraídas de frijoles frescos secos y remojados .....	77
Tabla 14. Composición química de pectina aislada de frijoles remojados control y endurecidos. ....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la semilla de frijol .....	7
Figura 2. Producción Nacional de Frijol .....	10
Figura 3. Esquema de la pared celular vegetal .....	19
Figura 4. Estructura esquemática de la pectina .....	21
Figura 5. Ramnogalacturonano I .....	22
Figura 6. Equipo Mattson .....	31
Figura 7. Cámara de deterioro .....	32
Figura 8 Endotermas de cotiledones de frijoles secos y remojados .....	42
Figura 9. Composición de azúcares de la fracción de pectinas extraídas de frijoles frescos secos y remojados .....	44
Figura 10. Perfil de peso molecular de pectinas soluble en CDTA de frijoles secos y remojados .....	47
Figura 11. Perfil de peso molecular de pectinas soluble en CDTA de frijoles endurecidos y controles. ....	59
Figura 12. Composición química de pectina aislada de frijoles remojados control y endurecidos .....	62

## ABREVIATURAS

(AGal)	Ácido galcturónico
(Au)	Ácido urónico
(ARA)	Arabinosa
(BM)	Bayo Mecentral
(CDF)	Calorimetría Diferencial de Barrido
(NaCl)	Cloruro de sodio
(HPLC)	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
(HTC)	Endurecimiento a la cocción (Hard-To-Cook)
(FM)	Flor de Mayo
(GAL)	Galactosa
(GaXs)	Glucouronarabinosilanos
(GLU)	Glucosa
(NaOH)	Hidróxido de sodio
(HG)	Homogalacturonano
(HR)	Humedad Relativa
(ND)	No detectado
(PME)	Pectinmetilesterasa
(PG)	Poligalacturonasa
(RGI)	Ramnogalacturonano I
(RAM)	Ramnosa
(RIA)	Residuo Insoluble en Alcohol
(T)	Temperatura
(TC)	Tiempo de cocción
(TC <sub>50</sub> )	Tiempo de cocción medio
(CDTA)	Trans-1,2-diaminociclo-hexano N,N',N'-tetra-ácido acético
(XiGs)	Xiloglucanos
(XIL)	Xilosa

## RESUMEN

El tiempo de cocción del frijol disminuye, respecto al del grano seco, cuando los granos se remojan antes de la cocción y se incrementa cuando las semillas se endurecen. El tratamiento de remojo previo a la cocción, induce la germinación de las semillas y a nivel bioquímico este proceso involucra la modificación enzimática de los polisacáridos de la pared celular con lo cual la pared celular pierde rigidez y la lamela media disminuye su adhesividad para permitir que el eje embrionario crezca. Lo anterior permite plantear la hipótesis de que la mejoría en la calidad culinaria alcanzada por el remojo de la semilla, previo a la cocción, podría ser similar al involucrado en el crecimiento de los ejes embrionarios durante la germinación y que en semillas endurecidas este mecanismo se encuentra dañado. Para probar la hipótesis anterior se identificaron las modificaciones enzimáticas inducidas por el remojo y por el endurecimiento en la arquitectura de las pectinas presentes en las semillas de frijol. Los resultados indican que el remojo de la semilla previo a la cocción incrementó la solubilidad de los galactanos y del homogalacturónico y disminuyó el peso molecular del ramnogalacturonano I. Estos cambios fueron producto de la actividad latente de diversas enzimas remodeladoras de pectinas tales como: ramnogalacturonasa, galactanasa y poligalacturonasa. Además, la actividad de estas enzimas disminuyó de manera importante durante el endurecimiento del frijol, impidiendo las modificaciones enzimáticas de las pectinas que propiciaron la disminución en el tiempo de cocción. De lo anterior se concluye que las enzimas remodeladoras de pectinas son algunos de los factores genéticos que determinan los bajos tiempos de

cocción del frijol. Y sugieren que el frijol será menos susceptible a endurecerse si estas hidrolasas no pierden actividad durante el proceso de endurecimiento.

## 1. INTRODUCCIÓN

La calidad de un alimento está relacionada con las características que desea satisfacer el consumidor final (Kigel, 1999). Por lo que sería deseable que los alimentos de origen vegetal contaran con estas propiedades desde que son cosechados y que se mantuvieran aun después de un período largo de almacenamiento. Para lo cual, el agricultor debería contar con germoplasma capaz de producir los diversos órganos y semillas utilizadas como alimento con la calidad deseada por el consumidor.

En la actualidad se ha hecho un gran trabajo para producir genotipos mejorados genéticamente que llenen las características importantes para los productores agrícolas: productividad, resistencia a plagas, a sequía, a deficiencia nutricional etc. (Jacinto-Hernández *et al.*, 2002 y 2003). Recientemente y debido a los avances en las técnicas modernas de biología molecular y bioquímica, se han iniciado algunos estudios sobre los factores genéticos y bioquímicos que determinan la calidad de los alimentos vegetales exigido por el consumidor. Una vez que se conozcan los factores genéticos que la determinan así como su interacción, se estará en la posibilidad de desarrollar programas de fitomejoramiento en los que se parta de genotipos elite y se seleccione para las características de calidad que le interesan al consumidor.

En el caso de alimentos que requieren de un tratamiento térmico para ser consumidos, el tiempo necesario para su suavización es el parámetro de calidad más importante para el consumidor y un ejemplo de este tipo de alimentos es la semilla de frijol (Jacinto-Hernández *et al.*, 2002). Si el tiempo de cocción requerido

para suavizar el frijol sin remojo es tomado como base de la calidad del grano, esta calidad se modifica de manera negativa por condiciones de almacenamiento inadecuadas ( $HR > 65\%$  y  $T > 25^{\circ}\text{C}$ ) que provocan un aumento considerable en el tiempo de cocción del grano, defecto conocido como endurecimiento (Liu, 1995; Reyes-Moreno y Paredes-López, 1993). Esta calidad también se puede modificar de manera positiva por el remojo de la semilla previo a la cocción. Utilizando estos factores externos que modifican la calidad culinaria del frijol se puede lograr la identificación de factores bioquímicos y genéticos que participen en la calidad culinaria del frijol y así definir marcadores genéticos que permitan la generación de genotipos con mejor calidad culinaria.

Por otra parte, se sabe que la pared celular juega un papel clave en determinar la calidad de alimentos de origen vegetal y en especial los que requieren de un tratamiento térmico para su consumo, como el frijol (Stanley y Aguilera, 1985; Jackman y Stanley, 1995). Los trabajos publicados hasta el 2002 explicaron el endurecimiento de frijol con base en la interacción del homogalacturonano, presente en la lámina media, con otros componentes de la pared celular. Por ejemplo, se postuló que durante el almacenamiento inadecuado, la pectin-metil-esterasa hidrolizaba al grupo metilo que decoraba a algunos residuos de homogalacturonano dejando libre el carboxilo del ácido galactourónico. El cual a su vez interaccionaba con iones calcio, provenientes del citoplasma, disminuyendo así la solubilidad de la pectina (Mafuleka *et al.*, 1993). Estudios recientes, sobre la remodelación de la pared celular durante la elongación celular han demostrado que el ramnogalacturonano I (RGI) y las cadenas laterales de arabinano y galactano que decoran a la ramnosa tienen gran importancia en la funcionalidad

de la pared celular, especialmente en las propiedades mecánicas y térmicas de vegetales que requieren de cocción para ser comestibles (Ulvskov *et al.*, 2005). Estos nuevos conceptos resultaron en la modificación del modelo que se tenía de las pectinas y con esto del de pared celular (Geshi *et al.*, 2000; Willats *et al.*, 2001; Vincken *et al.*, 2003; Ulvskov *et al.*, 2005) y por tanto nos han llevado a considerar su importancia en la calidad del frijol. Por otra parte, el hecho de que la calidad culinaria mejore con el remojo, lleva a proponer la participación de enzimas para modificar la arquitectura de los polisacáridos que forman la lamela media y la pared celular primaria del cotiledón del frijol para facilitar su solubilización y el ablandamiento del grano. El hecho de que enzimas de pared celular estén posiblemente involucradas en este fenómeno de ablandamiento, podría ayudar a contar con herramientas moleculares que faciliten una eficiente selección agronómica de cultivares con alta calidad.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue definir los factores genéticos y bioquímicos que modifican el tiempo de cocción del frijol.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Generalidades del frijol

El frijol es una leguminosa originaria de América y fue uno de los primeros granos que se cultivaron. Es un alimento tradicional, por lo que se considera un elemento de identificación cultural junto con el maíz y el chile, los cuales son parte de la dieta alimenticia del mexicano y es consumido tanto en medios rurales como urbanos, sin importar la clase social (Arias, 2007). En los países en desarrollo como el nuestro, hay una deficiencia alimentaria, sobre todo una carencia de proteínas en la dieta. Por esta razón, el frijol es una excelente opción para mejorar esta condición, por su bajo costo y alto contenido de proteína (Pérez-Herrera *et al.*, 2002).

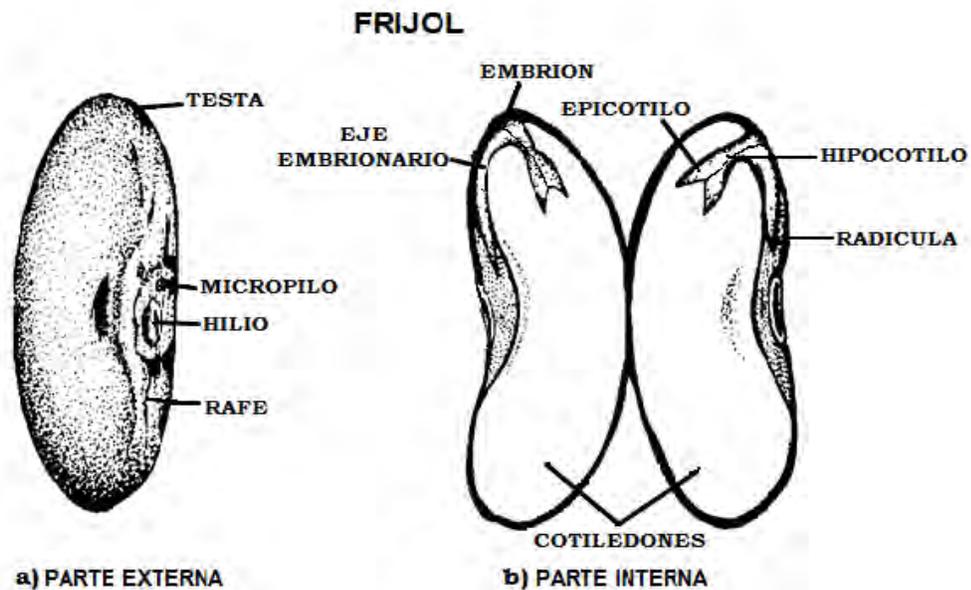
El nombre científico del frijol es *Phaseolus vulgaris L.* y pertenece a la familia de las leguminosas. La planta del frijol tiene la capacidad de crecer en climas fríos y cálidos. Hay variedades trepadoras o enanas, siendo más comunes las primeras, que alcanzan una altura de 50 a 70 centímetros (SAGARPA, 2009). El rango de temperatura óptima es de 15-27 °C. Con respecto al agua que necesita el cultivo, se requiere de 400 a 500 mm de precipitación promedio anual. Requiere suelos con pH entre 5.5 y 6.5 (Arias, 2007).

#### 2.1.1. Estructura de la semilla de frijol

La semilla madura del frijol consta de dos partes principales: la testa (parte externa) y el embrión (parte interna).

Parte externa (figura 1a):

1. Testa o cubierta: corresponde a la capa secundaria del óvulo. Generalmente es dura y está formada por una capa interna y una externa de cutícula y una o más capas de tejido grueso que sirve de protección. En esta estructura se distinguen algunas sub-estructuras:
  - a) Hilio: corresponde a la cicatriz dejada por el funículo; esta región conecta la semilla con la placenta y marca el punto donde la semilla se separa.
  - b) Micrópilo: corresponde a una abertura natural localizada cerca del hilio; permite la absorción de agua para el proceso de germinación.
  - c) Rafe: corresponde a un lóbulo que proviene de la soldadura del funículo con los tegumentos externos del óvulo.



**Figura 1. Estructura de la semilla de frijol**  
Fuente: (FAO, s.f.)

Parte interna (figura 1b):

2. Embrión: El embrión está constituido por dos cotiledones y el eje embrionario.

a) Cotiledón: se encuentran bajo la testa, forman la parte voluminosa de la semilla, son hojas modificadas para el almacenamiento de carbohidratos y proteínas y constituyen la parte aprovechable de la semilla.

b) Eje embrionario tiene función reproductiva, siendo capaz de iniciar divisiones celulares y crecer. Es la parte vital de la semilla. Es un eje porque inicia el crecimiento en dos direcciones con el fin de originar la raíz y el tallo. El eje embrionario está formado por el hipocotilo, epicotilo y radícula.

### **2.1.2. Producción del frijol**

El frijol es la leguminosa más cultivada a nivel nacional. El 87% de la superficie destinada a ese cultivo se ubica en áreas de temporal y es importante señalar que el 68% de su producción se destina a consumo por parte del productor, es decir, no se comercializa. El 65% de la producción nacional se concentra en seis entidades de la República: Zacatecas, San Luis Potosí, Sinaloa, Durango, Nayarit, Guanajuato y Chihuahua; la primera entidad aporta la mayor parte de la producción en el ciclo primavera-verano y Sinaloa, Nayarit, Veracruz y Chiapas, durante otoño-invierno.

En México se producen diferentes variedades de frijol, las cuales, corresponden a los diferentes hábitos de consumo existentes en nuestro país. La mayor parte de la producción nacional (alrededor del 70%) se localiza en el noroeste del país y las

principales variedades son azufradas y pintas. Por otra parte, una gran cantidad de frijol negro se cultiva en Nayarit y Zacatecas y su demanda se ubica en las zonas centro y sur de México. Las preferencias de consumo en el país, dan lugar a una clasificación del frijol (tabla 1).

**Tabla 1. Clasificación de variedades de frijol por su preferencia de consumo**

<b>Altamente Preferentes</b>	<b>Preferentes</b>	<b>No Preferentes</b>
Azufrado	Garbancillo	Alubia blanca
Mayocoba	Manzano	Bayo Blanco
Negro Jamapa	Negro San Luis	Negro Zacatecas
Peruano	Negro Querétaro	Ojo de Cabra
Flor de Mayo y Flor de Junio	Pinto	Bayo Berrendo

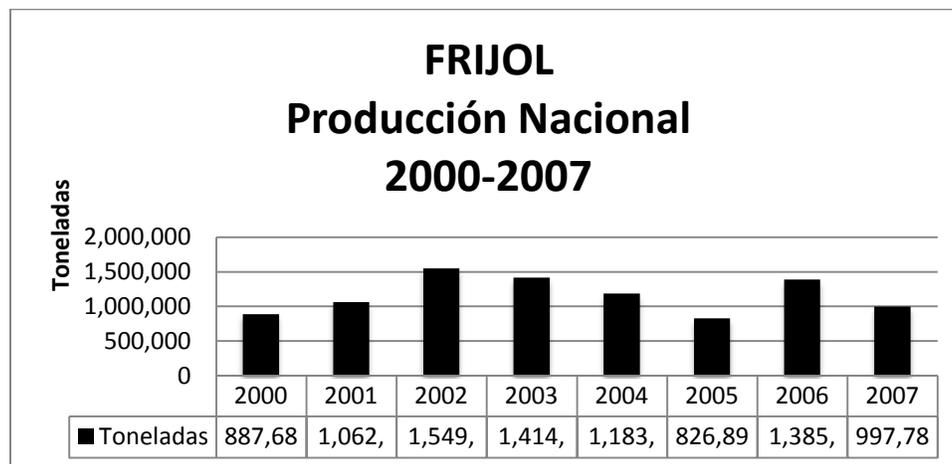
Fuente: ( SAGARPA, 2009)

La preferencia también se puede ordenar por clases:

- ✓ La primera, son los pequeños negros y opacos.
- ✓ La segunda, son los negros brillosos y grandes.
- ✓ La tercera, son los rosados donde se incluye el Flor de Mayo.
- ✓ Y otros de producción regional, los cuales son más comunes en rancherías y otros pequeños poblados, aquí se incluye el Bayo Mecentral (SAGARPA, 2009).

En los últimos años, han existido cambios significativos en la producción total de frijol en México. Como se puede observar en la figura 2, la producción ha venido disminuyendo, lo que ha provocado la necesidad de importar el grano y esto ha

generado problemas en el mercado nacional, ya que la demanda de frijol es aproximadamente de 1,200,000 toneladas anuales (SIAP, 2009).



**Figura 2. Producción Nacional de Frijol**  
Fuente: (SIAP, 2009)

Este problema se agrava por las pérdidas ocasionadas por un mal almacenamiento del frijol, que disminuye su calidad culinaria. Esto baja la disponibilidad del grano, aumenta su precio y genera problemas de alimentación.

### 2.1.3. Almacenamiento del frijol

Como no todo el grano de frijol que se produce cada año, se consume en corto tiempo y además, tiene que ser distribuido a los lugares de venta, este debe ser almacenado en condiciones adecuadas para mantener la calidad del grano por más tiempo, desde que se cosecha hasta que se comercializa.

Un buen almacenamiento debe controlar la humedad relativa (HR) y la temperatura, manteniendo estas dos condiciones a menos de 65% y 25°C respectivamente ([Colprocah, 2009](#); Fornos, 2009). Un almacenamiento adecuado preserva la viabilidad y el vigor de la semilla, además de las cualidades

nutrimentales y sensoriales del grano y posiblemente lo más importante, que no aumente su tiempo de cocción; para poder proporcionar al consumidor un grano aceptable (Bressani, 1989). Sin embargo, en nuestro país y en otros países tropicales no se cuentan con las instalaciones que mantengan la calidad inicial de la semilla de frijol. Por lo que el frijol que ha sido sometido a periodos de almacenamiento en condiciones adversas, sufre pérdidas en viabilidad y vigor de la semilla y desde el punto de vista de su uso como alimento el frijol almacenado presenta un aumento en el tiempo de cocción, es decir, el frijol se endurece (Shiga *et al.*, 2004). El frijol que sufre de este defecto puede tener pérdidas, sobre todo de aminoácidos, que pueden afectar la calidad nutricional del grano, además de afectar la textura, reduciendo así la aceptación de los consumidores (Shiga *et al.*, 2004).

#### 2.1.4. Composición Química del Grano

El frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) es un alimento bajo en grasa y rico en proteínas, carbohidratos, fibra predominantemente soluble y minerales (Osorio *et al.*, 2003). Existen pequeñas diferencias en su composición, dependiendo de la variedad (tabla 2).

**Tabla 2. Composición química de algunas variedades comerciales de frijol**

Componentes	VARIEDAD			
	Frijol Flor de mayo	Frijol Bayo	Frijol Negro Jamapa	Frijol Mayocoba
Proteína	22.16	26.16	24.20	23.41
Carbohidratos	66.97	59.28	61.26	63.11
Humedad	2.31	6.26	6.86	9.65
Grasa	0.73	1.03	1.26	1.98
Cenizas	3.82	3.20	3.63	3.67

Fuente: Vargas-Torres *et al.*, 2006

Por otra parte, la semilla de frijol, también presenta ciertas sustancias que se consideran como antinutrimientales y otras que son tóxicas. Entre los factores antinutrimientales se encuentran los inhibidores de enzimas proteolíticas, como los inhibidores de  $\alpha$ -amilasa y tripsina; también están los factores de flatulencia, los taninos y el ácido fitico; y los compuestos tóxicos como hemaglutininas y saponinas, pero esa toxicidad sólo se presenta cuando están crudos ya que la cocción elimina por completo las hemaglutininas (Bonilla *et al.*, 1991; Valle y Lucas, 2000).

Es importante señalar que, para la población de más bajos recursos, el frijol es su principal fuente de proteínas, ya que son de bajo costo en comparación con las proteínas de origen animal. Además de ser una fuente importante de proteína, son una fuente de hierro, potasio, magnesio, zinc, fibra, almidón y tiamina, lo que le permite ser un alimento de buena calidad nutricional (Mederos, 2006).

Por otra parte, se ha reportado que al complementar algunos cereales con el frijol aportan prácticamente la totalidad de los aminoácidos esenciales necesarios, mejorando la calidad proteica de las dietas (Pérez-Herrera *et al.*, 2002). Por tal razón, el frijol se complementa con los cereales como el maíz, que es el principal grano que se consume en México, y mejora la calidad nutricional, sobre todo de la población más pobre.

## **2.2. Procesamiento del frijol.**

Las semillas crudas de frijol presentan una excesiva dureza lo que las hace difíciles de masticar, además presentan mal sabor, factores antinutrimientales y tóxicos; por lo tanto, para su consumo, el frijol es remojado toda la noche y

después cocido. El remojo antes de cocerlo es una práctica común que suaviza los granos de la mayoría de las variedades y por lo tanto reduce el tiempo de cocción. Normalmente, el tiempo requerido para suavizar el frijol fresco es tomado como base de la calidad del grano (Jacinto-Hernández *et al.*, 2002). Por lo tanto, el procesamiento requerido para el consumo del frijol involucra dos etapas: el remojo de la semilla y el tratamiento térmico para la cocción, los principales eventos que se producen en cada etapa se explican a continuación:

### **2.2.1. Proceso de remojo.**

El remojo de la semilla suele ser usado para hidratarla previo a la cocción, 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. En algunas regiones de México, las semillas de frijol son remojadas toda la noche en agua fría. Durante la imbibición, la semilla absorbe agua a través del hilio y 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 polisacáridos de la pared celular, de los carbohidratos y de las proteínas presentes en el citoplasma, solubilización de compuestos hidrosolubles de la pared celular y por consiguiente cambios en la dureza de la semilla (Sefa-Dedeh y Stanley, 1979; Blancas, 2001). A la fecha, se desconocen los cambios bioquímicos que ocurren en la semilla durante el remojo y que podrían ser los responsables de que el tiempo de cocción del frijol remojado previo a su cocción sea menor al que presenta la semilla sin remojo. En esta tesis se presentan los experimentos realizados con la finalidad de identificar estos cambios bioquímicos.

