

2458



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**RELACION ENTRE EL GRADO DE METILACION DE
LA PECTINA Y EL TIEMPO DE COCCION EN
ALGUNAS VARIIDADES DE FRIJOL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

FERNANDO DIAZ DE LEON SANCHEZ

FALLA DE CR.GEN

MEXICO, D. F.

1989



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 está 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.

INDICE

0 RESUMEN	1
I INTRODUCCION Y ANTECEDENTES	
1.1 CARACTERISTICAS DE LAS LEGUMINOSAS	3
1.1.1 ESTRUCTURA DEL GRANO	4
1.2 IMPORTANCIA DE LAS LEGUMINOSAS	5
1.3 PROCESO DE COCCION	10
1.4 FENOMENO DEL ENDURECIMIENTO	11
II OBJETIVOS	20
III MATERIAL Y METODOS	
3.1 REACTIVOS	21
3.2 EQUIPO	21
3.3 MATERIAL BIOLÓGICO	22
3.3.1 CARACTERISTICAS DEL MATERIAL BIOLÓGICO ...	22
3.4 DETERIORO DEL GRANO	23
3.5 DETERMINACION DEL TIEMPO DE COCCION DEL GRANO ...	23
3.6 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO	25
3.6.1 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DE EQUILIBRIO CON LA HUMEDAD RELATIVA 75 %..	25
3.7 OBTENCION DE HARINA DE FRIJOL	27
3.8 ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PECTINMETILESTERASA	27

3.8.1 OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO	28
3.8.2 ACTIVIDAD ENZIMATICA	28
3.8.2.1 DETERMINACION DE PROTEINA	29
3.9 OBTENCION DE PARED CELULAR	29
3.10 CUANTIFICACION DEL GRADO DE METILACION DE LA PECTINA	30
3.10.1 HIDROLISIS ALCALINA DE LA PARED CELULAR ..	30
3.10.2 ANALISIS CROMATOGRAFICO	31
IV RESULTADOS	
4.1 EFECTO DEL ALMACENAMIENTO SOBRE LA TEXTURA DEL FRIJOL	34
4.2 NIVELES DE HIDRATACION DEL GRANO DE FRIJOL DURANTE SU ALMACENAMIENTO	46
4.3 CORRELACION ENTRE LA DUREZA DEL GRANO Y EL GRADO DE METILACION DE LA PARED CELULAR	51
4.4 CAMBIOS EN LOS NIVELES DE ACTIVIDAD DE LA ENZIMA PECTINMETILESTERASA DURANTE EL ALMACENAMIENTO DEL GRANO	55
V DISCUSION	60
VI CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	69
VII BIBLIOGRAFIA	71

RESUMEN

El frijol es muy importante en la dieta de los pueblos de América Latina incluyendo México, ya que aporta un buen porcentaje de la proteína que estos consumen además de una buena cantidad de vitaminas y minerales.

Este grano tiende a deteriorarse (endurecerse) con rapidez cuando es almacenado en condiciones de alta humedad relativa y temperatura. Tal deterioro o endurecimiento se manifiesta durante el proceso de cocción provocando que el grano requiera más tiempo y energía para su suavización además de perder muchas de sus cualidades nutricionales. Debido a lo anterior este frijol es rechazado y se pierde para consumo humano.

En nuestro país este problema es muy serio, ya que se dan en forma natural las condiciones que provocan dicho fenómeno de endurecimiento lo cual agrava la escasez del producto.

Los procesos fisico-químicos involucrados en el endurecimiento no son muy conocidos, sin embargo por microscopía de luz se ha observado que durante la cocción las células del cotiledón de un frijol duro no se separan como en un frijol fresco sino que permanecen unidas por la lámina media, la cual permanece intacta. Tales resultados se han interpretado como que el problema del endurecimiento del frijol podría estar muy relacionado con tal falla en la separación celular.

Este trabajo tiene como objetivo determinar la relación existente entre el grado de metilación de la pectina (que es uno de los constituyentes de la lámina media) y el endurecimiento de frijol.

Para el trabajo se utilizaron 8 variedades de frijol *Phaseolus vulgaris* que se guardaron a temperatura ambiente. El deterioro se realizó almacenando el grano durante 7, 14, 21 y 33 días a 41°C y en una humedad relativa del 75 %.

El grado de endurecimiento se valoró a través de cocciones a los 45 y 90 minutos, realizándose la cuantificación de textura mediante un Instron. Se encontró que en general todas las variedades se endurecen aunque no en la misma forma a medida que el tiempo de almacenamiento es mayor.

Los resultados muestran además que el frijol al ablandarse pasa por diversas etapas a distintos tiempos de cocción, las cuales se van modificando diferencialmente a medida que va aumentando su tiempo de almacenamiento. Los eventos de ablandamiento que ocurren primariamente son los que en primer lugar se ven afectados.

Para determinar si los aumentos en el tiempo de cocción estaban relacionados con la velocidad con la que el grano toma agua para equilibrarse con las condiciones externas de humedad ó con el contenido de humedad que alcanza en el almacén, se siguió la cinética de hidratación del grano y se encontró que en general existe una relación exacta entre la velocidad con la que toma agua en los primeros tres días de almacenamiento y el deterioro que sufren los eventos de ablandamiento que ocurren primariamente.

Se observó que tanto los niveles iniciales de metilación de la pectina como el grado de desmetilación que sufre cuando el grano es almacenado guardan una relación inversa con la susceptibilidad al endurecimiento que presenta el grano.

La actividad de la enzima pectinmetilesterasa que se registró en el grano no parece guardar una relación exacta con el grado de desmetilación de la pectina detectado.

Por lo anterior, del presente trabajo se puede concluir que la desmetilación de la pectina no contribuye en forma importante en el desarrollo del endurecimiento del grano a los niveles alcanzados hasta este tiempo de almacenamiento.

I. INTRODUCCION

1.1 Características de las Leguminosas

Las leguminosas (Leguminosae) desde el punto de vista botánico se pueden definir como; hierbas o plantas leñosas, con las raíces provistas de nudosidades, debidas a la simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*. Hojas generalmente alternas, compuestas, estipuladas.

Flores cigomorfas o actinomorfas, normalmente hermafroditas. Cáliz de 5 sépalos, libres o soldados. Corola de 5 pétalos libres rara vez soldados, iguales o desiguales. Estambres 10, a veces más o menos, con los filamentos libres o soldados; Anteras biloculares, de dehiscencia longitudinal. Gineceo súpero, unilocular, unilocular, con uno o muchos ovulos.

El fruto típicamente es una legumbre o vaina, el cual es un fruto seco, unilocular, dehiscente por las suturas dorsal y ventral con una o varias semillas. Este tipo de frutos no se encuentra en ninguna otra familia de plantas por esa razón a estas plantas se les denomina leguminosas. La palabra leguminosa proviene del latin leguminosus y éste de legumen legumbre.

Es una familia amplia que cuenta con más de 550 géneros y unas 15,000 especies repartidas en todo el mundo. (Sánchez 1974)

1.1.1 Estructura del Grano

Se podría definir al grano como la semilla que se utiliza para consumo alimenticio humano o de animales de granja.

Característicamente las semillas de las leguminosas muestran una forma más o menos comprimida, su tamaño por lo general va de mediano a grande. Presentan una testa o cubierta externa de la semilla dura, seca y usualmente lisa, el tamaño del embrión es grande (Corner 1951).

En la semilla, que es el óvulo maduro generalmente se aprecian dos estructuras muy conspicuas la testa y los cotiledones. La testa, se encuentra rodeando a los cotiledones y al embrión y tiene como función primordial la protección de este último.

El embrión es una planta en miniatura que consiste en un eje corto. La parte del eje arriba de los cotiledones es el epicotilo o plúmula que se convierte en la yema terminal de la plántula. La parte del eje inmediata, es el hipocotilo una región que da origen al tallo y sus ramificaciones. El hipocotilo se prolonga en la base hacia la radícula que se convierte en la raíz primaria de la planta.

Los dos cotiledones contienen alimento almacenado que será usado por la planta joven, cuando empiece a crecer y hasta que adquiera capacidad para establecerse como un organismo autotrófico.

El alimento almacenado en la semilla incluye proteínas, carbohidratos y grasas, siendo las proporciones de estas reservas variables de acuerdo con el grupo taxonómico. Las semillas de las

leguminosas en general tienen un contenido alto de proteínas y están entre las principales fuentes de proteína vegetal.

Al observar a la semilla de frente se observan el hilio y el micropilo; el primero es una cicatriz que marca el lugar donde se adhiere el funículo a la placenta y el segundo es una diminuta apertura en la testa. (Fig 1.1)

1.2 Importancia de las Leguminosas

Desde el punto de vista económico las leguminosas son importantes por que existen géneros que son cultivados por su semilla comestible, como son "frijol" *Phaseolus*; "haba" *Vicia faba*; "lenteja" *Lens culinaris*; "chicharo" *Pisum sativum*; "garbanzo" *Cicer arietinum*; "Cacahuete" *Arachis hypogea*; "soya" *Glycine max*; "tamarindo" *Tamarindus indica* etc..Otras se utilizan para el forraje como "alfalfa" *Medicago sativa* y "trébol" *Trifolium*.

Para uso ornamental son comunes "el chicharo de olor" *Lathyrus odoratus* y "Lupino" *Lupinus*.

Entre las semillas que son destinadas al consumo humano se pueden diferenciar dos grupos, uno de los cuales son las semillas que el hombre usa primordialmente por su contenido de aceite (Siegel y Fawcett 1976) y otro que son aquellas que consume secas y que son importantes en su dieta por su alto contenido proteico. (Purseglove 1968).