### **2.2.2. Proceso de cocción.**

El tratamiento térmico, disminuye la dureza de la semilla, mejora el sabor, e inactiva enzimas y factores tóxicos intrínsecos de la semilla; así como un aumento significativo en la digestibilidad de las proteínas de la semilla y adquisición de caracteres sensoriales agradables. Las semillas pueden ser cocinadas en agua a ebullición o a vapor; siendo más común hervirlas a fuego lento, hasta obtener semillas con una suavidad y sabor agradables.

Durante la cocción en agua hirviendo, el calor aplicado induce en la semilla de frijol los cambios físico-químicos que conducen a su ablandamiento, dichos cambios son: gelatinización de los gránulos de almidón, esto se realiza paulatinamente conforme se incrementa la temperatura, hasta llegar aproximadamente a los 65 °C; desnaturalización de las proteínas; remoción parcial de los polifenoles, y la fractura y termosolubilización de la lámina media, todo esto conduce a daños mecánicos, como el estallido celular, y finalmente, a la pérdida de la rigidez o dureza (Ng y Waldron, 1997; Bernal-Lugo *et al.*, 1997; Waldron *et al.*, 1997). En resumen, el proceso de cocción está relacionado a cambios en la microestructura del grano que se generan inicialmente por la presencia de agua durante el periodo de remojo y posteriormente por el efecto del calor aplicado durante la etapa de cocción (Sefa-Dedeh *et al.*, 1978).

### **2.3. Calidad culinaria del frijol**

La calidad de un alimento está relacionada con las características que desea satisfacer el consumidor final. En el caso del frijol las características que el consumidor busca en la semilla son: la apariencia (Kigel; 1999) la textura y el

sabor que alcanzan después de cocinarse (Bernal-Lugo *et al.*, 1997). En México, el consumidor desea además, un frijol que produzca un caldo con buena apariencia, sabor y textura y sobre todo que la semilla presente un bajo tiempo de cocción. Este último parámetro de calidad es el que determina sus preferencias de compra (Jacinto-Hernández *et al.*, 2002).

De acuerdo a los fitomejoradores el tiempo de cocción del frijol depende del genotipo y de los factores ambientales durante el cultivo y de las condiciones en que la semilla se almacene. Como antes se menciona, las condiciones adversas de almacenamiento, en países tropicales, provocan un aumento considerable en el tiempo de cocción del grano, defecto conocido como endurecimiento. Cuando el frijol se endurece se dice que la calidad culinaria del frijol disminuyó ya que una de las características que desea satisfacer el consumidor se ha perdido. Debido a que el endurecimiento que presenta la semilla de frijol por almacenamiento en condiciones adversas es común a otras leguminosas, este fenómeno ha sido estudiado considerando cada uno de los componentes celulares que participan en la suavización térmica de la semilla.

#### **2.4. Eventos bioquímicos y estructurales que conducen al endurecimiento de la semilla de frijol**

Los estudios realizados con el propósito de elucidar el mecanismo del endurecimiento de la semilla de frijol se pueden conjuntar en dos grupos, uno que involucra los componentes citoplasmáticos como el almidón y las proteínas y el segundo que involucra la pared celular en especial la **lámina media**.

En el primer grupo, se incluye la hidratación y gelatinización del almidón y la desnaturalización de las proteínas, sin embargo, la evidencia existente es controversial. Durante el proceso de cocción la gelatinización del almidón y la desnaturalización de las proteínas marcan el inicio de los cambios dentro de las células (Vindiola *et al.*, 1986), por lo que son dos componentes importantes en este proceso. Pero en almidón aislado se ha observado, mediante pruebas de “Calorimetría Diferencial de Barrido” (CDB), que la temperatura de gelatinización y desnaturalización no cambian significativamente entre frijol fresco y endurecido (Garcia y Lajolo, 1992). Además, después de someter los dos tipos de frijol a un tiempo de cocción igual y obtener la harina de los frijoles cocidos, se determinó la isoterma y se encontró que ésta es lineal, lo que indica que el almidón y la proteína se gelatinizó y desnaturalizó respectivamente durante la cocción, en ambos tipos de frijoles (Vindiola *et al.*, 1986). Por otra parte, en el grupo de trabajo, se analizaron dos variedades de frijol fresco, que tienen diferente tiempo de cocción, por CDB y se observó que en ambos tipos de frijol las temperaturas de gelatinización y desnaturalización fueron similares, lo que nos lleva a suponer que la influencia del almidón y las proteínas en la velocidad de cocción del frijol fresco es mínimo (López, 1994). También Holberg y Stanley (1987) encontraron que la temperatura de gelatinización del almidón, en frijol endurecido por almacenamiento a altas temperatura y humedad relativa, no cambió con respecto a otros almacenados a temperatura y humedad relativa bajas (controles). La evidencia anterior, sugiere que el almidón y las proteínas citoplásmicas no participan en el proceso de endurecimiento. Por otra parte, existen otros trabajos realizados con garbanzos, frescos y endurecidos por almacenamiento prolongado

a altas temperatura y humedad, en los que se menciona que, la estabilidad térmica de las proteínas intracelulares son importantes en el defecto de endurecimiento a la cocción (HTC por sus siglas en ingles), pues al aumentar la temperatura, durante la cocción, se coagulan y limitan la absorción de agua del almidón, provocando que no se hinche completamente y no se gelatinice durante la cocción (Liu *et al.*, 1992 y 1993a). Resultados similares se encontraron, al comparar frijol fresco y endurecido a altas temperatura y humedad, en la que se ve que la temperatura de transición de las proteínas intracelulares baja, en el frijol endurecido, y es menor a la de gelatinización del almidón, por lo que se supone que, la proteína se coagula y evita el transporte de agua y una incompleta gelatinización del almidón, lo cual provoca, al menos parcialmente, el endurecimiento (García-Vela y Stanley, 1989). Estas diferencias en resultados podría deberse a las condiciones de almacenamiento en que los frijoles se endurecieron. En frijoles endurecidos a 75% HR y 40°C por dos meses, la estabilidad térmica de las proteínas no se modifica (García and Lajolo, 1994). Mientras que las semillas endurecidas en condiciones de 80% HR y 30°C por 18 meses las proteínas son térmicamente inestables (García-Vela y Stanley, 1989).

El segundo grupo de estudios, que involucran la pared celular y en especial la **lámina media**, se pueden englobar en tres grandes modelos (Liu, 1995):

1. PECTINA-CATIÓN-FITATO
2. DEGRADACIÓN DE PECTINA POR  $\beta$ -ELIMINACIÓN
3. LIGNIFICACIÓN

Antes de explicar los tres modelos mencionados, los cuales se basan en cambios que sufre la pared celular, se explicará la composición y las principales estructuras que forman esta pared celular.

#### **2.4.1. Composición de pared celular y estructura de sus polisacáridos**

La pared celular es una estructura rígida que rodea las células vegetales proporciona la forma y soporte a la planta. Determina una gran cantidad de atributos de calidad y sus características de procesamiento (Carpita, 2000; Jackman and Stanley, 1995).

La pared celular está formada por tres capas: lámina media, pared primaria y en algunos casos, pero no en cotiledón de frijol, pared celular secundaria.

a) Lámina media o lamela media: primera capa que se deposita durante la división celular, está formada principalmente por polisacáridos pécticos. Tiene un papel primario en la adhesión intercelular (Carpita, 2000).

b) Pared primaria: Está compuesta por celulosa, hemicelulosa, proteínas y pectinas. Desde el punto de vista químico las paredes celulares primarias son normalmente suficientemente porosas para permitir el paso de agua y los solutos de peso molecular bajo del exterior de la célula hacia la membrana plasmática e interior celular (Carpita, 2000).

c) Pared secundaria: comienza a depositarse hacia el final del crecimiento de la célula y continúa cuando este ha cesado. Este tipo de pared celular no lo contienen los cotiledones de frijol.

En la estructura de la pared celular, se pueden distinguir los siguientes polisacáridos: **Celulosas, Hemicelulosas y Péctinas** (figura 3).

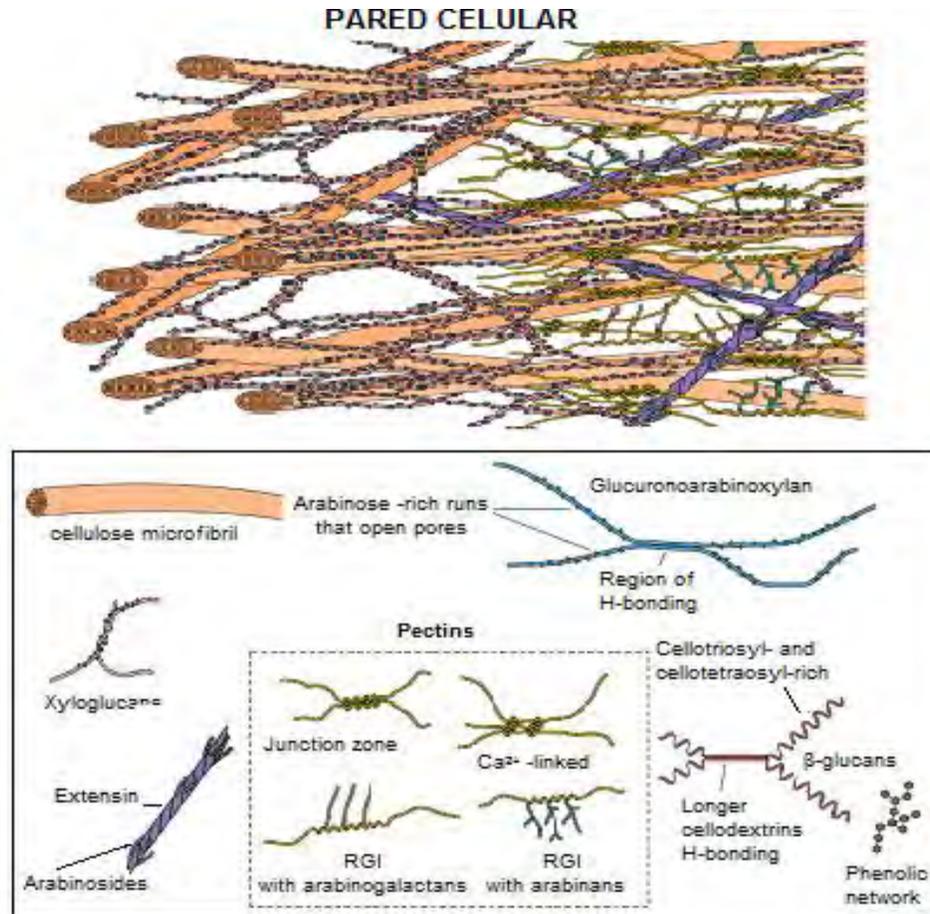


Figura 3. Esquema de la pared celular vegetal.  
Fuente: Carpita *et al.*, 2000

## 1. Celulosa.

Es altamente cristalina y consiste en un polímero no ramificado formado por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\beta(1\rightarrow4)$  y su función principal es asegurar la rigidez de la pared celular (Carpita, 2000).

## 2. Hemicelulosas.

- a) Los componentes mayoritarios de la hemicelulosa son xiloglucanos (XiGs) y glucuronarabinoxilanos (GAXs) (Carpita, 2000)
- b) Xilanos: Arabinoxilanos y a los Xiloglucanos
- c) Mananos: Glucomananas y glucouromananas.

d) Galactanos: galactomananos y Arabinogalactanos (Carpita, 2000)

La interacción entre hemicelulosas y celulosas tienen como finalidad hacer un balance entre resistencia y flexibilidad de las paredes celulares (Méndez, 2003).

## 2. Pectinas

Las pectinas son uno de los principales componentes de la pared celular. Químicamente, es un polisacárido compuesto de una cadena lineal de moléculas de ácido D-galacturónico, el cual, forma el esqueleto principal de la molécula y está muy hidratado. Se cree que las pectinas poseen muchas funciones, dentro de las que se destacan la determinación de la porosidad de las paredes y por tanto, el grado de disponibilidad de los sustratos de las enzimas, implicadas en las modificaciones de la pared celular (Soriano, 2004), también, la modulación del pH y balance iónico, la participación en la adhesión célula-célula y el reconocimiento de la presencia de ciertos patógenos.

Las pectinas son las más susceptibles a la degradación inducida por el calor, por lo que se ha propuesto que la termosensibilidad que presentan, está relacionada con la solubilización de la lámina media (Blancas, 2001). Durante el remojo y el almacenamiento inadecuado del frijol, las pectinas sufren modificaciones que alteran sus propiedades fisicoquímicas, principalmente su solubilización.

Las pectinas son polisacáridos de diferente tipo y los más abundantes en la Pared Celular son: homogalacturonano, ramnogalacturonano I, galactano, arabinogalactano y arabinano. La cadena principal puede contener regiones con muchas ramificaciones o cadenas laterales, denominadas “regiones rugosa”

ramnogalacturonano I (RGI) y regiones con pocas cadenas laterales llamadas “regiones lisas” homogalacturonano (HGA) (Figura 4).

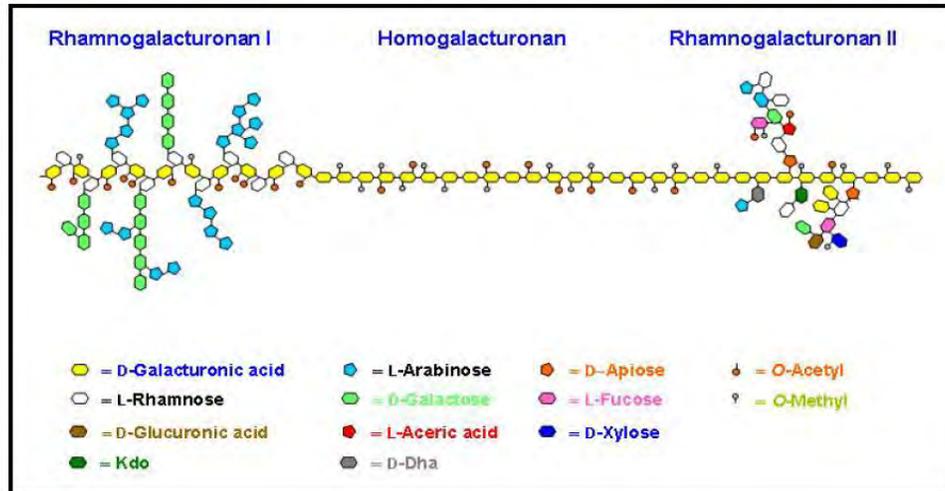


Figura 4. Estructura esquemática de la pectina.  
Fuente: (Soriano, 2004)

**La región lisa u homogalacturonano (HGA):** consiste en un esqueleto de residuos de ácido D-galacturónico unidos mediante enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$ , los cuales pueden estar acetilados en el C-2 o en el C-3, o metilados en el C-6 que son entre el 70 y 80% de residuos de ácido urónico. Los residuos del ácido urónico que no están metilados se asocian con calcio (Soriano, 2004).

**La región rugosa o ramnogalacturonano I (RGI):** El Ramnogalacturonano I (figura 5) es la molécula más representativa y abundante del grupo, siendo el componente principal de las dicotiledóneas y están constituidos por una estructura formada por la repetición del disacárido galacturonilramnosil, en el cual, alrededor del 50% de la ramnosa presenta ramificaciones de azúcares entre los que predominan galactosa y arabinosa, que forman galactanos, arabinanos o arabinogalactanos (Carpita and McCann, 2000). Se cree que estos polisacáridos,

especialmente el ramnogalacturonano I y la galactosa de sus cadenas laterales pueden tener una gran influencia en la pérdida de calidad culinaria del frijol, provocada por un mal almacenamiento (Carpita, 1984; Sorensen *et al.*, 2000).

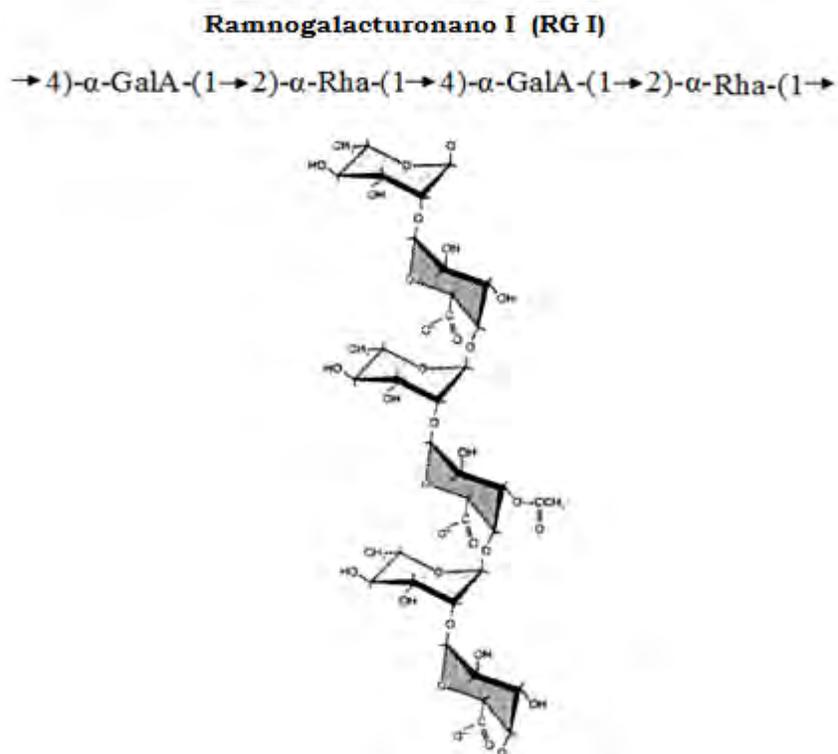


Figura 5. Ramnogalacturonano I  
Fuente: Rodríguez-Palenzuela *et al.*, s.f.

#### 2.4.2. Modelos que tratan de explicar el mecanismo del endurecimiento de la semilla de frijol y que involucran la pared celular.

##### 1. PECTINA-CATIÓN-FITATO

El primer modelo, trata de explicar el fenómeno, mediante el papel que juega la concentración de iones divalentes libres en la semilla del frijol endurecido, durante el proceso de cocción. Nos dice que, durante el almacenamiento a temperatura y humedad altas, la cantidad de iones divalentes libres en la pared celular aumenta. Éstos provienen de la degradación del ácido fítico, que en frijol fresco tiene unidos

iones calcio o magnesio. Durante el remojo o la cocción, la pectina intercambia sus iones monovalentes, por los liberados en el medio por la hidrólisis del ácido fítico, o simplemente los enlaza a sus grupos carboxilos libres y forma una pectina insoluble que le da una mayor fuerza a la pared celular, lo que hace que se requiera mayor tiempo de cocción de la semilla para su ablandamiento. Estos procesos de hidrólisis y de intercambio de iones dependen de la concentración de ácido fítico y fitasa disponible en la célula, ya que ésta es la responsable de la degradación del ácido fítico, por lo que en diversos trabajos se ha investigado la relación entre los factores antes mencionados, por ejemplo, Mafuleka *et al.*, (1993), encuentran que existe una correlación positiva entre la actividad de fitasa y la dureza a la cocción en frijol blanco Malawian, el cual sufre el defecto de endurecimiento durante su almacenamiento, además de un incremento en la concentración de calcio en la pared celular. En otro estudio se encontró que, en frijol negro, conforme el ácido fítico se perdía durante el almacenamiento, la firmeza del frijol se incrementaba (Siewwright y Shipe, 1986). Por otra parte Liu *et al.*, (1993b) encuentran que el defecto de endurecimiento puede ser inducido, al remojar garbanzo en una solución de cloruro de calcio antes de ser sometidos al proceso de cocción y que, aparentemente el calcio es absorbido por el cotiledón. Sin embargo, en otros trabajos (Bernal-Lugo *et al.*, 1990 y 1991) en los que se determinó la concentración de ácido fítico y actividad de fitasa en frijol, con diferente sensibilidad al endurecimiento en almacén, se encontró que no existía relación entre los niveles de ácido fítico y fitasa con la sensibilidad al endurecimiento.

## 2. DEGRADACIÓN DE PECTINA POR $\beta$ -ELIMINACIÓN

El segundo modelo nos habla de la sensibilidad de degradación de las pectinas al proceso de cocción, la cual depende del grado de metilación del grupo carboxilo de la cadena de pectinas, el pH y la interacción con iones divalentes. En frijol fresco, las pectinas son extremadamente sensibles a altas temperaturas y medio cercano al neutro, porque bajo estas condiciones se rompen los enlaces glicosídicos adyacentes al grupo carboximetilo, este proceso se conoce como  $\beta$ -eliminación, y genera moléculas de bajo peso molecular solubles. Por lo tanto, la hipótesis que se maneja es, que existen cambios en las pectinas que evitan que se lleve a cabo ésta degradación o la dificultan (Liu, 1995). Algunas de las posibles causas que se sugieren, podrían provocar estos cambios son: el pH de la semilla; se ha observado que durante el almacenamiento de la semilla el pH del agua de remojo baja, mientras que el tiempo de cocción aumenta y disminuye la degradación de pectinas. También influye el grado de esterificación de las pectinas, a mayor cantidad de grupos carboxilo metilados, mayor facilidad para que se lleve a cabo la reacción de  $\beta$ -eliminación; pues la presencia del grupo metilo en el carbono beta, desestabiliza la densidad electrónica del carbono alfa, haciéndolo más inestable y facilitando, por lo tanto, el rompimiento del enlace glicosídico. Los iones divalentes libres, como calcio o magnesio, pueden interactuar con los grupos carboxilos no metilados de las pectinas, formando cadenas más estables a altas temperaturas, por lo tanto la degradación de pectinas es menor.

### 3. LIGNIFICACIÓN

El tercer modelo involucra el contenido de fenoles y lignina, producto esta última de la polimerización de compuestos fenólicos. Se propone que los fenoles se polimerizan y forman lignina la cual se asocia con proteínas de pared celular, lo que hace más rígida a la pared celular. En frijol fresco no se forma lignina. Hincks y Stanley (1987) observaron por “Microscopía Electrónica de Barrido” y una tinción con permanganato de potasio, que tiñe lignina, que ésta se encuentra presente en frijol endurecido, almacenado a temperatura y humedad relativa altas (85% HR y 30°C), y que se deposita en la pared celular, mientras que en frijol control no se localiza ninguna tinción, lo que indica que en éste último, no existe lignina. Otras evidencias observadas son que la cantidad de fenoles solubles, disminuye conforme el tiempo de almacenamiento de frijol aumenta, concluyendo que los fenoles tienen una participación importante en el desarrollo del endurecimiento del grano que se refleja en un aumento en su tiempo de cocción (Hincks y Stanley, 1986). Esto sugiere que, la lignina se asocia con las pectinas de la **lámina media**, lo que hace más rígida a la pared celular y evita que se solubilizan las pectinas (Hincks y Stanley, 1986, 1987). Además, en otros trabajos se encontró que el almacenamiento inadecuado del frijol incrementó el contenido de lignina en la pared celular de sus cotiledones, así como el contenido de ácido ferúlico y algunas evidencias de la participación del ácido ferúlico en el entrecruzamiento de pectinas (Tintor, 2011; Quezada, 2005).

Los estudios anteriores indican que la calidad de cocción de la semilla de frijol fresco o endurecido, está relacionada con las características de solubilidad de las

pectinas. Sin embargo, existen evidencias que indican, que la solubilidad de pectinas no es el único factor que determina la calidad de cocción. Por ejemplo, cuando la calidad de cocción del frijol disminuye por almacenamiento y los frijoles de lotes fresco y almacenado se cuecen por el tiempo suficiente para solubilizar la misma cantidad de pectina, se encuentra que el grado de termoablandamiento es menor en el frijol endurecido que en el fresco (Liu *et al.*, 1993c).

Por otra parte, estudios sobre la remodelación de la pared celular durante la elongación celular han demostrado que el ramnogalacturonano I (RGI) y las cadenas laterales de arabinano y galactano que “decoran” a la ramnosa tienen gran importancia en la funcionalidad de la pared celular, especialmente en las propiedades mecánicas y térmicas de vegetales que requieren de cocción para ser comestibles (Vincken *et al.*, 2003). Esto ha llevado incluso a modificar el modelo que se tenía de las pectinas y con esto también el de pared celular (Geshi *et al.*, 2000; Willats *et al.*, 2001; Vincken *et al.*, 2003; Ulvskov *et al.*, 2005).

Estos nuevos conceptos y modelos respecto a las pectinas, pero más específicamente a el papel del RGI, nos ha llevado a considerar su importancia en la calidad del frijol. Por otra parte, el hecho de que la calidad culinaria mejore con el remojo, lleva a proponer la participación de enzimas en las modificaciones de la lámina media que provocan su solubilización y el ablandamiento del grano. El hecho de que enzimas de pared celular estén posiblemente involucradas en este fenómeno de ablandamiento, podría ayudar a contar con herramientas moleculares que faciliten una eficiente selección agronómica de cultivares con alta calidad.

Por lo tanto, se tienen dos factores que afectan la calidad culinaria del frijol; uno positivo, que es el remojo y otro negativo, que es el endurecimiento; lo que permite tener un modelo de estudio para poder dilucidar marcadores de la calidad culinaria del frijol.

Lo anterior es importante para poder hacer una selección adecuada de los alimentos, para que cumplan con las expectativas del consumidor, lo cual requiere un entendimiento del efecto de los factores ambientales y genéticos a nivel bioquímico y fisiológico sobre la calidad.

### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### HIPÓTESIS

1. La rigidez de la pared celular, que depende de la fuerza de interacción establecida entre los diversos polisacáridos que la constituyen, influye de manera determinante en la textura de diversos productos vegetales. Por lo que si durante el remojo del frijol, las pectinasas modificaran la estructura de los diversos polisacáridos que constituyen a las pectinas, la rigidez de la pared celular sería menor que la de un frijol sin remojo y el tiempo de cocción también será menor.
2. En las condiciones de almacenamiento en las que el frijol se endurece, la actividad de algunas enzimas ensayadas en diversas semillas, disminuye o es indetectable. Por lo que es muy probable que la actividad de las pectinasas disminuya o se inactive durante el proceso de endurecimiento, y por tanto las pectinas no se modifiquen durante el proceso de remojo con lo cual la pared celular no adquirirá los cambios estructurales que permiten un tiempo de cocción bajo de la semilla.

#### OBJETIVO GENERAL

Definir los factores genéticos y bioquímicos que modifican el tiempo de cocción del frijol.

#### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la calidad culinaria de diferentes cultivares de frijol y el efecto del remojo y el deterioro sobre ella.

2. Evaluar la influencia de los componentes mayoritarios del grano (testa y cotiledón) en la calidad culinaria del frijol.
3. Identificar los cambios estructurales en los diversos polisacáridos de las pectinas realizados “in muro” por la actividad enzimática de las pectinasas, durante el remojo de la semilla para establecer el mecanismo molecular por medio del cual disminuye el tiempo de cocción del frijol.
4. Determinar si el endurecimiento del frijol mostrado por un mayor tiempo de cocción se debe a que las pectinas de la pared celular interaccionan entre ellas y con otros polisacáridos con una mayor fuerza.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

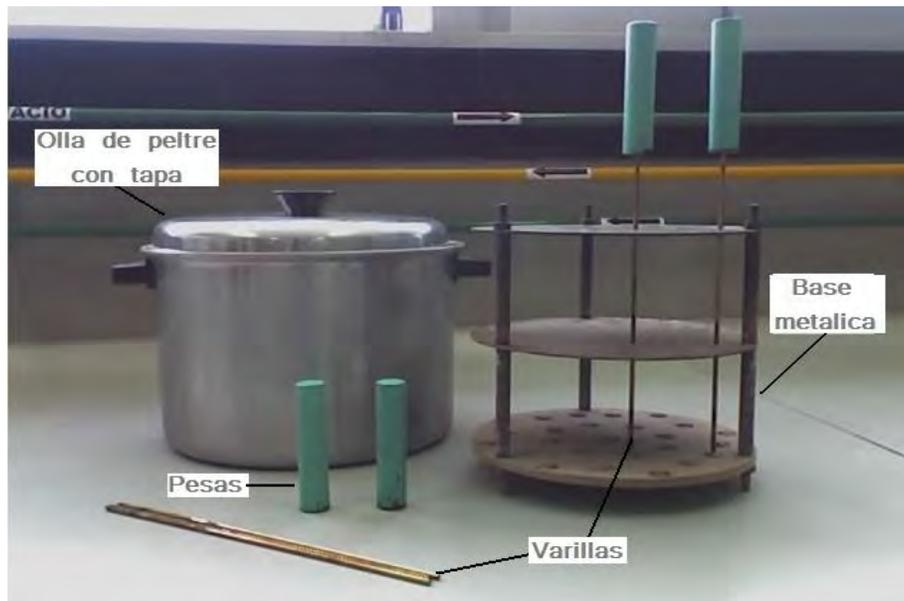
### 4.1. Material Biológico

Al inicio del presente trabajo se evaluaron tres variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Bayo Victoria, Flor de Mayo y Bayo Mecentral además de dos líneas experimentales II-2440 y II-2626, pero posteriormente sólo se usaron dos cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Bayo Mecentral (BM) y Flor de Mayo (FM) y una de las líneas experimentales la II- 26262 durante todo el trabajo. Todos los genotipos fueron cosechados en la primavera del 2004 en Santa Lucía, Estado de México, en la estación experimental del Valle de México del INIFAP. Esta estación está ubicada a 19°29'N y 98°53'O a 2240 metros sobre el nivel del mar. Las semillas se almacenaron a 4°C y una humedad relativa de 40% hasta que se usaron en el laboratorio.

### 4.2. Determinación del Tiempo de Cocción

Para esta prueba se utilizaron semillas frescas y deterioradas, secas y remojadas, estas últimas se colocaron en agua destilada, en una proporción de 1:5 p/v, durante 18 horas a temperatura ambiente. El tiempo de cocción fue determinado por el método de Mattson modificado (Jackson y Varriano-Marston, 1981). Se colocaron 25 semillas, cada una en una depresión del equipo Mattson, colocándole encima una varilla y un peso de 200 g a cada una (figura 6). El equipo se introdujo en una olla de aluminio con agua hirviendo, se tapó la olla y se mantuvo en ebullición hasta que todas las varillas atravesaron los frijoles o por un tiempo máximo de 300 minutos, anotando el tiempo en el que cada varilla perforó

cada una de las semillas de frijol. El tiempo de cocción se determinó graficando el porcentaje de frijoles cocidos contra el tiempo en el cual se cocieron y calculando el tiempo en el cual el 50% del lote se coció. Las pruebas de cocción se realizaron por triplicado.



**Figura 6. Equipo Mattson**

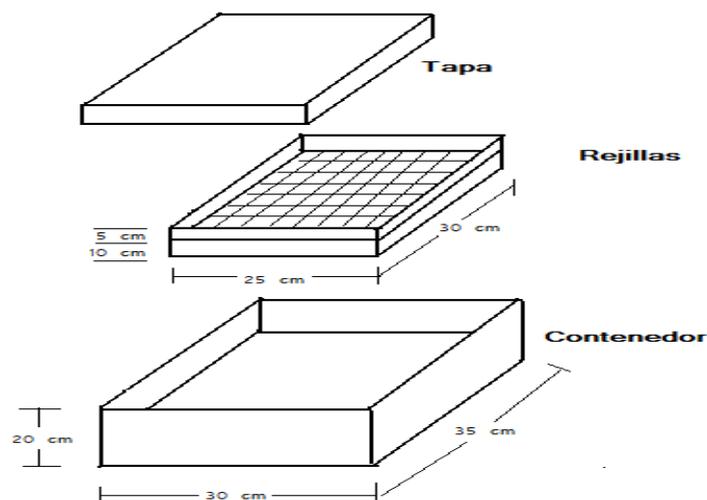
#### **4.3. Determinación de la influencia de la testa y el cotiledón sobre el tiempo de cocción.**

Para conocer la influencia que tenían la testa y el cotiledón sobre el tiempo de cocción, éste se determinó en una misma variedad de semilla con testa y sin testa. Para hacer la prueba sin testa, con una navaja se quitaba un pedazo pequeño de ésta y ahí se colocaba la punta de la varilla del cocinador Mattson (figura 6), ya que si se quitaba toda la testa los cotiledones se separaban. La prueba con testa se realizó como ya se explicó en el inciso 4.2. El porcentaje de influencia de los dos componentes se calculó como sigue: se hizo una relación entre el tiempo de cocción de la semilla con testa, que se consideró el 100% y el

tiempo de cocción de la semilla sin testa cuyo porcentaje se calculó en base al tiempo de cocción de la semilla con testa, y eso se consideró el porcentaje de influencia del cotiledón al tiempo de cocción. Estas pruebas se hicieron a las semillas remojadas tanto frescas como endurecidas.

#### 4.4. Endurecimiento de las semillas

En un recipiente con cierre hermético y dos compartimentos con una separación física permeable a la humedad, se colocó en uno de ellos una solución salina preparada con 39,2 g de cloruro de sodio (J.T. Baker) en 100 ml de agua desionizada, la cual, generaba una humedad relativa de 75%. En el otro compartimiento se colocaron las semillas cuidando de que estas no se mojaran con la solución salina (figura 7). Posteriormente se introdujo el recipiente cerrado en una incubadora a 30°C durante seis meses y se tomaron muestras de semillas para evaluar su tiempo de cocción cada 15 o 30 días dependiendo de la sensibilidad al deterioro de las diferentes variedades.



**Figura 7. Cámara de deterioro**

#### **4.5. Obtención de los cotiledones**

Frijoles secos.- Se retiraron la testa y el eje embrionario con ayuda de una navaja. Los cotiledones obtenidos se guardaron bajo condiciones de refrigeración (4°C) en un frasco de vidrio cerrado y etiquetado.

Frijoles remojados.- Después del periodo de remojo, la semilla se partió por la mitad manualmente y se retiraron la testa y el eje embrionario, obteniéndose de esta manera los cotiledones que se guardaron en las mismas condiciones que los secos.

#### **4.6. Calorimetría Diferencial de Barrido**

Esta prueba se realizó a cotiledones de las diferentes variedades de frijol frescas, secas y remojadas. Los cotiledones se obtuvieron como se explicó en el inciso 4.5. Los cotiledones se molieron en mortero, congelados con nitrógeno líquido. La harina obtenida se tamizó con una malla # 40 USA serie Tyler. Se pesaron de 6 a 10 mg de harina en una cápsula de aluminio y se les adicionó agua desionizada en una relación 1:1 harina:agua y se dejó equilibrar por una hora después de mezclarlo. Las cápsulas se sellaron para determinar sus curvas calorimétricas. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

Velocidad de calentamiento = 5 °C/min por 25 min

Atmósfera de Nitrógeno

Sensibilidad = 0.5 mcal/min. o 0.000119 J/min

Rango de temperatura = 25 a 150 °C

Referencia = Agua desionizada

#### **4.7. Extracción de Pectina**

A 50g de harina de cotiledón se le agregaron 500ml de metanol al 80% y se mantuvieron en ebullición durante 2 horas. La mezcla se centrifugó a 1000 x g por 10 minutos y el precipitado fue lavado tres veces con etanol al 75% para eliminar los azúcares solubles. Por último, se lavó el precipitado con etanol absoluto y se secó con vacío a temperatura ambiente hasta que la muestra estuvo a peso constante. El residuo insoluble en alcohol (RIA) se mantuvo almacenado en un desecador.

Se pesaron 2 g del RIA y se le agregaron 100 ml de CDTA 50 mM pH 8 y se mantuvieron en agitación constante durante 2 horas a 25°C, después de ese tiempo se centrifugó la muestra a 1000 x g y el sobrenadante se colectó en un vaso de precipitados y al precipitado se le repitió la extracción con CDTA 3 veces más. Los extractos se juntaron y se dializaron contra agua destilada y después se precipitaron con etanol al 85 %, el precipitado se lavó con acetona y se seco con vacío. Esta fue considerada la fracción de pectinas.

#### **4.8. Cromatografía de filtración en gel**

Se disolvieron 5 mg de la fracción de pectina en 3 ml de acetato de amonio 50 mM pH 5.2. Esta solución fue separada en una columna de cromatografía de 50 x 1.5 cm conteniendo Sephacryl S-400 (Pharmacia), usando como eluyente el mismo amortiguador de acetatos en el que se disolvió la muestra, a un flujo de 10 ml h<sup>-1</sup>. Las fracciones colectadas fueron de 2.5 ml. La cantidad de azúcares totales y ácido urónico, fueron cuantificados en cada fracción por los métodos del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) y o-hidroxidifenil (Blumenkratz y Asboe-Hanson,

1973) respectivamente. La columna fue calibrada con estándares de dextrinas con diferente peso molecular 2000, 500, 73 y 7 kDa eluidos a un flujo de 10 ml h<sup>-1</sup>.

#### **4.9. Composición de Azúcares**

La composición de azúcares fue determinada por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC). Se usó una columna analítica de carbohidratos de 4.6 X 250 mm con un tamaño de partícula de 4 µm, empacada con aminopropilsilano unido a sílica NOVA-PACK (Waters). Se usó como fase móvil una mezcla de acetonitrilo : agua (4:1). Antes del análisis por HPLC, las muestras se hidrolizaron con ácido trifluoroacético 2 M a 121°C por 2 h, el ácido fue eliminado por evaporación usando una atmósfera de nitrógeno (Fry, 1998), el residuo se disolvió en 0.25 ml de acetonitrilo:agua (4:1) y se filtró en una membrana de 0.25 micras de diámetro.

#### **4.10. Extracción de Enzimas de pared celular**

Para la obtención del extracto enzimático se pesó 1 g de harina de cotiledón, se homogeneizó con 15 ml de amortiguador de acetato de sodio 50 mM pH 5.5 que contenía NaCl 1M y se agitó durante 1.5 h a 4°C. La mezcla se centrifugó a 5000 x g a una temperatura de 4°C. El precipitado se desechó, mientras que el sobrenadante se dializó durante 1h usando 4 litros de amortiguador de acetato de sodio 50 mM pH 5.5 a 4°C y se cambió el amortiguador cada hora durante tres horas. El extracto dializado fue centrifugado a 10,000 x g a 4°C y el sobrenadante fue el extracto enzimático utilizado en la determinación de la actividad enzimática.

#### **4.11. Actividad de las enzimas**

Se cuantificó la actividad de las siguientes enzimas: poligalacturonasa, pectinmetilesterasa, ramnogalacturonasa y galactanasa. La mezcla de reacción fue la siguiente: 0.75 ml de acetato de sodio 65 mM pH 5.5 y 0.25 ml del sustrato respectivo para cada enzima a una concentración de 1 %, además de 0.05ml del extracto enzimático. La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 0.5 h. Para detener la reacción se hirvió la mezcla por 10 min, excepto cuando se determinó la actividad de la enzima pectinmetilesterasa. La actividad de las enzimas ramnogalacturonasa y galactanasa se cuantificó, midiendo la cantidad de azúcares reductores liberados durante la incubación, usando el método de Nelson Somogy (Nelson, 1944) y se usaron como sustratos ramnogalacturonano de soya (Megazym) y arabinogalactano de larch-wood (Sigma). Para medir la actividad de la poligalacturonasa se usó como sustrato ácido poligalacturónico (sigma) y se determinó utilizando 2-cianoacetamida (Gross, 1982). Para la pectinmetilesterasa el sustrato fue pectina esterificada de cítricos (Sigma) y se cuantificó midiendo el metanol liberado usando azul de bromotimol con un método espectrofotométrico continuo (Hagerman y Austin, 1986). Como control para todas las enzimas evaluadas, se usó su extracto enzimático hervido. La actividad de las enzimas fue expresada como actividad específica.

##### **4.11.1. Cuantificación de proteínas**

Se utilizó el método de Lowry *et al.* (1951). En un tubo de ensaye se colocaron 50 µlitros 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  $\mu$ litros 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 absorbencia se interpoló en una curva patrón que se realizó con una solución estándar de seroalbúmina de bovino (Sigma) dentro de un intervalo de 0-100  $\mu$ g / ml.

#### **4.12. Análisis estadístico**

De los resultados obtenidos se obtuvieron los promedios y estos fueron analizados por la prueba de rango múltiple de Duncan.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo se presentarán en dos partes para dar respuesta a cada una de las hipótesis planteadas.

### 5.1. MECANISMO DEL EFECTO BENÉFICO DEL REMOJO DE LA SEMILLA EN EL TIEMPO DE COCCIÓN

#### 5.1.1. Introducción

El tiempo de cocción es la característica comercial más importante del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) ya que los consumidores prefieren las variedades con tiempos cortos de cocción. El remojo de la semilla de frijol antes de cocerlo es una práctica común que ablanda la semilla de la mayoría de los cultivares, y por tanto reduce su tiempo de cocción. Se ha demostrado que ambos tratamientos se acompañan de cambios en la textura de la semilla (Liu, 1995; Reyes-Moreno, Paredes-López 1993). Sin embargo, las bases moleculares de los cambios que ocurren durante el remojo y que mejoran el tiempo de cocción no han sido establecidos. A nivel molecular, los cambios en la textura de los de frijoles remojados están relacionados al poligalacturonano, uno de los polisacáridos pécticos en la lamela media, subestructura presente entre dos células adyacentes y responsables de mantenerlas unidas (Carpita y McCann, 2000; Selvendran, 1984). Recientemente se reportó que la pectina aislada de frijoles está compuesta de xilogalacturonanos, ramnogalacturonanos, arabinanos y galactanos ramificados (Shiga y Lajolo, 2006). Es probable que estos polímeros sean modificados durante el remojo de la semilla ya que la hidratación de la semilla activaría diversas hidrolasas presentes en la pared celular (Brummell *et al.*, 2004; Rose *et al.*, 2003; Bewley y Black, 1994), tales como la ramnogalacturonasa, poligalacturonasa,

pectin-metil-esterasa y galactanasa. La **hipótesis** de este trabajo fue que estas hidrolasas de la pared celular tienen un gran efecto sobre la estructura de todos los polisacáridos que constituyen las pectinas, contribuyendo así a la pérdida de rigidez de la pared celular. Por lo tanto, el **objetivo** de este trabajo fue identificar los cambios estructurales en los diversos polisacáridos de las pectinas, realizados “in muro” por la actividad enzimática de las pectinasas, durante el remojo de la semilla y así establecer el mecanismo molecular por medio del cual el remojo de la semilla previo a la cocción disminuye su tiempo de cocción.

### **5.1.2 Caracterización del material biológico**

Para definir el mecanismo mediante el cual el remojo de la semilla de frijol previo a su cocción incrementa la calidad culinaria a través de disminuir el tiempo de cocción (TC), se requerían genotipos de frijol que presentasen diferencias cuantitativas en cuanto al efecto del remojo de la semilla en el tiempo de cocción y que estas diferencias dependiesen sólo de la carga genética de los genotipos. Para lograr esto se caracterizaron tres cultivares de frijol y dos líneas experimentales proporcionadas por el programa de frijol en INIFAP, Campo México (Dra. Carmen Jacinto y Dr. Ramón Garza). La caracterización de los materiales utilizados en el presente trabajo, consistió en clasificarlos en base al efecto del remojo en el tiempo de cocción (tabla 3). Los tiempos de cocción de los cinco materiales frescos remojados o no, se muestran en la tabla 3. Es importante señalar que las semillas frescas se consideraron como controles y su tiempo de cocción fue dependiente de su carga genética, ya que fueron crecidos en el mismo sitio, bajo el mismo régimen cultural y en el mismo ciclo.

**TABLA 3. Efecto del remojo en el tiempo de cocción de diferentes variedades de frijol**

GENOTIPO	TIEMPO DE COCCIÓN T <sub>50</sub> (min)		ÍNDICE DE BENEFICIO
	SIN REMOJO	CON REMOJO	
<b>2626</b>	<b>126<sup>a*</sup></b>	<b>61<sup>b</sup></b>	2.06
<b>2460</b>	<b>97<sup>a</sup></b>	<b>33<sup>b</sup></b>	2.93
<b>BAYO VICTORIA</b>	<b>ND</b>	<b>47<sup>c</sup></b>	ND
<b>FLOR DE MAYO</b>	<b>126<sup>a</sup></b>	<b>41<sup>b</sup></b>	3.07
<b>B. MECENTRAL</b>	<b>97<sup>a</sup></b>	<b>41<sup>b</sup></b>	2.36

Los datos representan el promedio de tres determinaciones independientes.

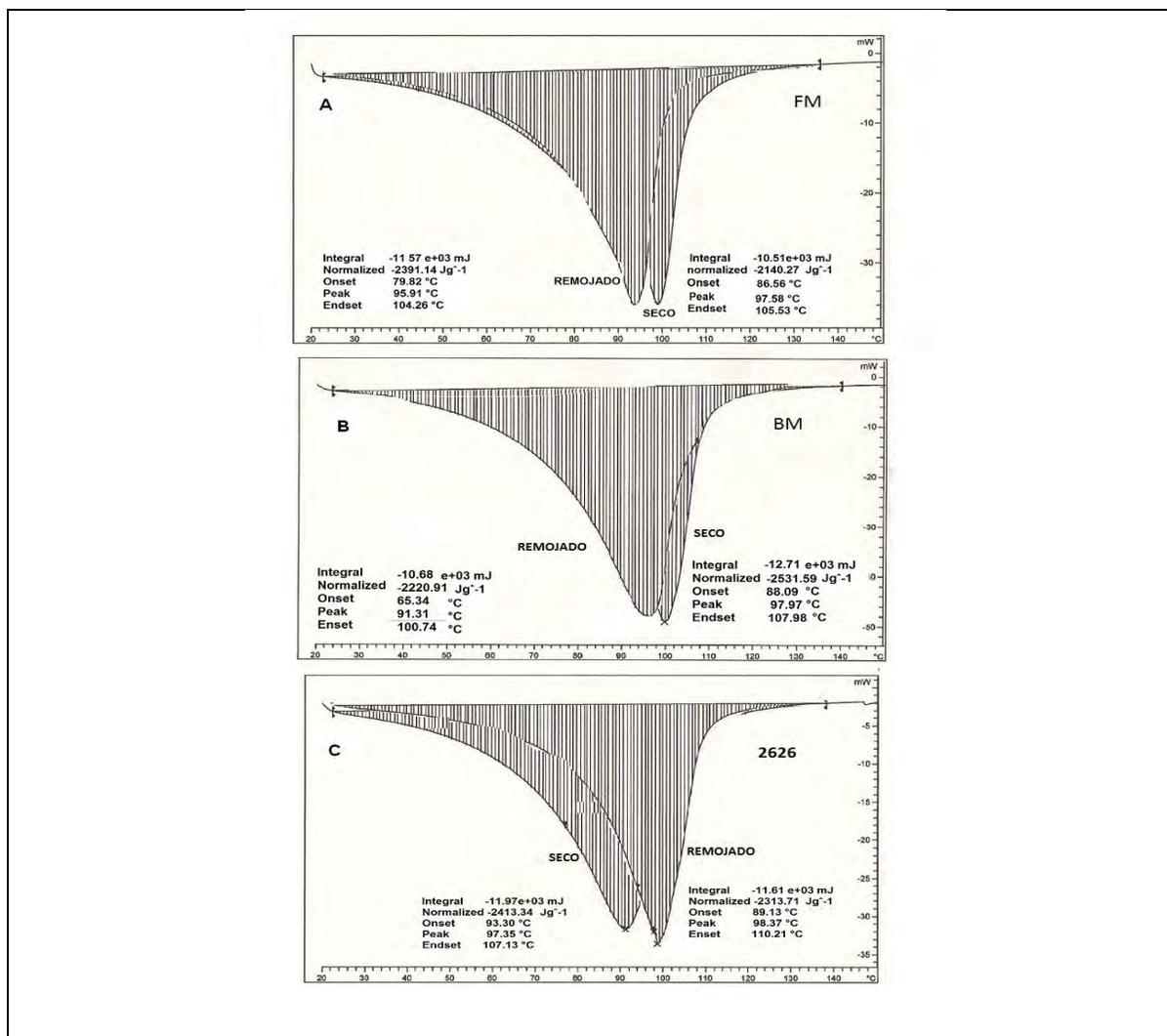
\*Números con diferentes letras entre las columnas sin y con remojo, indican diferencia estadísticamente significativa ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de Duncan.

El remojo de la semilla, previo a su cocción, incrementó la calidad culinaria del frijol ya que el tiempo de cocción disminuyó en todos los casos (tabla 3). Además, las tres variedades: Flor de mayo, Bayo Mecentral y Bayo Victoria remojadas, previo a la cocción, presentaron el mismo tiempo de cocción. Mientras que él de las líneas experimentales, II-2460 y II-2626, fueron diferentes entre ellas. Significativamente menor para la primera, que para la segunda (tabla 3). La magnitud del efecto del remojo en el tiempo de cocción se puede calcular a través de obtener el cociente del tiempo de cocción sin y con remojo para cada uno de los genotipos. A este cociente se le denominó índice de beneficio del remojo en el tiempo de cocción de la semilla (tabla 3). Como se mencionó anteriormente, el remojo de las semillas beneficia a la calidad culinaria del frijol, confirmado por los datos de índice de beneficio obtenidos en este trabajo que en todos los casos fue mayor de 2.0. El índice de beneficio fue mayor para el cultivar Flor de Mayo y menor para la línea experimental II-2626. Basados en los resultados anteriores, se decidió utilizar, para estudios posteriores, la línea experimental II-2626 y los

cultivares Flor de Mayo y Bayo Mecentral debido a que presentaron diferente índice de beneficio. De los resultados en la tabla 3 se concluyó que el remojo de la semilla de frijol previo a la cocción incrementa la calidad culinaria del frijol a través de disminuir su tiempo de cocción.

### **5.1.3 Identificación de los componentes de la semilla responsables del efecto benéfico del remojo**

Trabajos previos demuestran que durante la cocción, el calor induce al menos tres transiciones orden-desorden en la semilla de frijol: gelificación del almidón, desnaturalización de las proteínas y solubilización de las pectinas presentes en la lamela media (Bernal-Lugo, 1997). Por lo que se hipotetizó que si el remojo de la semilla previo a la cocción facilitaba las transiciones orden-desorden del citoplasma, como son la gelificación del almidón y la desnaturalización de proteínas, entonces la entalpía de estos eventos debía ser mayor en frijol seco que en remojado. Para probar esta hipótesis se determinó la entalpía requerida por cada cultivar para que los principales polímeros del citoplasma, las proteínas y el almidón, se desnaturalizaran y gelificaran respectivamente. Esto se determinó por calorimetría de barrido y los resultados se muestran en la figura 8. En ella se observa que aunque la temperatura a la cual se completan las transiciones de orden-desorden es ligeramente diferente, en frijol seco y remojado, la entalpía para todos los cultivares y tratamientos fue similar (tabla 4) indicando que la contribución de los polímeros citoplasmáticos al TC es similar para todos los cultivares ya sea en semillas secas o remojadas.



**Figura 8. Endotermas de cotiledones de frijoles secos y remojo. Variedades A) Flor de Mayo B) Bayo Mecentral, C) 2626.**

Dado que en el efecto benéfico del remojo, previo a la cocción, no están involucradas las macromoléculas citoplásmicas, se exploró la posibilidad de que durante el remojo de la semilla las pectinas fuesen modificadas y esta modificación facilitara su solubilización térmica, resultando en un menor tiempo de cocción.

**TABLA 4. Entalpía del proceso térmico de diferentes variedades de frijol**

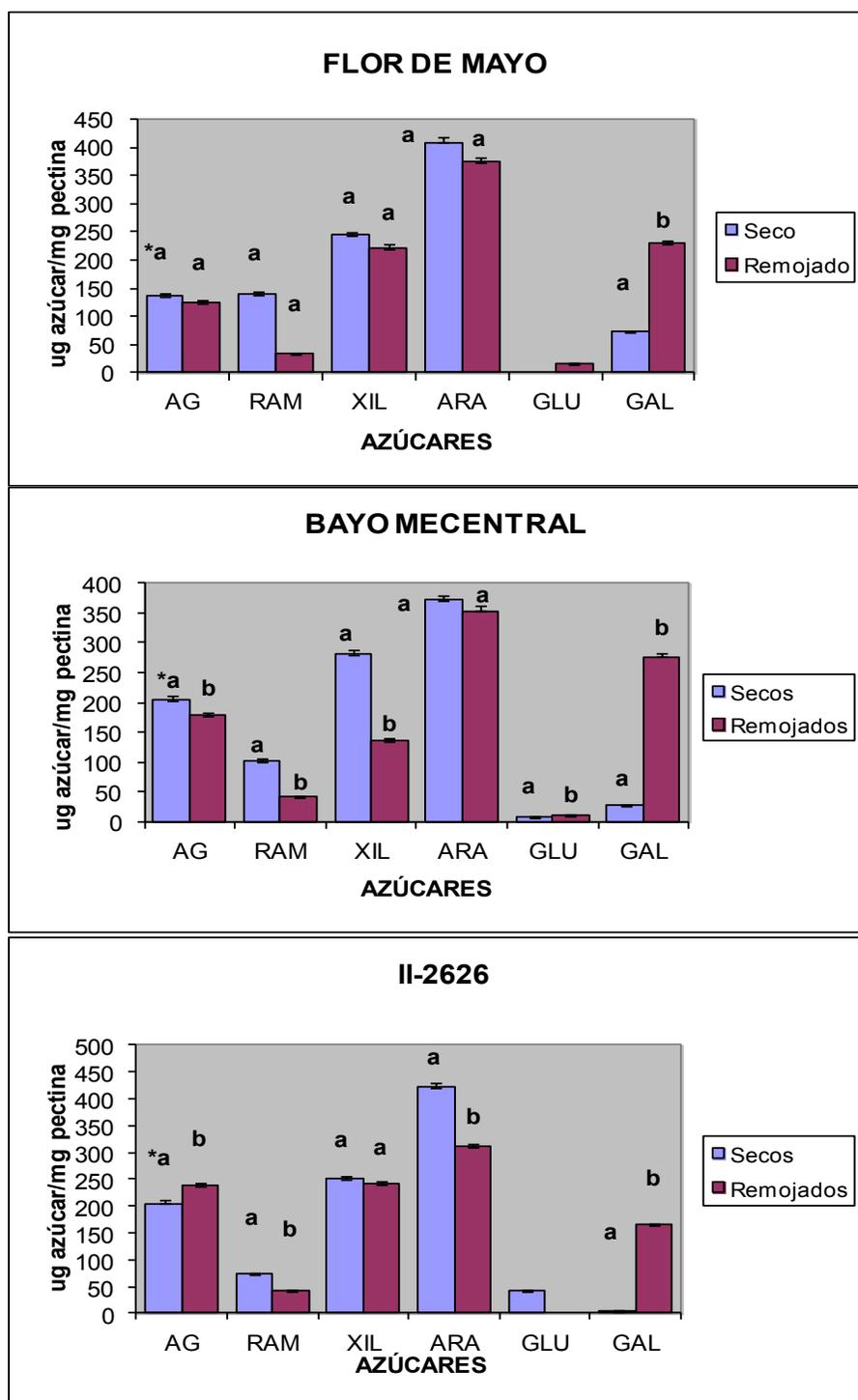
GENOTIPOS	ENTALPÍA NORMALIZADA	
	SECOS (J g <sup>-1</sup> )	REMOJADOS (J g <sup>-1</sup> )
FLOR DE MAYO	-2140.27 <sup>a*</sup>	-2391.14 <sup>a</sup>
BAYO MECENTRAL	-2531.59 <sup>a</sup>	-2220.91 <sup>a</sup>
2626	-2413.34 <sup>a</sup>	-2313.71 <sup>a</sup>

\*Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes. Números seguidos por la misma letra entre columnas indican que no hay diferencia estadísticamente significativa ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de Duncan.

#### **5.1.4. Efecto del remojo sobre la composición química de la fracción de pectinas de las diferentes variedades de frijol frescas**

Para poder determinar los mecanismos que provocan que el remojo disminuya los tiempos de cocción de las variedades de frijol estudiadas, se determinaron las diferencias en la composición química y facilidad de solubilización de los polisacáridos presentes en la fracción de pectinas de frijoles secos y después de ser remojados. La facilidad de solubilización ha sido usada para detectar diferencias en entrecruzamientos de polisacáridos de pared celular (Carpita, 1984). Cambios en facilidad de extracción reflejan cambios en propiedades estructurales y cambios químicos indicarán actividad enzimática (Brummell *et al.*, 2004).

En la fracción de pectina aislada, en todas las variedades de frijol secas, se encontró ácido galacturónico y diferentes tipos y contenidos de azúcares neutros (figura 9). Como la composición de pectina indica el tipo de polisacárido que está



**Figura 9. Composición de azúcares de la fracción de pectinas extraídas de frijoles frescos secos y remojados.**

\*Los promedios entre tratamientos para cada genotipo son diferentes significativamente ( $p \leq 0.05$ ) si tienen diferentes letras, de acuerdo a la prueba de Duncan

presente en esta fracción (Shiga and Lajolo, 2006), se puede inferir que, los polisacáridos de pectinas extraídas del cotiledón de frijoles secos, están compuestos principalmente por polímeros neutros de arabinanos y xilanos. En la pectina extraída, el contenido de arabinosa (ARA) fue de 37-42% y de xilosa (XIL) de 24-28%. También se detectó una cantidad media de pectinas ácidas, considerando que el contenido de ácido galacturónico (AG) fue de 13-20% (figuras 9-11). Además, se observó que los polímeros ácidos tienen ramnosa (RAM) (7.4-13.9%) y cantidades mínimas de galactosa (GAL) (5-7.3%). La presencia de ramnosa indica que en estas variedades de frijoles mexicanos, como en frijoles cariocas (Shiga y Lajolo, 2006), las pectinas ácidas contienen regiones ramificadas de ramnogalacturonano I, además de poligalacturonano, como se puede observar en la figura 9, y esto mismo se ha reportado en otras semillas dicotiledóneas (Colonna *et al.*, 1980; Bhatti, 1990; Gooneratne *et al.*, 1994; Huisman *et al.*, 2001).

Estos polisacáridos son parte de una estructura más compleja llamada ramnogalacturonano-I (RGI), el cual, es un compuesto formado por una cadena principal de residuos de ácido galacturónico y ramnosa unidos por enlaces glicosídicos, que tiene cadenas laterales de arabinogalactano o arabinano y/o galactanos y xilanos unidas al residuo de ramnosa de la cadena principal del RGI (Carpita y McCann, 2000).

Por otra parte, la composición química de los polisacáridos pecticos de frijoles secos fue diferente a la de frijoles remojados (figura 9). En los tres genotipos, los polisacáridos pecticos extraídos de semillas remojadas fueron ricos en galactosa (16-23%) y poligalacturonano (tabla 5), y comparados con las semillas secas fueron pobres en ramnosa (3.4-4.3%).

La variedad Flor de Mayo, a la que el remojo contribuyó más a disminuir su tiempo de cocción (tabla 3), presentó el mayor decremento en la concentración de ramnosa por el remojo (figuras 9). Además, existe una correlación positiva entre el contenido de ramnosa y el tiempo de cocción ( $r = 0.9331$ ,  $P \leq 0.05$ ) tanto en frijoles secos como remojados. Estos resultados nos sugieren que, la hidrólisis del RGI constituye uno de los cambios moleculares que mejoran el tiempo de cocción después del remojo. Una evidencia adicional, que apoya esta propuesta, fue la disminución en el peso molecular de los polisacáridos pécticos extraídos de frijoles remojados, respecto a los no remojados (figura 10).

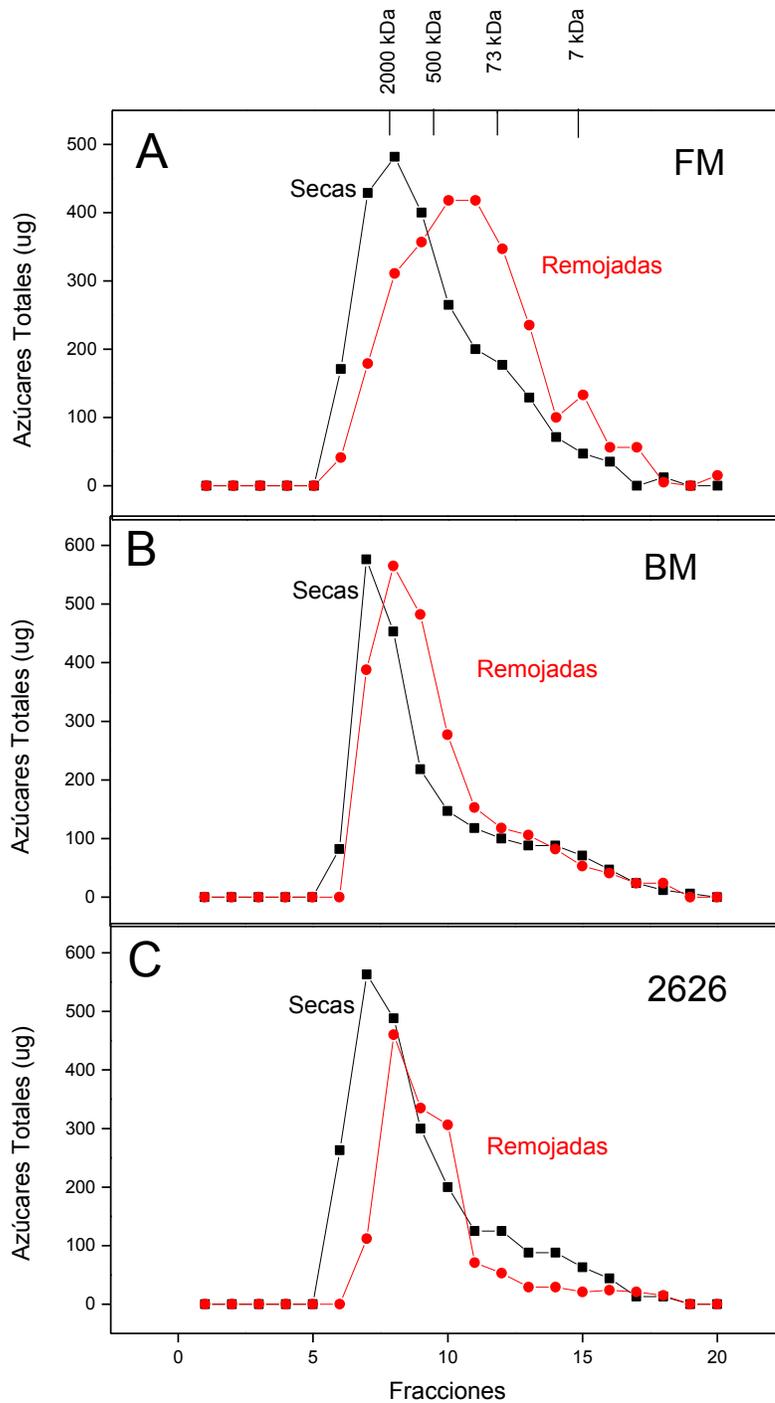


Figura 10. Perfil de peso molecular de pectinas soluble en CDTA de frijoles secos (■) y remojados (●). Variedades A) Flor de Mayo B) Bayo Mecentral, C) 2626. Los marcadores de la parte superior de la gráfica indican la posición de elución de estándares de dextrans: de izquierda a derecha 2000 kDa (exclusión), 500 kDa, 73 kDa, 7 kDa.

Otros cambios observados, en la composición de los polisacáridos, fue que en los frijoles remojados hubo un incremento en galactosa en comparación con los secos (figuras 9). Esto sugiere que el remojo disminuyó la fuerza, con la cual, las cadenas laterales de galactano del RGI interactúan con otros polisacáridos. Esto se puede sugerir porque estudios previos, han reportado que, la facilidad de extracción de polisacáridos de pared celular y la disminución de su peso molecular, están relacionados con diferencias en la fuerza de interacción (Carpita, 1984). También se ha reportado que, en paredes celulares de papa existe hidrólisis de RGI *in muro* y ocurre un “aflojamiento” de la pared celular tan importante, que el galactano puede ser extraído aún cuando este polisacárido está localizado cerca de la membrana plasmática (Sørensen *et al.*, 2000). Por lo tanto, la hidrólisis de la cadena principal del RGI durante el remojo, constituye uno de los cambios moleculares responsables de que el tiempo de cocción de semillas de frijol remojadas sea menor que el de las semillas sin remojo.

**TABLA 5. Cantidad de ácido galacturónico (AGal) como homogalacturonano (HG) en pectina de frijol<sup>s</sup>**

Variedades	Tratamiento	Total AGal	Total RAM	PG (AGal -
		(nmol)	(nmol)	Rha) (nmol)
		(nmoles)		
Flor de Mayo	Seco	707.0	840.0	ND
	Remojado	639.0	200.0	439.0
Bayo Mecentral	Seco	1050.0	628.0	422.0
	Remojado	922.0	262.0	660.0
II-2626	Seco	1060.0	450.0	606.0
	Remojado	1220.0	260.0	960.0

<sup>s</sup>Calculado con datos de la tabla 13 (Ver anexo 1); ND No detectado; RAM, ramnosa

En frijoles cocidos, se han estudiado las regiones de homogalacturonano y se ha visto que, su relación de termosolubilización determina el tiempo de cocción, es

decir, a mayor solubilización el tiempo de cocción es menor (Moscoso *et al.*, 1984). Sin embargo, esto no ha sido evaluado en frijoles remojados antes de su cocción. Por eso, para determinar el papel de este polímero en el mecanismo involucrado en el remojo del frijol, se calculó la fracción total de ácido galacturónico que forma el homogalacturonano (tabla 5). Para hacer esto, se partió de los datos de la tabla 13 mostrada en el anexo 1 y se asumió que la fracción molar del ácido galacturónico, que forma parte de la cadena principal del RGI, debe ser equivalente a la cantidad de ramnosa presente en la fracción de pectina; debido a que el RGI está formado, en su cadena principal, por el dímero  $\alpha$ -(1 – 2)-L-ramnosa- $\alpha$ -(1 - 4) galacturonil (Carpita y McCann, 2000) y se asume que el resto del ácido galacturónico detectado forma la fracción del homogalacturonano.

Se ha demostrado, en sistemas de pectinas hidratadas *in vitro*, que el contenido de homogalacturonano influye en la flexibilidad de estos polímeros (Ralet *et al.*, 2008). Por lo tanto se puede decir que, las moléculas de pectina en semillas de frijol hidratadas tuvieron diferente grado de flexibilidad, debido a que la cantidad de ácido galacturónico detectado fue mayor para la línea experimental II-2626 y más bajo para la variedad FM (tabla 5). La mayor cantidad de ácido galacturónico detectada en la pectina extraída de semillas remojadas, pudiera explicarse por cambios en los patrones de entrecruzamiento, que facilitan la extracción de la pectina. Estos cambios contribuyen a la pérdida de rigidez de la pared celular y a una disminución en la adhesión intercelular y por lo tanto a menores tiempos de cocción.

### **5.1.5. Efecto del remojo sobre la actividad de enzimas de pared celular de diferentes variedades de frijol frescos**

Nosotros asumimos que las enzimas de pared celular, están activas en frijoles remojados, debido a la presencia de agua, y que pueden formar polisacáridos como se ha observado en tejidos de plantas en crecimiento (Cosgrove, 2005) y durante la maduración de frutos (Brummell, 2004). También se ha reportado que, cambios en el peso molecular y solubilidad de los polisacáridos de pared celular, se deben a la actividad de enzimas que remodelan sus diferentes estratos (Brummell, 2004). Por esta razón, en este trabajo se decidió cuantificar la actividad de diferentes enzimas involucradas en el metabolismo de las pectinas (tablas 6 y 7).

Se detectó la actividad de las enzimas: ramnogalacturonasa, galactanasa, poliogalacturonasa y la pectinmetilesterasa (PME). En las variedades Flor de Mayo y Bayo Mecentral, todas las enzimas fueron activas en semillas control y como se esperaba, el remojo incremento su actividad. Sin embargo en semillas secas, la actividad de PME en II-2626 fue notablemente mayor que la detectada en FM y BM. Aunque no hubo diferencia en la actividad de PME entre las semillas secas y remojadas de FM y BM, sí fue significativamente más alta la actividad de esta enzima en las semillas remojadas de II-2626 que en secas comparadas con FM y BM (tabla 6). Esto está probablemente relacionado a su carga genética, que está asociada con altos contenidos de ácido galacturónico, un polímero secretado en forma metilada (Dolan, 1997).

**TABLA 6. Efecto del remojo sobre la actividad de poligalacturonasa y pectin-metil-esterasa de pared celular<sup>§</sup> de las diferentes variedades de frijol frescas<sup>§</sup>**

Enzimas	Poligalacturonasa (U) nmol de ácido galacturónico min <sup>-1</sup> mg prot <sup>-1</sup>		Pectinmetilesterasa (U) nmol de metanol min <sup>-1</sup> mg prot <sup>-1</sup>		
	Cultivar	Seco	Remojado	Seco	Remojado
<b>F. Mayo M38</b>		4.1±0.20 <sup>a*</sup>	9.6±0.22 <sup>b</sup>	8.0±0.21 <sup>a</sup>	8.0±0.18 <sup>a</sup>
<b>B. Mecentral</b>		4.0±0.18 <sup>a</sup>	7.2±0.17 <sup>b</sup>	2.0±0.06 <sup>a</sup>	2.0±0.07 <sup>a</sup>
<b>II-2626</b>		2.2±0.03 <sup>a</sup>	5.0±0.15 <sup>b</sup>	17.0±0.3 <sup>a</sup>	27.0±0.32 <sup>a</sup>

<sup>§</sup>Valores promedio de tres determinaciones independientes; \*Datos con la misma letra entre tratamientos no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de Duncan.

Nosotros inferimos que los cambios descritos en la estructura del RGI y el aumento en la facilidad de extracción de homogalacturonano y galactano, mostrados en los resultados previos, debe ser provocado por la actividad enzimática generada de manera natural, porque el remojo se realizó a temperatura ambiente, es decir, no pudo haber hidrólisis química de los enlaces glicosídicos que caracterizan a los polisacáridos de pared celular. La disminución del peso molecular de la fracción de pectinas, es otra evidencia de que la actividad enzimática hidrolizó la cadena principal del RGI en la pared celular (figura 10). El incremento en la facilidad de extracción de galactano y homogalacturonano, pudiera ser el resultado de la actividad de galactanasa y poligalacturonasa o del aflojamiento de la pared celular causado por hidrólisis enzimática de la cadena principal de RGI provocado por la ramnogalacturonasa (tabla 7).

**TABLA 7. Efecto del remojo sobre la actividad de ramnogalacturonasa y galactanasa de pared celular de los diferentes genotipos de frijol<sup>§</sup>**

Enzima	Ramnogalacturonasa		Galactanasa	
	mg de azúcares reductores mg proteína <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>			
Cultivar	Seco	Remojado	Seco	Remojado
FLOR DE MAYO	65.3 ± 3.1 <sup>a*</sup>	137.7 ± 4.1 <sup>b</sup>	76.0 ± 2.1 <sup>a</sup>	143.5 ± 10 <sup>b</sup>
B. MECENTRAL	94.3 ± 5.4 <sup>a</sup>	134.6 ± 5.8 <sup>b</sup>	78.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	133.9 ± 8.7 <sup>b</sup>
II-2626	119.5 ± 2.6 <sup>a</sup>	186.0 ± 9.4 <sup>b</sup>	107.7 ± 6.8 <sup>a</sup>	184.9 ± 6.9 <sup>b</sup>

<sup>§</sup>Valores promedio de tres determinaciones independientes

\* Diferentes letras entre tratamientos indican diferencia estadísticamente significativa ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de Duncan.

Los resultados presentados previamente pueden integrarse en un modelo. Las características de las pectinas, que afectan la rigidez de la pared celular, son reflejadas en el tiempo de cocción. La cocción de frijoles sin remojar inicia con una semilla seca que tiene una pared celular muy rígida. Las enzimas de pared celular son inactivadas por el calor y no pueden modificar sus polisacáridos. Por lo tanto, el tiempo de cocción dependerá de la composición química original de las pectinas. Por otra parte y en contraste con esto, en frijoles remojados la cocción inicia con frijoles hidratados y los polisacáridos pécticos son de bajo peso molecular y flexible, porque ellos fueron modificados enzimáticamente durante el remojo. Por lo tanto, cuando se cuecen frijoles remojados, la solubilización de pectinas que causa la separación celular, requiere menos energía térmica y por eso el tiempo de cocción de frijoles remojados es más corto que el de frijoles sin remojar.

La identificación de la composición química y los mecanismos involucrados en los cambios estructurales de los polisacáridos pécticos durante el remojo, facilitará el desarrollo de métodos de procesamiento que ayuden a disminuir los tiempos de

cocción, por ejemplo, cuando no es genéticamente inherente en la semilla de frijol. Esta información también puede ser usada para seleccionar genotipos con tiempos de cocción cortos por programas de fitomejoramiento.

#### **5.1.6. CONCLUSIONES**

El remojo del frijol disminuye el tiempo de cocción al promover los siguientes eventos:

1. Activar las enzimas de pared celular
2. Disminuir el grado de polimerización de la cadena principal del RGI
3. Incrementar la solubilidad del homogalacturonano y el galactano

Estos cambios resultan en un nuevo arreglo de los polisacáridos de pared celular, que se refleja en una mayor velocidad de termosolubilización de polisacáridos pécticos y por lo tanto, en tiempos de cocción más cortos.

## **5.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS DOMINIOS PECTICOS QUE CONTRIBUYEN A LA MAYOR RIGIDEZ DE LA PARED CELULAR DEL FRIJOL ENDURECIDO Y LAS CAUSAS QUE MODIFICAN SU INTERACCIÓN.**

### **5.2.1. Introducción**

En México, el 90% del frijol es producido por pequeños agricultores (Acosta-Gallegos y Pérez, s.f.) y el período entre su cosecha y su consumo es variable, de semanas a varios meses, por lo que debe ser almacenado. En general, las condiciones de almacenamiento no son las adecuadas para mantener el tiempo de cocción de la semilla recién cosechada y éste se incrementa, y se dice que las semillas se han endurecido (Pérez-Herrera *et al.*, 2002). La magnitud del incremento en el tiempo de cocción de la semilla de frijol depende del tiempo de almacenamiento, de las condiciones de humedad relativa (HR) y de temperatura (T) en el ambiente del almacén, así como del genotipo de la semilla (Liu, 1995). Dado que la cocción del frijol se realiza a temperatura constante, ebullición del agua, el mayor tiempo de cocción que presenta el frijol endurecido, indica que la cantidad de energía que requieren las transiciones moleculares responsables de la cocción de la semilla [gelatinización del almidón, desnaturalización de proteínas, solubilización de pectinas y aflojamiento de la pared celular (Bernal-Lugo, 1997)], es mayor que la que se requiere para semillas frescas. Dado que la energía, cuantificada como entalpía, requerida para que se gelatinice el almidón y las proteínas se desnaturalicen es similar en frijol control y endurecidos (García and Lajolo, 1994), el incremento en el tiempo de cocción en el frijol endurecido, podría ser consecuencia de cambios en la estructura de los polisacáridos de la pared celular, ya sea en la testa o en el cotiledón o en ambos, lo que a su vez afectaría

su termo-solubilidad y los mecanismos de termo-relajación de la pared celular. Por lo anterior, el **objetivo** de este trabajo fue demostrar que el mayor tiempo de cocción de los frijoles endurecidos respecto de los controles se debió a que las pectinas de la pared celular en el primer caso interaccionan entre ellas y con otros polisacáridos con una mayor fuerza. Para lo cual se estudiaron los cambios fisicoquímicos y químicos de los polisacáridos de la pared celular cuando el frijol es almacenado en condiciones en las que se desarrolla el fenómeno de endurecimiento. Esta estrategia permite predecir la fuerza relativa de interacción de los polisacáridos entre dos condiciones, porque la composición química y la solubilidad en CDTA de los polisacáridos pécticos indican el tipo de polisacárido y la fuerza de interacción entre ellos y con los diversos polímeros de la pared celular (Shiga and Lajolo, 2006; Marry *et al.*, 2000; Qi *et al.*, 2000).

### **5.2.2. Endurecimiento del frijol por almacenamiento de las semillas en condiciones inadecuadas**

Los tiempos de cocción para los diversos cultivares almacenados en condiciones inadecuadas fue más largo que el que presentaron los frijoles frescos (tabla 8). En esta sección el tiempo de cocción de las semillas se determinó en semillas remojadas previo a la cocción.

**Tabla 8. Efecto del almacenamiento inadecuado en el TC<sub>50</sub> de diversos genotipos de frijol.**

Genotipo	Tiempo de cocción (TC <sub>50</sub> min)		Sensibilidad a endurecerse <sup>‡</sup>
	Control	Almacenado*	
<b>II-2626</b>	<b>61 ± 4.25</b>	<b>137 ± 7.32</b>	<b>2.24</b>
<b>Bayo Mecentral</b>	<b>41 ± 2.32</b>	<b>245 ± 11.23</b>	<b>5.97</b>
<b>Flor de Mayo</b>	<b>41 ± 2.12</b>	<b>141 ± 5.13</b>	<b>3.43</b>

\*75 % HR y 40°C por 30 días; <sup>‡</sup>TC<sub>50</sub> almacenado / TC<sub>50</sub> control

Dado que el tiempo de cocción de los diversos genotipos de frijol almacenado se incrementó respecto al del control, concluimos que los frijoles almacenados bajo estas condiciones presentaron el problema de endurecimiento y estas semillas, a lo largo de este trabajo, se denominaran endurecidas. La magnitud de este endurecimiento fue diferente en cada genotipo como se observa en el parámetro denominado sensibilidad al endurecimiento y que representa el número de veces que se incrementó el TC<sub>50</sub> del frijol endurecido respecto al del control. Así se puede concluir que de los genotipos estudiados, el Bayo Mecentral es el genotipo que presentó la mayor sensibilidad al endurecimiento y el genotipo II-2626 fue el de menor sensibilidad.

### 5.2.3. Identificación de la región de la semilla de frijol que contribuye en mayor proporción al endurecimiento

Los largos tiempos de cocción que presentan las semillas de frijol endurecido podrían deberse a cambios inducidos durante el almacenamiento inadecuado, en una o en las dos regiones mayoritarias del frijol, que son la testa y el cotiledón (Adsule *et al.*, 2004). Como en este trabajo, lo que se quería era analizar los cambios generados en los cotiledones que conducen al problema del endurecimiento, primero se debía conocer la contribución de la testa al tiempo de cocción de la semilla. Dado que el  $TC_{50}$  es el tiempo en el cual el 50 % de las semillas han sido penetradas por las varillas del Mattson, se determinó el tiempo de cocción medio ( $TC_{50}$ ) del frijol con testa y removiendo parcialmente la testa. En esta última determinación, la barra del Mattson se colocó sobre el área sin testa, por lo que en este caso, la barra atravesaría la semilla al cambiar sólo la textura del cotiledón, mientras que en la semilla completa la varilla penetra cuando cambia tanto la textura de la testa como la del cotiledón (Tabla 9).

**TABLA 9. Influencia del cotiledón y la testa en los tiempos de cocción de diferentes variedades de frijol control y deteriorado.**

GENOTIPO	CON TESTA $T_{50}$ (min)	SIN TESTA $T_{50}$ (min)	INFLUENCIA de la TES. %*	INFLUENCIA del COT. %*
<b>Control</b>				
<b>II-2626</b>	<b>61</b>	<b>30</b>	<b>50</b>	<b>50</b>
<b>Bayo Mecentral</b>	<b>41</b>	<b>27</b>	<b>34</b>	<b>66</b>
<b>Flor de Mayo</b>	<b>41</b>	<b>30</b>	<b>27</b>	<b>73</b>
<b>Endurecido</b>				
<b>II-2626 (Endurecido)</b>	<b>137</b>	<b>115</b>	<b>16.05</b>	<b>83.94</b>
<b>Bayo Mecentral</b>	<b>245</b>	<b>235</b>	<b>4.08</b>	<b>95.91</b>
<b>Flor de Mayo</b>	<b>141</b>	<b>134</b>	<b>5.00</b>	<b>95.00</b>

\*Calculado respecto al  $T_{50}$  de la semilla de frijol con testa como 100%

Lo que se observó fue que en todos los genotipos, independientemente de si eran frescos o endurecidos, la contribución de la testa al tiempo de cocción de la semilla fue menor o igual que la contribución del cotiledón (Tabla 9). En los genotipos Bayo Mecentral, Flor de Mayo y II-2626 endurecidos, la contribución de la testa al TC<sub>50</sub> fue de sólo 4, 5 y 16 %, respectivamente. Indicando que en estos genotipos, los cambios que conducen al endurecimiento de la semilla se realizaron principalmente en los cotiledones (Tabla 9).

#### **5.2.4. Efecto del endurecimiento del frijol en el peso molecular promedio de pectinas**

La distribución molecular de las pectinas aisladas de los cotiledones de las semillas control y endurecidas fue determinada por filtración molecular (figura 11). Se observó que en todos los genotipos, el peso molecular de las pectinas aisladas de semillas endurecidas fue mayor que el detectado en las pectinas aisladas de semillas control (figura 11). Recientemente se demostró (Martínez-Manrique *et al.*, 2011) que en frijol fresco, el remojo de la semilla previo a la cocción disminuyó el peso molecular de las pectinas mediante la acción de diversas pectinasas por lo que el resultado de la figura 11 indica que en frijol endurecido las pectinas se modificaron de tal manera que ya no son reconocidas como sustrato por las pectinasas o bien que las pectinasas se inactivaron. Esto último se ha demostrado para diversas enzimas aisladas de semillas envejecidas por

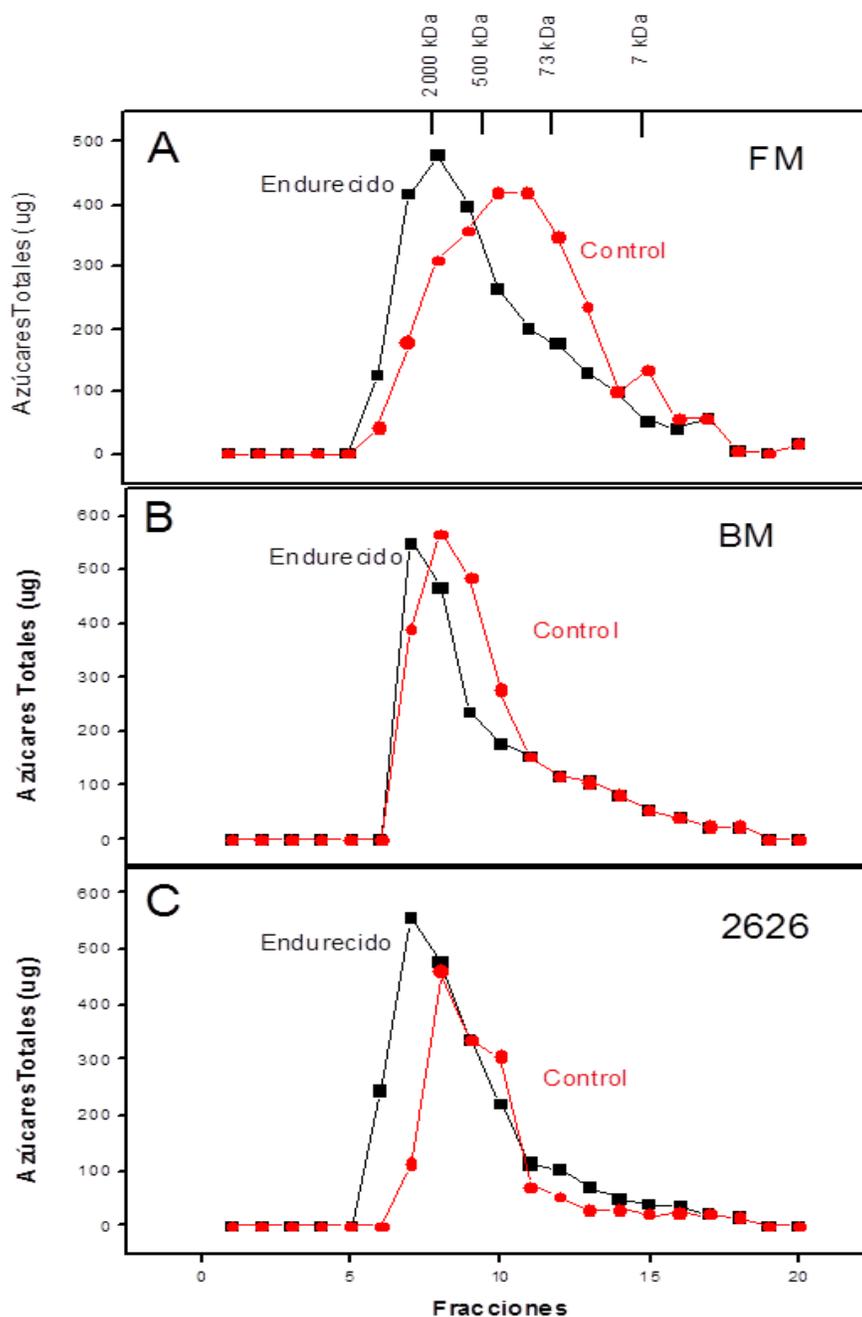


Figura 11. Perfil de peso molecular de pectinas soluble en CDTA de frijoles endurecidos (■) y controles (●). Genotipos A) Flor de Mayo B) Bayo Mecentral, C) 2626. Los marcadores de la parte superior de la gráfica indican la posición de elución de estándares de dextranas: de izquierda a derecha 2000 kDa (exclusión), 500 kDa, 73 kDa, 7 kDa.

almacenamiento en condiciones de humedad relativa y temperatura similares a las utilizadas para endurecer las semillas de frijol (Bernal-Lugo *et al.*, 1994; 2000).

### 5.2.5. Actividad de diversas pectinasas en semillas de frijol endurecido

Para explorar la posibilidad de que las enzimas pecticas se pudieran haber inactivado durante el almacenamiento del frijol, la actividad de diversas hidrolasas de pectina fue cuantificada. Los resultados mostraron que, en las semillas endurecidas la actividad de ramnogalacturonasa y galactanasa (tabla 10) fue mucho menor que la detectada en semillas control, pues disminuyó entre 2.4 a 5.8 y 2.2 a 4.7 veces respectivamente. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ).

**TABLA 10. Actividad de ramnogalacturonasa y galactanasa de pared celular aislada de frijol control y endurecido remojados<sup>§</sup>.**

Enzima	Ramnogalacturonasa		Galactanasa	
	$\mu\text{g de azúcares reductores mg proteína}^{-1} \text{ h}^{-1}$			
GENOTIPO	CONTROL	ENDURECIDO	CONTROL	ENDURECIDO
II-2626	186.0 <sup>a</sup> $\pm$ 9.4	75.3 <sup>b</sup> $\pm$ 3.8	184.9 <sup>a</sup> $\pm$ 6.9	84.6 <sup>b</sup> $\pm$ 0.5
B. MECENTRAL	134.6 <sup>a</sup> $\pm$ 5.8	26.5 <sup>b</sup> $\pm$ 1.4	133.9 <sup>a</sup> $\pm$ 8.7	28.5 <sup>b</sup> $\pm$ 0.5
FLOR DE MAYO	137.7 <sup>a*</sup> $\pm$ 4.1	23.7 <sup>b</sup> $\pm$ 0.4	143.5 <sup>a</sup> $\pm$ 10.1	35.3 <sup>b</sup> $\pm$ 2.2

<sup>§</sup> Valores promedio de tres determinaciones independientes.

\* Datos con la misma letra entre tratamientos no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de Duncan.

También se evaluó, aunque sólo para la variedad Flor de Mayo la actividad de las enzimas poligalacturonasa (PG) y pectinmetilesterasa (tabla 11).

En las semillas control remojadas se detectó la actividad de la enzima poligalacturonasa (PG), pero en semillas endurecidas ésta ya no fue detectada; mientras que la actividad de pectinmetilesterasa (PME) se detectó tanto en las

**TABLA 11. Efecto del almacenamiento en la actividad de pectinasas en la variedad Flor de Mayo.**

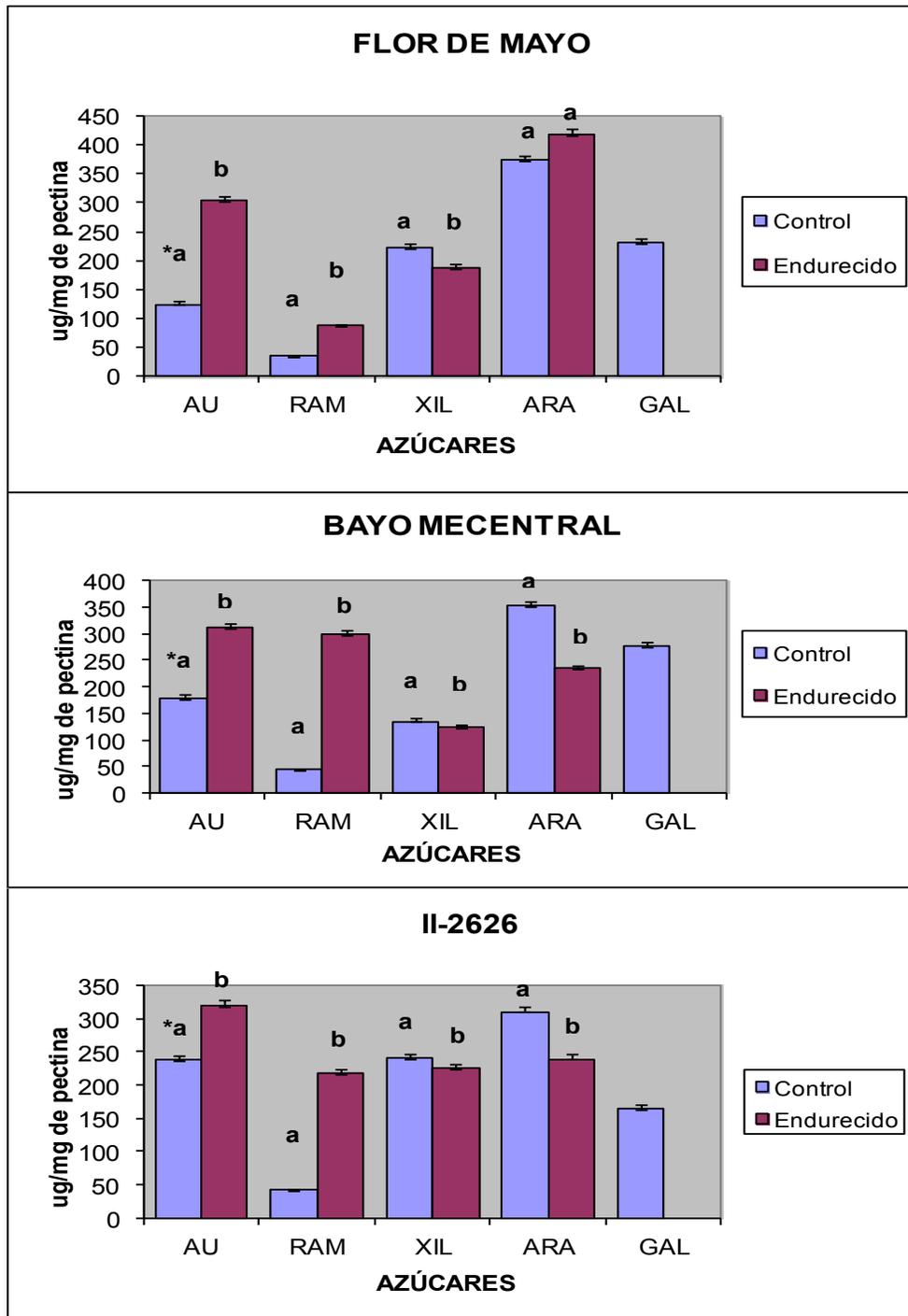
<b>ENZIMAS</b>	<b>Poligalacturonasa*</b>	<b>Pectin-metil-esterasa**</b>
<b>LOTE</b>	nmols de ácido galacturónico min <sup>-1</sup> mg prot <sup>-1</sup>	nmols de metanol min <sup>-1</sup> mg prot <sup>-1</sup>
<b>CONTROL</b>	<b>9.6</b>	<b>8.0<sup>az</sup></b>
<b>ENDURECIDO</b>	<b>ND</b>	<b>4.0<sup>b</sup></b>

<sup>z</sup> Datos con la misma letra entre tratamientos no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de Duncan.

semillas control como en endurecidas, aunque en estas últimas disminuyó significativamente ( $P \leq 0.05$ ). En conjunto estos resultados explican, al menos parcialmente, porque las pectinas extraídas de frijoles endurecidos remojados presentaron mayor peso molecular que sus respectivos controles.

#### **5.2.6. Efecto del endurecimiento sobre la composición química de la fracción de pectinas de diferentes variedades de frijol remojadas.**

La composición química de las pectinas aisladas de frijoles endurecidos se comparó con la aislada de frijoles control, después de ser remojados. La composición química de las pectinas extraídas de frijoles endurecidos remojados fue muy diferente a la de los controles (figuras 12). La primera diferencia notable fue la ausencia de galactosa (GAL) en las primeras respecto de las últimas. La segunda, fue que la abundancia de ramnosa (RAM) fue de 5 a 7 veces mayor en pectinas aisladas de semillas endurecidas de los genotipos II-2626 y Bayo Mecentral, respectivamente. Mientras que en el cultivar Flor de Mayo fue de sólo 2.6 veces. También fue notorio, que la abundancia de ácido urónico (AU) fue mayor, aunque similar para todos los genotipos, en pectinas aisladas de semillas endurecidas que en las aisladas de las controles.



**Figura 12. Composición química de pectina aislada de frijoles remojados control y endurecidos.**

\*Los valores promedio son significativamente diferentes entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ) si tienen diferentes letras de acuerdo a la prueba de Duncan.

Respecto a la abundancia de xilosa (XIL), este azúcar disminuyó ligeramente ( $\geq 8$  %), pero de manera estadísticamente significativa ( $P \leq 0.05$ ), en las pectinas extraídas de todos los genotipos endurecidos. Por su parte, la abundancia de arabinosa (ARA) al igual que la xilosa disminuyó en los genotipos II-2626 y Bayo Mecentral, aunque esta disminución fue mayor que el de la xilosa, de 33 y 35 % respectivamente. En el caso del cultivar Flor de Mayo la abundancia de arabinosa no se modificó por el endurecimiento de la semilla. Como se ha reportado (Marry *et al.*, 2000; Qi *et al.*, 2000) la composición de pectinas indican el tipo de polisacáridos que la forman, por eso se infiere que las pectinas extraídas de los frijoles control remojados están compuestas en su gran mayoría por polímeros neutros de arabinanos, xilanos y galactanos; y en menor cantidad homogalacturonano y ramnogalacturonano. En contraste, las pectinas aisladas de semillas endurecidas están constituidas por casi igual proporción de polímeros ácidos y neutros. Estos últimos se diferencian de los presentes en pectinas extraídas de frijol control por la ausencia de galactosa en su composición.

Las pectinas ácidas pueden ser de dos tipos, el homogalacturonano, que como su nombre lo indica está formado de sólo ácido urónico y el ramnogalacturonano I (RGI) cuya cadena principal está formada por el dímero  $\alpha$ -(1 – 2)-L-ramnosa- $\alpha$ -(1 - 4) galacturonil (Carpita y McCann, 2000). Por lo que, para determinar cuánto de la fracción de polímeros ácidos era homogalacturonano se calculó la fracción total de ácido galacturónico que forma el homogalacturonano (tabla 12). Para hacer esto, se partió de los datos de la tabla 14 mostrada en el anexo 1 y se asumió que la fracción molar del ácido galacturónico, que forma parte de la cadena principal

del RGI, debía ser equivalente a la cantidad de ramnosa presente en la fracción de pectina y el resto del ácido urónico detectado formaría la fracción del homogalacturonano. En los datos de la tabla 12 se observa que, la abundancia del ramnogalacturonano es mayor en todos los genotipos endurecidos respecto de la de sus respectivos controles.

**TABLA 12. Cantidad de ácido galacturónico (AGal) como homogalacturonano (HG) en pectina de frijol<sup>s</sup>**

Genotipo	Lote	Total AGal	Total Ram	HG (AGal -
		(nmol)	(nmol)	Ram) (nmol)
II-2626	Control	1220	260	960
	Endurecido	1643	1188	455
Bayo Mecertral	Control	922	262	660
	Endurecido	1602	1645	ND
Flor de Mayo	Control	639	200	439
	Endurecido	1566	487	1079

<sup>s</sup>Calculado con datos de la tabla 14 (Ver anexo 1). ND No detectado. Ram, ramnosa.

Este resultado se puede explicar asumiendo que, las condiciones experimentales permitieron recuperar toda la pectina presente en frijol endurecido porque en estas semillas, las pectinasas están inactivas. Mientras que en frijol fresco, las pectinas pudieron ser hidrolizadas por la acción de las pectinasas presentes en la pared celular, durante el aislamiento de las mismas, de forma tal que algunos de los oligosacáridos producidos, no fueron recuperados por la precipitación con etanol, que es la forma en que las pectinas se recuperaron. Los cambios en el contenido de homogalacturonano, también fueron observados en todos los genotipos, pero no fueron tan consistentes como para la ramnosa. Mientras en el genotipo Flor de Mayo la abundancia de homogalacturonano es mucho mayor en las pectinas extraídas de frijol endurecido que en las del control; en los otros dos genotipos, la

abundancia de este polímero fue mucho menor como en el caso de II-2626 o indetectable como en el caso del Bayo Mecentral (tabla 12).

### **5.2.7. DISCUSIÓN**

La presencia de una fracción de pectinas de mayor peso molecular en frijol endurecido respecto del control, se debió a la baja actividad o inactividad de enzimas remodeladoras de pared celular detectada en frijol endurecido respecto del control. Dado que en los diversos genotipos de frijol endurecido, se detectaron entre el 17 y 40 % de la actividad de ramnogalacturonasa y galactanasa, pero no se detectó la disminución en peso molecular que estas enzimas realizaron en las pectinas del frijol control (Martínez-Manrique *et al.*, 2011), es probable que para que se realice la acción de estas hidrolasas, primero tenga que actuar la endopoligalacturonasa, y la actividad de esta pectinasa no fue detectada en frijol endurecido.

Recientemente se demostró que a mayor rigidez de la pared celular, mayor es el tiempo de cocción de la semilla de frijol (Martínez-Manrique, *et al.*, 2011). Una manera indirecta de evaluar comparativamente el grado de rigidez de la pared celular es a través de determinar la solubilidad de las pectinas en soluciones de CDTA (Carpita, 1984) y a estas determinarles su composición química para identificar los tipos de polisacáridos pécticos involucrados en la interacción (Shiga y Lajolo, 2006). Tomando en cuenta lo anterior, la disminución en la abundancia de monosacáridos en las pectinas aisladas con CDTA de un genotipo control respecto de su contraparte endurecida indica que el polisacárido correspondiente se insolubilizó. Por tanto, en las paredes celulares de las semillas endurecidas de

los genotipos II-2626 y Bayo Mecentral, el galactano y una fracción de arabinano y otra de homogalacturonano se insolubilizaron, porque sus respectivos azúcares no se detectaron en las pectinas solubles en CDTA o porque su abundancia disminuyó. En frutos inmaduros, donde la pared celular es más rígida que en los maduros, se detectó la presencia de un arabinogalactano insoluble, donde la galactosa se encuentra unida por enlaces  $\beta$ -1-4 formando un polímero lineal, ramificado con arabinosas (Vincken *et al.*, 2003). Este polímero es insoluble en CDTA y se logra solubilizar cuando la pared celular se trata con endopoligalacturonasa (Wakabayashi, 2000), indicando que la molécula de arabinogalactano está atrapada dentro de una malla formada por homogalacturonano o bien que éste forma parte de la molécula de arabinogalactano. Dado que la endopoligalacturonasa se inactiva durante el tratamiento para endurecer el frijol, el resultado de la insolubilización de una fracción de arabinosa y galactano en frijol endurecido respecto del control, se explicaría por la ausencia de esta enzima. En frutos inmaduros, este polímero se encuentra interaccionando con celulosa (Sunil *et al.*, 2003; Redgwell *et al.*, 1997). Si en el caso de la pared celular del frijol en estos cultivares, el arabinogalactano tiene una localización similar, el termo-aflojamiento de la pared celular del frijol durante la cocción sería más difícil de realizar en semillas endurecidas que en los controles. Ya que en el primer caso, queda una fracción de arabinogalactano interaccionando con celulosa. Esta interacción debe ser más fuerte que la establecida en los controles. Pues en frijol endurecido el arabinogalactano es insoluble en CDTA, mientras que en el control sí lo es. Lo anterior explica al menos en parte, porque los tiempos de cocción de los genotipos II-2626 y Bayo

Mecentral requieren mayor tiempo de cocción. Además en estos cultivares, la termosolubilidad de la lamela media de semillas endurecidas también debe estar demorada, pues en el caso del genotipo II-2626 sólo se solubilizó en CDTA el 50 % del ácido urónico y en el Bayo Mecentral, este ácido fue totalmente insoluble. Dado que la lamela media es rica en homogalacturonano, la insolubilización de la mayor parte o de todo el ácido urónico indica la mayor fuerza de interacción de las pectinas en esta subestructura celular y por tanto los mayores tiempos de cocción. Es probable que la xilosa que se insolubiliza en frijol endurecido respecto del control, sea el azúcar que decora al homogalacturonano, como ha sido demostrado para otras especies vegetales (Le Goff *et al.*, 2001).

El contenido y el grado de ramificación con arabinanos del RGI soluble en CDTA del cultivar Flor de Mayo endurecido fueron menores en comparación con los otros genotipos, porque la cantidad de ramnogalacturonano en Flor de Mayo fue 2.43 veces menor que en II-2626 y 3.43 que en Bayo Mecentral y el endurecimiento no modificó la solubilidad de la arabinosa. Este resultado no es sorprendente ya que los polisacáridos que forman las pectinas son diferentes respecto a su peso molecular, composición de monosacáridos, enlaces glicosídicos, grado de ramificación y longitud de cadenas laterales (Willats *et al.*, 2001). Esta heterogeneidad está genéticamente determinada (Liepman *et al.*, 2010) por lo que es de esperarse que la estructura y rigidez de las paredes celulares del cotiledón del frijol de diversos genotipos también sea diferente. Otra diferencia, fue que en el caso de las pectinas solubilizadas con CDTA del cultivar Flor de Mayo se detectó un incremento en la abundancia de galacturónico, mientras que en los dos otros genotipos la insolubilización fue total o parcial. Lo anterior

indica que en el caso del Cultivar Flor de Mayo la interacción de los dominios de homogalacturonano con los otros polisacáridos de la pared celular, fue más laxa que en el caso de los otros dos genotipos.

Las diferencias en la arquitectura de la pared celular de las semillas endurecidas, respecto de las controles se debieron principalmente a que la actividad de las enzimas remodeladoras de la pared celular fueron sensibles a las condiciones de almacenamiento utilizadas para endurecer al frijol. Al disminuir parcial o totalmente la actividad de estas hidrolasas, las pectinas de la pared celular de estas semillas no fueron hidrolizadas, y por tanto su termosolubilidad fue menor que en el caso de los frijoles control. En las cuales durante el remojo se realizó la hidrólisis de pectinas que incrementó su termosolubilidad (Martínez-Manrique, *et al.*, 2011). Dado que la endopoligalacturonasa se inactivó durante el tratamiento para endurecer el frijol, el resultado de la insolubilización de una fracción de arabinosa y galactano en frijol endurecido respecto del control, se explicaría por la ausencia de esta enzima.

#### **5.2.8. CONCLUSIONES**

1. En frijol endurecido la rigidez de la pared celular es mayor que en frijol fresco. A esta mayor rigidez contribuyen el alto peso molecular del ramnogalacturonano I y la insolubilización del galactano y del homogalacturonano.
2. La ineficiencia del remojo para disminuir la rigidez de la pared celular del frijol endurecido se debe, al menos parcialmente, a la menor actividad de pectinasas presentes en éste respecto del control.

### **5.2.9. PERSPECTIVAS**

1. Solubilizar las pectinas de la pared celular de frijol endurecido con diferentes concentraciones de NaOH para detectar cual de los polímeros se une más fuertemente.
2. A los polímeros solubilizados en NaOH cuantificarles su peso molecular y la composición química para determinar la identidad del polímero pectico.
3. Utilizar enzimas pecticas purificadas para solubilizar las pectinas que interaccionan fuertemente con la pared celular y de ser posible identificar el epítope por anticuerpos.

---

## 6. REFERENCIAS

Acosta-Gallegos J. y Pérez H. P. (s.f.). Situación del cultivo de frijol común en México. Producción e investigación. Disponible en: <http://www.campomexicano.gob.mx/portal/siap/Integracion/EstadisticaDerivada/ComercioExterior/Estudios/Perspectivas/Frijol00-05.pdf>.

Adsule, R.; Deshpande, S. y Sathe, S. (2004). La Judía. En: Tratado de ciencia y tecnología de las hortalizas. Salunkhe, K. and Kadam, S. (ed.). Acribia, Zaragoza. España.

Arias R. J.; Rengifo M. T.; Jaramillo C. M. (2007) Buenas Prácticas Agrícolas en la producción de frijol voluble. FAO.

Bewley, J.D. and Black, M. (1994). Seeds, in: *Physiology of Development and Germination*, 2nd edition. Plenum Press, New York, pp. 147–197.

Bernal-Lugo, I.; Prado, G.; Parra, C.; Moreno, E.; Ramírez, J. and Velazco, O. (1990). Phytic acid hydrolysis and bean susceptibility to storage induced hardening. *Journal of Food Biochemistry*. 14:253-261.

Bernal-Lugo, I.; Castillo, A.; Díaz de León, F.; Moreno, E. and Ramírez, J. (1991). Does phytic acid influence cooking rate in common beans?. *Journal of Food Biochemistry*. 15:367-374.

Bernal-Lugo I.; Parra C.; Carballo A. and Hamabata A. (1994) Enzymic systems altered by accelerated aging of seeds. *Plant Physiology*-(Life Science Advances). 13, 287-294.

Bernal-Lugo, I.; Parra, C.; Portilla M.; Peña-Valdivia; Cecilia B. and Moreno E. (1997). Cotyledon thermal behavior and pectic solubility as related to cooking quality in common beans. *Plant food for Human Nutrition*. 50:141-150.

Bernal-Lugo I.; Camacho A. and Carballo A. (2000). Effects of seed ageing on the enzymatic antioxidant system of maize cultivars. en: *Seed Biology Advances and applications*. Eds. Black, M. Bradford and Vazquez-Ramos, J. Cabi Publishing. UK. pp. 151-160.

Bhatty, R.S. (1990). Cooking quality of lentils: The role of structure and composition of cell walls. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 38:376–383.

Blancas, M. V. H. (2001). Estudio de las modificaciones en la pectina que ocurren durante el remojo de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

---

Blumenkratz N and Asboe-Hanson G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acid. *Analytical Biochemistry*. 17:484–489.

Bonilla A. R.; Calzada C.; Cooke R. (1991) Efecto de la cocción tradicional sobre los factores antinutricionales de los frijoles negros (*Phaseolus vulgaris* L.) de Costa Rica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 41: 56-63.

Bressani, R. (1989). Revisión sobre la calidad del grano de frijol. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 39(3):419-441.

Brummell, D.; Dal, C.; Crisosto, C. and Labavitch, J.M. (2004). Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botanic*. 55:2029–2039.

Carpita, N. (1984). Cell wall development in maize coleoptiles. *Plant Physiology*. 76:205–212.

Carpita, N. and McCann, M. (2000). The cell wall, in: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. ed. by Buchanan B., Gruissem W. and Jones R. American Society of Plant Biologists, Maryland, USA. pp. 52–108.

Colprocah. (2009). Manejo de la cosecha y postcosecha de semilla de frijol. Disponible: <http://www.colprocah.com/docsPDF/Secciones/ManejoSemillaFrijol.pdf>

Colonna, P.; Gallant, D. and Mercier, C. (1980). *Pisum sativum* and *Vicia faba* carbohydrates: Studies of fractions obtained after dry and wet protein extraction process. *Journal of Food Science*. 45:1629–1636.

Cosgrove, J.D. (2005). Growth of the plant cell wall. *Natural Review Molecular Cell Biology*. 6:850-861.

Dolan, L.; Linsted, P. and Roberts, K. (1997). Developmental regulation of pectic polysaccharides in the root meristem of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botanic*. 48:713-720.

Dubois, M.; Gilles, K.; Hamilton, J.; Rebers, P. and Smith F. (1956). Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28:350–356.

FAO (1993). D'Antonino F. Oficina regional de la fao para america latina y el caribe. Santiago, Chile. Disponible en: [www.cd3wd.com/CD3WD\\_40/INPHO/VLIBRARY/X0027S/ES/X0027S01.HTM#1](http://www.cd3wd.com/CD3WD_40/INPHO/VLIBRARY/X0027S/ES/X0027S01.HTM#1).  
LOS GRANOS Y SU CALIDAD

Fornos, M. (2009). Frijol, Manejo Postcosecha de la Semilla. Programa de Recursos Genéticos Nicaragüenses, Nicaragua, p. 42-53.

---

Fry, S.C. (1998). *The Growing Plant Cell Wall: Chemical and Metabolic Analysis*. Longman Scientific & Technical, Essex. pp. 118–123.

García, E. and Lajolo, F. (1994). Starch alterations in hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 42:612-615.

García-Vela, L.A. and Stanley, D.W. (1989). Protein denaturation and starch gelatinization in hard-to-cook beans. *Journal of Food Science*. 54:1284-1286.

Geshi, N.; Jørgensen, B.; Scheller, H and Ulvskov, P. (2000). In vitro biosynthesis of 1,4- $\beta$ -galactan attached to rhamnogalacturonan I. *Planta*. 210:622-629.

Gooneratne, J.; Needs, P.W.; Ryden, P. and Selvendran, R. (1994). Structural features of cell wall polysaccharides from the cotyledons of mung bean *Vigna radiata*. *Carbohydrate Research*. 265:61–77.

Gross, K.C. (1982). A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanocetamide. *Horticulture Science*. 17:933–934.

Hagerman, A. and Austin, P.J. (1986). Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methylesterase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 34:440–444.

Hincks, M. and Stanley, D. (1986). Multiple mechanisms of bean hardening. *Journal of Food Science*. 21:731.

Hincks, M. and Stanley, D. (1986). Lignification: evidence for a role in hard-to-cook beans. *Journal of Food Biochemistry*. 11:41-58.

Hohlberg, A.I. and Stanley, D.W. (1987). Hard-to-cook defect in black beans. Protein and starch considerations. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 35:571-576.

Huisman, H.; Fransen, M.; Kamerling, P.; Vliegthart, G.; Schols, A. and Voragen, J. (2001). The CDTA-soluble pectic substances from soybean meal are composed of rhamnogalacturonan and xylogalacturonan but not homogalacturonan. *Biopolymers*. 58:279–294.

Jacinto-Hernández, C.; Hernández S.; H., Azpíroz-Rivero S.; Acosta-Gallegos, J. A. y Bernal-Lugo, I. (2002). Caracterización de una población de líneas endogámicas de frijol común por su calidad de cocción y algunos componentes nutrimentales. *Agrociencia*. 36(4):451-459.

Jacinto-Hernández, C.; Azpiroz-Rivero, S.; Acosta-Gallegos, J. A.; Hernández-Sánchez, H. and Bernal-Lugo, I. (2003). Genetic analysis and random amplified polymorphic DNA markers associated with cooking time in common bean. *Crop Science*. 43:329-332.

---

Jackman, R.L. and Stanley, D.W. (1995). Perspectives in the textural evaluation of plant foods. *Trends in Food Science and Technology*. 6:187-194.

Jackson, G.M. and Varriano-Marston, E. (1981). Hard-to-cook phenomenon in beans: Effects of accelerated storage on water absorption and cooking time. *Journal of Food Science*. 46:799–803.

Kigel, J (1999). Culinary and nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* seeds as affected by environmental factors. *Biotechnology Agronomic Society Environment*. 3(4).

Le Goff, A.; Renard, C.; Bonnin, E. and Thibault, J. (2001). Extraction, purification and characterisation of xylogalacturonans. *Carbohydrate Polymers*. 45: 325-334.

Liepman, A.; Wightman, R.; Geshi, N; Turner, S. And Scheler, H. (2010). Arabidopsis - a powerful model system for plant cell wall research. *The Plant Journal*. 61:1107-1121.

Liu, K.; McWatters, K. and Phillips, D. (1992). Protein insolubilization and thermal destabilization during storage as related to hard-to-cook defect in cowpeas. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 40: 2483-2487.

Liu, K.; Huang, Y. and Phillips, D. (1993a). Mechanism of hard-to-cook defect in cowpeas: verification via microstructure examination. *Food Structure*. 12:51-58

Liu, K.; Phillips, D. and McWatters, K. (1993b). Induced hard-to-cook state in cowpeas by freeze-thawing and calcium chloride soaking. *Cereal Chemistry*. 70: 193.

Liu, K.; Phillips, D. and McWatters, K. (1993c). Mechanism of pectin change during soaking and cooking as related to hard-to-cook defect in cowpeas. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 41(9):1476-1480.

Liu, K. (1995). Cellular, biological and physicochemical basis for the hard-to-cook defect in legume seeds. *Critical Review Food Science Nutrition*. 35:263 – 298.

López, G.J. (1994). Efecto del almacenamiento en las propiedades térmicas de las semillas de frijol. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

Lowry. OH. , N.F. Rosebrough, A.I. Farr and R.J. (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265.

Mafuleka, M.; Ott, D.; Hosfield, G. y Uebersax, M. (1993). The role of Phytase and lignin in decorticated dry bean (*Phaseolus vulgaris*) hardening during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*. 17:1-20.

- 
- Marry, M.; McCann, M.; Kolpak, F.; White, A.R.; Stacey, N. and Roberts, K. (2000). Extraction of pectic polysaccharides from sugar-beet cell walls. *Journal of Science Food and Agriculture*. 80:17-28.
- Martínez-Manrique, E.; Jacinto-Hernández, C.; Garza-García, R.; Campos, A.; Moreno, E. and Bernal-Lugo, I. (2011). Enzymatic changes in pectic polysaccharides related to the beneficial effect of soaking on bean cooking time. *Journal of Science Food and Agriculture*. 91(13):2394-2398.
- Mederoz, Yuliem (2006). Indicadores de la calidad del grano (*Phaseolus vulgaris*). Revisión bibliográfica. *Cultivos tropicales*. 27(3):55-62.
- Moscoso, W.; Bourne, C. and Hood, F. (1984). Relationships between the hard-to-cook phenomenon in red kidney beans and water absorption, puncture force, pectin, phytic acid and minerals. *Journal of Food Science*. 49:1577–1583.
- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of Somogy method for the determination of glucose. *Journal Biological Chemistry*. 153:375–379.
- Ng, A. and Waldron, K. (1997). Effect of cooking and per-cooking on cell wall chemistry in relation to firmness of carrot tissues. *Journal of Science Food and Agriculture*. 73: 503-512.
- Oosterval, A.; Beldman, G. and Voragen, A. (2002). Enzymatic modification of pectic polysaccharides obtained from sugar beet pulp. *Carbohydrate Polymers*. 48:73-81.
- Pérez-Herrera, P.; Esquivel, G.; Rosales, R.; Acosta-Gallegos, J. (2002). Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 52(2):172-180.
- Qi, B; Moore, K. and Orchard, J. (2000). A comparison of two methods and the effect of cooking time on the extractability of pectin from the cell walls of cooking banana. *Lebensm-Wiss-Technol*. 33:369-373.
- Quezada, M. (2005). Relación entre envejecimiento de cotiledones y la disminución de la termosolubilidad de pectinas durante el almacenamiento y remojo de la semilla de frijol. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM.
- Ralet, C.; Crapeau, J.; Mouille, G.; Hafte, H. and Thibault, T. (2008). Reduced number of homogalacturonan domains in pectins of an *Arabidopsis* mutant enhances the flexibility of the polymer. *Biomacromolecules* 9:1454–1460.
- Redgwell, R.; Fisher, M; Kendal, E. and MacRae, E. (1997). Galactose loss and fruit ripening: High-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta*. 203: 174-181.
-

Reyes-Moreno, C. and Paredes-López, O. (1993). Hard to cook phenomenon in common beans. A review. *Critical Review Food Science Nutrition*. 33:227-286.

Rodríguez-Palenzuela P.; García y de Blas J. (s.f.). Fibra soluble y su implicación en nutrición animal: enzimas y probióticos. XIV Curso de Especialización Avances en Nutrición y Alimentación Animal. Dpto. Biotecnología. Dpto. de Producción Animal. Universidad Politécnica de Madrid. España.

Rose, J.; Catalá, C.; González-Carranza, C.; Zinnia, H. and Roberts, J. (2003). Plant Cell wall disassembly, in *The Plant Cell Wall*, ed. by Rose JKC. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 264–324.

SAGARPA (2009). [www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx)

Sefa-Dedeh, S.; Stanley, D.W. and Voisey, P.W. (1978). Effect of soaking time and cooking conditions on texture and microstructure of cowpeas (*Vigna unguiculata*). *Journal of Food Science*. 43:1832-1838.

Sefa-Dedeh, S.; Stanley, D.W. (1979). Textural implications of the microstructure of legumes. *Food Technology*. 33(10):77-83.

Selvendran, R. (1984). The plant cell wall as a source of dietary fiber: Chemistry and structure. *American Journal Clinical Nutrition*. 39:320–337.

Shiga T. M., Lajolo F. M.; Tulia M. C. C. (2004). Changes in the cell wall polysaccharides during storage and hardening of beans. *Food Chemistry*. 84: 1-12.

Shiga, T.M. and Lajolo, F. (2006). Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris L.*) composition and structure. *Carbohydrate Polymers*. 63:1-12.

SIAP. (2009). Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. Producción nacional. Disponible en: [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx)

Sievwright C. A.; Shipe W. F.; (1986). Effect of storage conditions and chemical treatments on firmness, *in vitro* protein digestibility, condensed tannins, phytic acid and divalent cations of cooked black peas (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Food Science*. 51(4):982-987.

Sørensen S.; Pauly M.; Bush M.; Skjøt M.; McCann M.C.; Borkhardt B. (2000). Pectin engineering: Modification of potato pectin by *in vivo* expression of an endo-1,4- $\beta$ -D-galactanase. *Proceeding National Academy of Science*. USA. 97:7639–7644.

---

Soriano, L. M. (2004). Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos. Aislamiento y caracterización de las pectinasas PelA de *Paenibacillum sp.* BP-23 e YvpA de *Bacillus subtilis*. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona.

Stanley, D.W and Aguilera, J.M. (1985). A review of textural defects in cooked reconstituted legumes – the influence of structure and composition. *Journal of Food Biochemistry*. 9:277-323.

Sunil R.; Melton, L. and Hurst, P. (2003). Influence of cultivar, cooking, and storage on cell-wall polysaccharide composition of winter squash (*Cucurbita maxima*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51:1904-1913.

Tintor, I. (2011). Cuantificación de la actividad de peroxidas, ácido ferúlico y lignina en pared celular de frijol durante su endurecimiento. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

Ulvskov, P.; Wium, H.; Bruce, D.; Jørgensen, B.; Bruun, Q.K.; Skjøt, M.; Hepworth, D.; Borkhardt, B. and Sørensen, S.O. (2005). Biophysical consequences of remodeling the neutral side chains of rhamnogalacturonan I tubers of transgenic potatoes. *Planta*. 220:609-620.

Valle V. P., Lucas F. B. (2000). Toxicología de alimentos. Instituto Nacional de Salud Pública, México, p 64-72, 93.

Vargas-Torres A., Osorio-Díaz P., Agama-Acevedo E., Morales-Franco L., Bello-Pérez L.A. (2006). Digestibilidad del almidón en diferentes variedades del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *INCI*. 31 (12): 881-884.

Vincken, JP.; Schols, H.; Oomen, R.; McCann, M.; Ulvskov, P.; Voragen, A. and Visser, R. (2003). If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology*. 132:1781-1789.

Wakabayashi, K. (2000). Changes in cell wall polysaccharides during fruit ripening. *Journal Plant Research*. 113:231-237

Waldron, K.W.; Smith, A.C.; Parr, A.; Ng, A. and Parker, M.L. (1997). New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture. *Trends in Food Science & Technology*. 8:213-221.

Waldron K.W.; Parker M.L. and Smith A.C. (2003). Plant cell walls and food quality. *Compendia Review of Food Science*. 2:101–129.

Willats, W.; McCartney, L.; Mackie, W. and Knox, P. (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*. 47: 9-27.

## 7. ANEXOS

## ANEXO 1.

TABLA 13. Composición de azúcares de la fracción de pectinas extraídas de frijoles frescos secos y remojados.

AZÚCARES	µg azúcar / mg pectin					
	AG	RAM	XIL	ARA	GLU	GAL
<b>VARIEDADES</b>						
<sup>3</sup> FMs <sup>1</sup>	136 <sup>a*</sup>	139 <sup>a</sup>	244 <sup>a</sup>	409 <sup>a</sup>	ND	73 <sup>a</sup>
FMr <sup>2</sup>	124 <sup>a</sup>	34 <sup>b</sup>	222 <sup>a</sup>	374 <sup>a</sup>	16	230 <sup>b</sup>
<sup>4</sup> BM <sub>s</sub>	204 <sup>a</sup>	103 <sup>a</sup>	282 <sup>a</sup>	372 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	29 <sup>a</sup>
BM <sub>r</sub>	179 <sup>b</sup>	43 <sup>b</sup>	135 <sup>b</sup>	354 <sup>a</sup>	12 <sup>b</sup>	277 <sup>b</sup>
II-2626 <sub>s</sub>	205 <sup>a</sup>	74 <sup>a</sup>	251 <sup>a</sup>	422 <sup>a</sup>	43	5 <sup>a</sup>
II-2626 <sub>r</sub>	238 <sup>b</sup>	43 <sup>b</sup>	241 <sup>a</sup>	310 <sup>b</sup>	ND	165 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>secos; <sup>2</sup>remojados; <sup>3</sup>Flor de mayo; <sup>4</sup>Bayo Mecentral. ND, no detectado

\*Los promedios entre tratamientos para cada genotipo son diferentes significativamente ( $p \leq 0.05$ ) si tienen diferentes letras.

TABLA 14. Composición química de pectina aislada de frijoles remojados control y endurecidos.

GENOTIPO	LOTE	AZÚCARES (µg /mg de pectina)				
		AU	RAM	XIL	ARA	GAL
II-2626	Control	238 <sup>a</sup>	43.0 <sup>a</sup>	241 <sup>a</sup>	310 <sup>a</sup>	165
	Endurecido	319 <sup>b</sup>	216.5 <sup>b</sup>	225 <sup>b</sup>	239 <sup>b</sup>	ND
BM <sup>1</sup>	Control	179 <sup>a</sup>	43.0 <sup>a</sup>	135 <sup>a</sup>	354 <sup>a</sup>	277
	Endurecido	311 <sup>b</sup>	299.7 <sup>b</sup>	124 <sup>b</sup>	234 <sup>b</sup>	ND
FM <sup>2</sup>	Control	124 <sup>a*</sup>	34.0 <sup>a</sup>	222 <sup>a</sup>	374 <sup>a</sup>	230
	Endurecido	304 <sup>b</sup>	88.8 <sup>b</sup>	188 <sup>b</sup>	418 <sup>a</sup>	ND

<sup>1</sup> Bayo Mecentral, <sup>2</sup> Flor de Mayo. ND, No detectado. \*Los valores promedio son significativamente diferentes entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ) si tienen diferentes letras.

# Enzymatic changes in pectic polysaccharides related to the beneficial effect of soaking on bean cooking time

Enrique Martínez-Manrique,<sup>a,c</sup> Carmen Jacinto-Hernández,<sup>b</sup> Ramón Garza-García,<sup>b</sup> Albino Campos,<sup>b</sup> Ernesto Moreno<sup>c</sup> and Irma Bernal-Lugo<sup>a\*</sup>

## Abstract

**BACKGROUND:** Cooking time decreases when beans are soaked first. However, the molecular basis of this decrease remains unclear. To determine the mechanisms involved, changes in both pectic polysaccharides and cell wall enzymes were monitored during soaking. Two cultivars and one breeding line were studied.

**RESULTS:** Soaking increased the activity of the cell wall enzymes rhamnogalacturonase, galactanase and polygalacturonase. Their activity in the cell wall was detected as changes in chemical composition of pectic polysaccharides. Rhamnose content decreased but galactose and uronic acid contents increased in the polysaccharides of soaked beans. A decrease in the average molecular weight of the pectin fraction was induced during soaking. The decrease in rhamnose and the polygalacturonase activity were associated ( $r = 0.933$ ,  $P = 0.01$ , and  $r = 0.725$ ,  $P = 0.01$ , respectively) with shorter cooking time after soaking.

**CONCLUSION:** Pectic cell wall enzymes are responsible for the changes in rhamnogalacturonan I and polygalacturonan induced during soaking and constitute the biochemical factors that give bean cell walls new polysaccharide arrangements. Rhamnogalacturonan I is dispersed throughout the entire cell wall and interacts with cellulose and hemicellulose fibres, resulting in a higher rate of pectic polysaccharide thermosolubility and, therefore, a shorter cooking time.

© 2011 Society of Chemical Industry

**Keywords:** bean soaking; cooking time; cell wall enzymes; pectin; rhamnogalacturonan; *Phaseolus vulgaris* L.

## INTRODUCTION

Cooking time is the most important commercial quality characteristic of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) since consumers prefer bean varieties with short cooking times. The soaking of beans in water prior to cooking is a common practice that softens the seed of most cultivars and, therefore, reduces cooking time. It has been shown that softening and textural changes occur during the cooking of soaked beans.<sup>1,2</sup> However, the molecular basis of the changes that occur during soaking that improve cooking time has not been established.

At the molecular level, textural changes of soaked beans are mostly related to polygalacturonan, one of the pectic polysaccharides in the middle lamellar area between adjacent cells.<sup>3,4</sup>

It was recently reported that the pectin in common beans is composed of xylogalacturonans, rhamnogalacturonans, ramified arabinans, and galactans.<sup>5</sup> These polymeric molecules are most likely modified during soaking since hydrating beans activates different cell wall polysaccharidases<sup>6–8</sup> such as rhamnogalacturonase, polygalacturonase, pectin-methyl-esterase, and galactanase. Our hypothesis was that these cell wall enzymes have profound effects on the structure of all the polysaccharides that make up bean pectin and contribute to the loss of cell wall rigidity. Although this phenomenon has been observed in other systems,<sup>7–9</sup> the

mechanism in beans is not yet precisely understood. For this reason, this work was conducted to identify the structural changes in cell wall pectic polysaccharides related to bean enzymatic activity within the cell wall during soaking and, therefore, to explain why soaking reduces cooking time.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

Two cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), cv. Bayo Mecentral and cv. Flor de Mayo M-38, and an breeding line, II-2626, were used. These materials were selected after a preliminary screening of bean genotypes in which cooking

\* Correspondence to: Irma Bernal-Lugo, Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM., México D. F. 04510, Mexico.  
E-mail: irmofel@servidor.unam.mx

a Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM. México D. F. 04510, Mexico

b CEVAMEX-INIFAP, Apdo.10-56230, Chapingo, Estado de México, Mexico

c Unidad de Granos y Semillas, FES Cuautitlan, UNAM. Cuautitlan Izcalli, Estado de México, Mexico

time was measured before and after soaking. Soaking of the selected genotypes revealed three different levels of cooking time reduction. Genotypes were sown in the spring of 2004 in St Lucia at the INIFAP Valle de Mexico Experimental Station located at 19° 29' N, 98° 53' W, and 2240 m above sea level. Seeds of the three materials were stored at 4 °C and 40% relative humidity until use.

### Evaluation of cooking time

Beans that were either dry or soaked for 12 h in distilled water (1 : 5 w/v) were positioned in a cylindrical well of a 25-well Mattson pin-drop cooker.<sup>10</sup> The piercing tip of a 200-g rod was placed in contact with the surface of each bean. Cooking time was calculated as the time that elapsed from the start of cooking until 50% of the pins of the instrument had dropped and penetrated the seeds in the cooker. Data were taken for triplicate samples.

### Pectin extraction

Cotyledon flour (50 g) was extracted using 80% ethanol (500 mL) for 2 h at ebullition. The extract was centrifuged at  $1000 \times g$  for 10 min, and the pellet was washed three times with 500 mL of 75% ethanol to remove all soluble sugars. The pellet was then washed with absolute ethanol and vacuum-dried at room temperature to a constant weight. The alcohol-insoluble solids were stored in a desiccator until further extraction. The alcohol-insoluble solids (2 g) were extracted four times over 2 h with 100 mL of 0.05 mol L<sup>-1</sup> cyclohexanediaminetetraacetate (pH 8.0) at 25 °C. Extracts were combined, dialyzed against distilled water, and precipitated with ethanol (three volumes), resulting in the pectin fraction.

### Gel permeation chromatography

The pectin fraction (5.0 mg) was dissolved in 0.05 mol L<sup>-1</sup> ammonium acetate (pH 5.2), chromatographed in a Sephacryl S-400 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) column (50 × 1.5 cm), and eluted with the same solution at a flow rate of 10 mL h<sup>-1</sup>. Two-milliliter fractions were collected. The amounts of total sugars and uronic acid were determined in each fraction by using the phenol sulfuric acid<sup>11</sup> and *m*-phenyl phenol<sup>12</sup> methods, respectively. The column elution profile was calibrated with dextran standards 2000 kDa, 500 kDa, 73 kDa and 7 kDa at a flow rate of 10 mL h<sup>-1</sup>.

Although the type of uronic acid was not determined in this study, reports have indicated that galacturonic acid is the predominant uronic acid in bean cotyledons.<sup>5</sup> As a result, we suspected that galacturonic acid was a type of uronic acid.

### Sugar composition

The sugar composition was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). For mobile phase delivery, we used a Waters 510 pump with a manual Rheodyne injection valve (ICS R77251; Waters, Mexico, D.F., Mexico). This was connected to a 4.6 × 250 mm analytical carbohydrate column packed with 4 µm of NOVA-PACK spherical silica bonded with trifunctional aminopropylsilane (Waters). Elution was carried out with an isocratic mobile phase system consisting of a mixture of acetonitrile and water (80 : 20, v/v) at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. The mobile phase was degassed and filtered using hydrophilic polypropylene membrane filters (47 mm, 0.22 µm; Millipore, Billerica, MA, USA). Sugar was detected using a Waters 2414 Refractive Index Detector. Chromatographic data collection and integration were performed using Breeze software 3.0 (Waters). To quantify the different sugars, we used the straight-line equation

**Table 1.** Cooking time,  $T_{50}$  (minutes) of two common bean cultivars and one breeding line, unsoaked and soaked prior to cooking

Genotype	Unsoaked	Soaked
Flor de Mayo M38	126 <sup>a</sup>	38 <sup>a</sup>
Bayo Mecentral	97 <sup>b</sup>	41 <sup>a</sup>
II-2626	96 <sup>b</sup>	61 <sup>b</sup>

Data for cooking time in the same column with the same superscript letter are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

resulting from the calibration curve of the peak areas obtained for the different sugars. Before HPLC analysis, pectin samples were hydrolysed with 2 mol L<sup>-1</sup> trifluoroacetic acid, which was eliminated by evaporation under a stream of nitrogen.<sup>13</sup>

### Enzyme extraction

Cotyledon flour (1g) was homogenized in 15 mL of 0.05 mol L<sup>-1</sup> sodium acetate buffer (pH 5.5) containing 1.0 mol L<sup>-1</sup> NaCl and stirred for 1.5 h at 4 °C. The homogenate was centrifuged at  $5000 \times g$  at 4 °C for 10 min. The pellet was discarded and the supernatant was dialyzed for 1 h three times against 4 L of 0.05 mol L<sup>-1</sup> sodium acetate buffer (pH 5.5) at 4 °C. The dialyzed extract was centrifuged at  $10\,000 \times g$  at 4 °C for 10 min. The resulting supernatant comprised the enzyme solution used in the enzyme activity assays for all substrates.

### Enzyme activity

The polysaccharidases assayed were polygalacturonase, pectin methyl esterase, rhamnogalacturonase, and galactanase. The reaction mixture contained 0.75 mL of 0.065 mol L<sup>-1</sup> Sodium acetate (pH 5.5), 0.25 mL 10 g kg<sup>-1</sup> substrate, and 0.05 mL enzyme solution. The reaction mixture was incubated at 30 °C for 0.5 h, and each reaction was terminated by boiling the reaction mixture for 10 min except in the case of pectin methyl esterase. Hydrolytic enzyme activity was determined by measuring the release of reducing sugars using the Nelson–Somogy method,<sup>14</sup> where rhamnogalacturonan from soybean (megazyme) or arabinogalactan from larchwood (Sigma, Toluca, Mexico) was used as the substrate. When the substrate was polygalacturonic acid (Sigma), activity was determined using 2-cyanoacetamide.<sup>15</sup> Finally, when citrus-esterified pectin (Sigma) was the substrate, the released methanol was measured using bromothymol blue by a continuous spectrophotometric method.<sup>16</sup> All enzymatic assays were conducted at 30 °C. Boiled enzyme controls were used in all of the assays. Enzyme activity was expressed as specific activity.

### Statistical analyses

Three independent experiments with three replicates each were performed. Data were assessed using the analysis of variance (ANOVA) and least significant difference (MSD) tests. Where appropriate, correlation (Pearson) coefficients were calculated using Statistix 8.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA).

## RESULTS AND DISCUSSION

The beneficial effect of soaking beans in water prior to cooking is shown in Table 1. As expected, cooking time was shorter for soaked beans than for dry beans, but the magnitude (unsoaked/soaked)

**Table 2.** Sugar composition of pectin extracted from unsoaked and soaked seeds of common beans

Genotype	Treatment	GalA	Rha	Xyl	Ara	Glc	Gal
Flor de Mayo M-38	Unsoaked	136 <sup>a</sup>	139 <sup>a</sup>	244 <sup>a</sup>	409 <sup>a</sup>	ND	73 <sup>a</sup>
	Soaked	124 <sup>a</sup>	34 <sup>b</sup>	222 <sup>a</sup>	374 <sup>a</sup>	16	230 <sup>b</sup>
Bayo Mecentral	Unsoaked	204 <sup>a</sup>	103 <sup>a</sup>	282 <sup>a</sup>	372 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	29 <sup>a</sup>
	Soaked	179 <sup>b</sup>	43 <sup>b</sup>	135 <sup>b</sup>	354 <sup>a</sup>	12 <sup>b</sup>	277 <sup>b</sup>
II-2626	Unsoaked	205 <sup>a</sup>	74 <sup>a</sup>	251 <sup>a</sup>	422 <sup>a</sup>	43	5 <sup>a</sup>
	Soaked	238 <sup>b</sup>	43 <sup>b</sup>	241 <sup>a</sup>	310 <sup>b</sup>	ND	165 <sup>b</sup>

Results for pectin composition are given as  $\mu\text{g}$  sugar  $\text{mg}^{-1}$  pectin. Mean values of three independent determinations. Data with the same superscript letter are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ). ND, not detected; GalA, galacturonic acid; Rha, rhamnose; Xyl, xylose; Ara, arabinose; Glc, glucose; Gal, galactose.

**Table 3.** Estimated nmol amount of galacturonic acid (GalA) as polygalacturonan (PG) in bean pectin<sup>a</sup> extracted from unsoaked and soaked seeds of common beans

Genotype	Treatment	Total GalA (nmol)	Total Rha (nmol)	PG (GalA – Rha) (nmol)
Flor de Mayo M38	Unsoaked	707	840	ND
	Soaked	639	200	439
Bayo Mecentral	Unsoaked	1050	628	422
	Soaked	922	262	660
II-2626	Unsoaked	1060	450	606
	Soaked	1220	260	960

<sup>a</sup> Calculated from data in Table 2. ND, not detected; Rha, rhamnose.

of this decrease varied among genotypes, being greater for Flor de Mayo M38 (3.3) than for Bayo Mecentral (2.4), while the breeding line II-2626 (1.6) benefited the least by soaking. Since bean cell wall structural features are related to cooking time<sup>1,2</sup> these results must be associated with differences in the extent of soaking-induced modifications in the cell wall polysaccharide cross-linking pattern of each genotype.

In order to determine the mechanism by which soaking results in decreased cooking time, it was necessary to determine how the chemical composition and extractability of the polysaccharides present in the pectin fraction of unsoaked dry beans differed from those found in soaked beans. The ease of extraction has been used to detect differences in cell wall polysaccharide cross-linking.<sup>17</sup> Thus, a change in extractability reflects changes in structural properties, while chemical changes indicate enzymatic action.<sup>8</sup>

We found galacturonic acid and different types and contents of neutral sugars in the isolated pectin fraction (Table 2) of unsoaked dry beans of all cultivars. Since the chemical composition of pectin indicates the type of polysaccharides that are present in the fraction,<sup>5</sup> we inferred that the pectic polysaccharides extracted from the cotyledons of unsoaked beans were mainly composed of the neutral polymers arabinans and xylanans. In the extracted pectin, the arabinose content was 37–42%, and the xylose content was 24–28%. There was a moderate amount of acidic pectins, considering that galacturonic acid content was 13–20% (Table 2). These acidic polymers contain rhamnose (7.4–13.9%) and minute amounts of galactose (0.05–0.73%). The presence of rhamnose indicates that, in these Mexican genotypes, as in carioca beans,<sup>5</sup> the acidic pectin contains regions of ramified rhamnagalacturonans in addition to polygalacturonan (Table 3), as has been reported for other dicotyledonous seeds.<sup>18–21</sup> These polysaccharides are part of a more complex structure called rhamnagalacturonan I (RGI), which is composed of a backbone of alternating glycosidically linked rhamnose and galacturonic acid residues. Side chains consisting of arabinogalactans or arabinans and/or galactans and xylans are then attached to the rhamnose residues of the RGI backbone.<sup>4</sup>

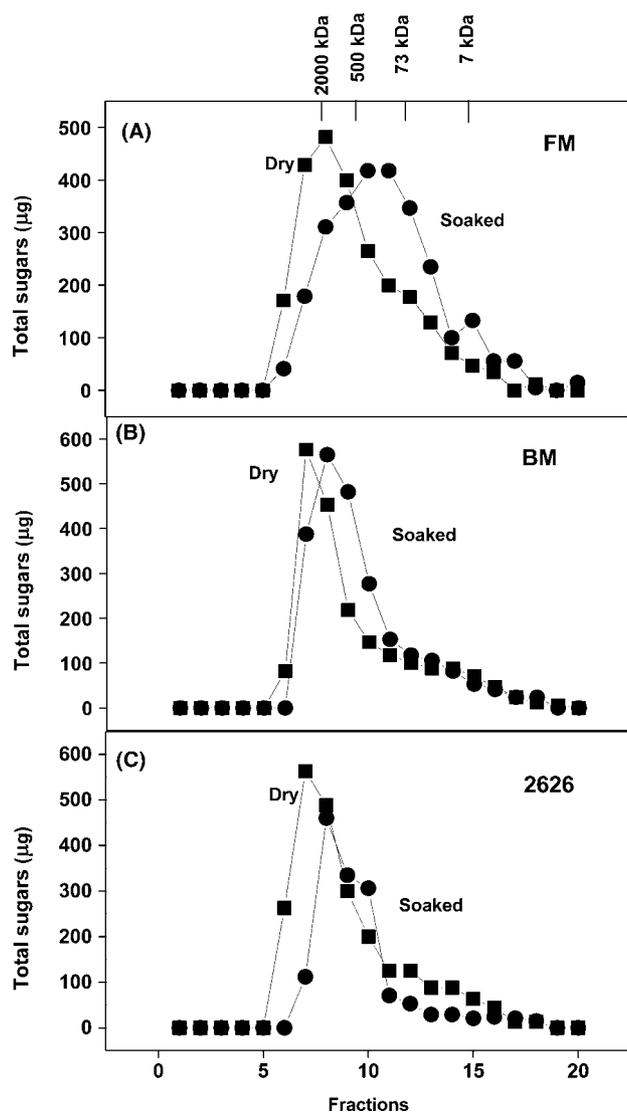
On the other hand, the soaked beans contained pectic polysaccharides whose chemical compositions differed importantly from those extracted from unsoaked dry beans (Table 2). In the three genotypes, the pectic polysaccharides extracted from soaked seeds were richer in galactose (16–23%) and polygalacturonan (Table 3) and lower in rhamnose (3.4–4.3%) than the unsoaked seeds.

Flor de Mayo M38, the cultivar whose cooking time benefited most from soaking (Table 1), showed the largest decrease in rhamnose (Table 2). There was a positive correlation between rhamnose content and cooking time ( $r = 0.933$ ,  $P = 0.01$ ) in unsoaked and soaked beans. That is, hydrolysis of the main RGI chain constitutes one of the molecular changes that improve cooking time after soaking. Further evidence of this was found in the average molecular weight of pectic polysaccharides, which was lower in those extracted from soaked beans (Fig. 1).

Another change observed in polysaccharide composition was an increase in the galactose portion of the pectin fraction extracted from soaked beans relative to unsoaked beans (Table 2). This suggests that soaking decreases the strength with which the RGI galactan side chains interact with other polysaccharides. Studies have reported that the ease with which cell wall polysaccharides are extracted and the decrease in their molecular weight are related to differences in polysaccharides cross-linking.<sup>17</sup> In primary cell walls of the potato, it has been reported that on hydrolysis of RGI within the cell wall, loss of cell wall rigidity occurs to such a degree that galactan can be extracted even when it is located next to the plasma membrane.<sup>22</sup> Therefore, hydrolysis of the RGI main chain during soaking, as seen above, will modify the structural organisation of the entire cell wall and the galactan will be solubilised as a result.

The xylose and arabinose contents were also modified, although to a lesser degree. In the Bayo Mecentral, soaking decreased the xylose content by 53%, whereas in the breeding line II-2626, it decreased the arabinose content by 24% (Table 2). These particular changes did not seem to be important for induction of the beneficial effects of soaking since soaking caused greater differences in cooking time in the other genotypes without changing the contents of these sugars.

The polygalacturonan region has been studied in cooked beans, and it has been shown that its rate of thermosolubility determines cooking time (i.e. those with a higher rate cook more quickly).<sup>23</sup> However, it has not been assessed in soaked beans before cooking. In order to determine the role of this polymer in the mechanism involved in bean soaking, we calculated the fraction of total galacturonic acid (Table 2) that originates from polygalacturonan. We assumed that the molar fraction of galacturonic acid forming part of the RGI backbone must be equivalent to the amount of rhamnose present in the pectin fraction since the RGI backbone is formed by polymerisation of the dimer  $\alpha$ -(1 → 2)-L-rhamnosyl- $\alpha$ -(1 → 4)galacturonyl<sup>4</sup> and the rest of the detected galacturonic acid comprises the polygalacturonan fraction. In Table 3, the



**Figure 1.** Molecular mass profiles of CDTA-soluble pectins in eluate column of unsoaked (■) and soaked (●). (A) Flor de Mayo M38; (B) Bayo Mecentral; (C) Il-2626. Tick marks at the top of each graph indicate elution positions of the standard dextrans. CDTA, cyclohexanediaminetetraacetate.

content of rhamnose and total galacturonic acid determined in the pectin fraction is expressed in nanomoles, and the calculated amount of galacturonic acid originating from polygalacturonan is shown. It has been shown in *in vitro* systems in hydrated pectin, the content of homogalacturonan, which is arranged in discrete domains, influences the flexibility of these polymers.<sup>24</sup> Therefore, the pectin molecules in soaked bean seeds had different degrees of flexibility since the amount of galacturonic acid detected was higher for the breeding line Il-2626 and lower for the cultivar Flor de Mayo M38 (Table 3). The higher amount of galacturonic acid (nmoles) detected in the pectin extracted from soaked seeds (Table 3) may be explained by the change in polysaccharide cross-linking pattern, making pectin more readily extractable. These changes contribute to the loss of cell wall rigidity, a decrease in intercellular adhesion and, therefore, to shorter bean cooking time.

We assumed that the cell wall enzymes are active and shape polysaccharides in soaked beans because of the presence of

**Table 4.** Polygalacturonase and pectin methylesterase activity in cell walls of unsoaked and soaked seeds of common beans

Genotype	Polygalacturonase (U) <sup>†</sup>		Pectin methylesterase (U) <sup>‡</sup>	
	Unsoaked	Soaked	Unsoaked	Soaked
Flor de Mayo M38	4.1 <sup>a</sup>	9.6 <sup>b</sup>	8.0 <sup>a</sup>	8.0 <sup>a</sup>
Bayo Mecentral	4.0 <sup>a</sup>	7.2 <sup>b</sup>	2.0 <sup>a</sup>	2.0 <sup>a</sup>
Il-2626	2.2 <sup>a</sup>	5.0 <sup>b</sup>	17.0 <sup>a</sup>	27.0 <sup>a</sup>

For each cell wall enzyme, means in the same row followed by the same superscript letter are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>†</sup> nmol of GA min<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>.

<sup>‡</sup> nmol of methanol min<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>.

**Table 5.** Rhamnogalacturonase and galactanase activity in cell walls of unsoaked and soaked seeds of common beans

Genotype	Rhamnogalacturonase <sup>†</sup>		Galactanase <sup>†</sup>	
	Unsoaked	Soaked	Unsoaked	Soaked
Flor de Mayo	65.3 ± 3.1 <sup>a</sup>	137.7 ± 4.1 <sup>a</sup>	76.0 ± 2.1 <sup>a</sup>	143.5 ± 10.1 <sup>a</sup>
Bayo Mecentral	94.3 ± 5.4 <sup>b</sup>	134.6 ± 5.8 <sup>a</sup>	78.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	133.9 ± 8.7 <sup>a</sup>
Il-2626	119.5 ± 9.4 <sup>c</sup>	186.0 ± 9.4 <sup>b</sup>	107.7 ± 6.8 <sup>b</sup>	184.9 ± 6.9 <sup>b</sup>

Data in each cell wall enzyme represent the mean ± standard deviation. Mean in the same column with the same superscript letter are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>†</sup> Results are given as mg of reducing sugars mg protein<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

water, as in growing plant tissues<sup>25</sup> and during fruit ripening.<sup>8</sup> Changes in the molecular weight and solubility of cell wall polysaccharides are due to enzyme activity within the cell wall that remodels its various strata.<sup>8</sup> Hence, we proceeded to quantify the activity of various enzymes involved in pectin metabolism (Table 4 and Table 5). We detected the activity of the following polysaccharidases: rhamnogalacturonase, galactanase, homogalacturonase, and pectin methylesterase (PME). In the bean cultivars Flor de Mayo M38 and Bayo Mecentral, the assayed enzymes in the control seeds were active and, as expected, the soaking treatment increased their activity. However, in unsoaked seeds, PME activity was notably higher in the breeding line Il-2626 than in Flor de Mayo M38 or Bayo Mecentral. Although there was no difference in PME activity between soaked and unsoaked Flor de Mayo M38 and Bayo Mecentral seeds, it was significantly higher in soaked breeding line seeds than in the unsoaked ones. This is probably related to its genetic makeup, which is associated with high galacturonic acid content, a polymer secreted in methylated form.<sup>26</sup>

We inferred that the changes described in bean RGI structure and the increase in polygalacturonan and galactan extractability must be enzymatic in nature because the soaking was performed at room temperature, which is not warm enough for chemical hydrolysis of the glycosidic bonds that characterize cell wall polysaccharides. The reduced average molecular weight of the pectin fraction is further evidence supporting the idea that enzymatic activity within the cell wall hydrolyses the main RGI chain (Fig. 1). The increase in galactan and polygalacturonan extractability could be a result of galactanase and polygalacturonase activity or of loosening of the entire cell wall caused by enzymatic hydrolysis of the main RGI chain. Since there was a high

correlation between rhamnogalacturonase activity and cooking time ( $r = -0.91$ ,  $P = 0.01$ ) and polygalacturonase activity with decreased cooking time by soaking ( $r = 0.725$ ,  $P = 0.01$ ), we concluded that these enzymes are responsible for the increase in polygalacturonan extractability and the decrease in rhamnose content.

The above results can be integrated into a model. The characteristics of the pectins that affect cell wall rigidity are reflected in cooking time. The cooking of unsoaked beans begins with a dry seed with very rigid cell walls. Cell wall enzymes are inactivated by heat and unable to modify their polysaccharides. Therefore, cooking time will depend on the original chemical composition of the pectins. In contrast, in soaked bean seeds, cooking starts with hydrated seeds whose pectic polysaccharides are of lower molecular weight and are flexible since they were enzymatically modified during soaking. Therefore, when soaked beans are cooked, the solubilization of pectins, which causes cell separation, requires less thermal energy; thus, cooking time is shorter for soaked beans than for unsoaked beans.

Identification of the chemical composition of and the mechanisms involved in the structural changes of pectin polysaccharides during soaking will facilitate the development of processing methods aimed at shortening cooking time even, for example, when it is not genetically inherent in the bean seed. This information could also be useful in selecting short-cooking-time genotypes for breeding programs.

## CONCLUSION

The soaking of beans decreases cooking time by promoting the following events: (1) activation of cell wall enzymes, (2) decrease in the degree of polymerization of the main RGI chain, and (3) increase in polygalacturonan and galactan solubility. These changes result in a new polysaccharide arrangement in the cell wall, which is reflected in a higher rate of pectic polysaccharide thermosolubility and, therefore, shorter cooking time.

## REFERENCES

- Liu K, Cellular, biological and physicochemical basis for the hard-to-cook defect in legume seeds. *Crit Rev Food Sci Nutr* **35**:263–298 (1995).
- Reyes-Moreno C and Paredes-Lopez O, Hard to cook phenomenon in common beans – A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **33**:227–286 (1993).
- Selvendran RR, The plant cell wall as a source of dietary fiber: Chemistry and structure. *Am J Clin Nutr* **39**:320–337 (1984).
- Carpita N and McCann M, The cell wall, in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, ed. by Buchanan B, Gruissem W and Jones R. American Society of Plant Biologists, Maryland, pp. 52–108 (2000).
- Shiga TM and Lajoul FM, Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) composition and structure. *Carbohydr Polym* **63**:1–12 (2006).
- Bewley JD and Black M, Seeds, in *Physiology of Development and Germination*, 2nd edition. Plenum Press, New York, pp. 147–197 (1994).
- Rose JKC, Catalá C, Gonzalez-Carranza C, Zinnia H and Roberts JA, Plant Cell wall disassembly, in *The Plant Cell Wall*, ed. by Rose JKC. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 264–324 (2003).
- Brummell DA, Dal CV, Crisosto CH and Labavitch JM, Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *J Exp Bot* **55**:2029–2039 (2004).
- Waldron KW, Parker ML and Smith AC, Plant cell walls and food quality. *Comp Rev Food Sci F* **2**:101–129 (2003).
- Jackson GM and Varriano-Marston E, Hard-to-cook phenomenon in beans: Effects of accelerated storage on water absorption and cooking time. *J Food Sci* **46**:799–803 (1981).
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F, Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal Chem* **28**:350–356 (1956).
- Blumenkratz N and Asboe-Hanson G, New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal Biochem* **17**:484–489 (1973).
- Fry SC, *The Growing Plant Cell Wall: Chemical and Metabolic Analysis*. Longman Scientific & Technical, Essex, pp. 118–123 (1998).
- Nelson N, A photometric adaptation of Somogy method for the determination of glucose. *J Biol Chem* **153**:375–379 (1944).
- Gross KC, A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanocetamide. *Hort Sci* **17**:933–934 (1982).
- Hagerman AE and Austin PJ, Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methylesterase. *J Agric Food Chem* **34**:440–444 (1986).
- Carpita NC, Cell wall development in maize coleoptiles. *Plant Physiol* **76**:205–212 (1984).
- Colonna P, Gallant D and Mercier C, *Pisum sativum* and *Vicia faba* carbohydrates: Studies of fractions obtained after dry and wet protein extraction process. *J Food Sci* **45**:1629–1636 (1980).
- Bhatty RS, Cooking quality of lentils: The role of structure and composition of cell walls. *J Agric Food Chem* **38**:376–383 (1990).
- Gooneratne J, Needs PW, Ryden P and Selvendran RR, Structural features of cell wall polysaccharides from the cotyledons of mung bean *Vigna radiata*. *Carbohydr Res* **265**:61–77 (1994).
- Huisman MMH, Fransen CTM, Kamerling JP, Vliegenthart JFG, Schols HA and Voragen AGJ, The CDTA-soluble pectic substances from soybean meal are composed of rhamnogalacturonan and xylogalacturonan but not homogalacturonan. *Biopolymers* **58**:279–294 (2001).
- Sørensen S, Pauly M, Bush M, Skjøt M, McCann MC, Borkhardt B, et al, Pectin engineering: Modification of potato pectin by *in vivo* expression of an endo-1,4- $\beta$ -D-galactanase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:7639–7644 (2000).
- Moscoco W, Bourne MC and Hood LF, Relationships between the hard-to-cook phenomenon in red kidney beans and water absorption, puncture force, pectin, phytic acid and minerals. *J Food Sci* **49**:1577–1583 (1984).
- Ralet MC, Crapeau LJ, Mouille G, Hafte H and Thibault JT, Reduced number of homogalacturonan domains in pectins of an arabidopsis mutant enhances the flexibility of the polymer. *Biomacromolecules* **9**:1454–1460 (2008).
- Cosgrove JD, Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:850–861 (2005).
- Dolan L, Linstead P and Roberts K, Developmental regulation of pectic polysaccharides in the root meristem of Arabidopsis. *J Exp Bot* **48**:713–720 (1997).