Según los nutriólogos, las leguminosas representan una importan

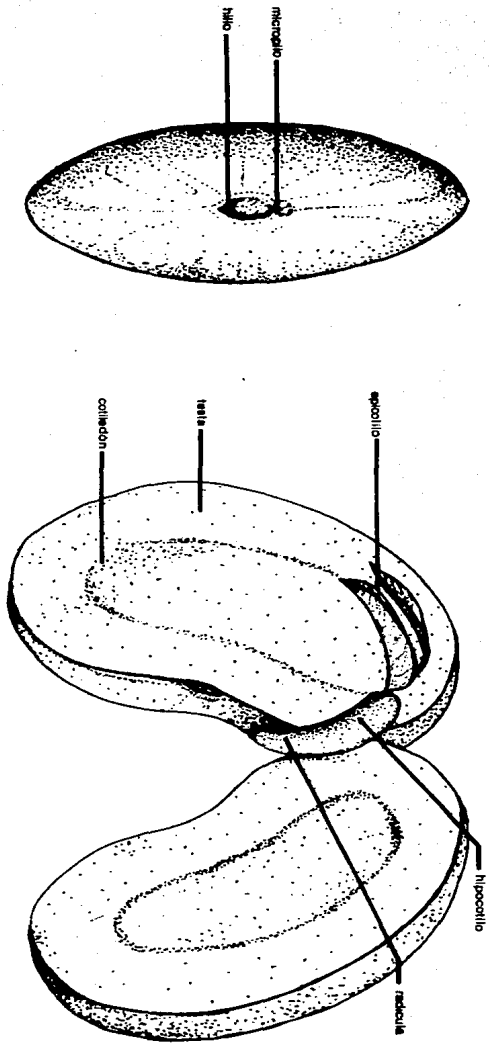


Fig 1.1 Estructura de una semilla de leguminosa (Nortian 1988)

te fuente de nutrientes para una gran proporción de la raza humana, incluyendo un aporte considerable de proteínas las cuales son abundantes en lisina, el aminoácido limitante en cereales. (Rockland y Radke 1981; Sgarbieri y Whitaker 1982; Aguilera et al 1986).

Se ha estimado (Rockland y Radke 1981) que la producción total de leguminosas incluyendo frijol seco, chícharos, frijol soya y cacahuates proveen al mundo casi de igual cantidad de proteína que el trigo y aproximadamente el doble que el arroz o el maíz.

Al mismo tiempo, las leguminosas aportan cantidades apreciables de energía a través de los carbohidratos, fibras, lípidos (en el caso de las leguminosas aceitosas) minerales y vitaminas incluyendo niveles apreciables de tiamina, riboflavina y niacina. (Bressani y Elias 1974, 1978)

Un ejemplo claro de la importancia de las leguminosas y muy especialmente del frijol se encuentra en los pueblos de Latinoamérica. En estos países el frijol juega un papel determinante en sus dietas ya que aporta entre un 20 y 50 % de la proteína que estos consumen (Bressani et al 1961; Varriano-Marston y Omana 1979) además son también una buena fuente de vitaminas (Bressani et al 1954; Bunnell et al 1965) y minerales (de Moraes y Angellucci 1971).

Sin embargo a pesar de su enorme potencial, son subutilizadas ya que un buen porcentaje de su producción se pierde para el consumo humano. La pérdida se produce durante el proceso denominado manejo postcosecha del grano el cual comprende las etapas de producción (cosecha), transporte, almacenamiento y distribución

(Dávila 1986) hasta llegar al consumidor. Durante cada uno de estos pasos se va perdiendo un porcentaje que es variable, sin embargo es en el almacenamiento cuando se producen las pérdidas más importantes.

Estimaciones que se han hecho a nivel internacional sobre las pérdidas postcosecha, señalan que en terminos generales se pierde un 5 % de la cosecha mundial de granos, antes de llegar al consumidor. Sin embargo la magnitud de las mermas varía de país a país y de año a año, considerandose que en los países subdesarrollados como en la India y en algunos países de América del Sur y Africa, las pérdidas son del orden del 30 y 40 % de la cosecha anual de granos y en algunas ocasiones pueden ser mayores dependiendo de las condiciones climáticas que prevalecen durante y después de la cosecha. (Moreno 1986)

Las causas principales que se han mencionado para esta enorme pérdida que ocurre durante el almacenamiento son el ataque de hongos, insectos, roedores, pájaros, siniestros y cambios fisicoquímicos (endurecimiento) los cuales son provocados primordialmente por falta de una infraestructura adecuada para hacer frente a las condiciones ambientales o por falta de un buen manejo de los recursos para almacenar los granos (Dávila 1986). En este trabajo solo se tratan los aspectos de pérdidas del grano causadas por el endurecimiento.

En el caso de los pueblos de América Latina las pérdidas causadas por el endurecimiento del frijol constituyen un problema serio. Es difícil cuantificar el porcentaje de merma, sin embargo en una encuesta realizada por el INCAP (1983) entre 323 granjeros

guatemaltecos, se encontró que el 10 % de la cosecha de frijol de ese país se pierde a causa de problemas en la textura del grano.

En nuestro país donde el frijol es también una importante fuente de proteínas se presentan mermas considerables en la producción a causa de problemas de endurecimiento. En México la producción anual de frijol en el año 1987 fue de 1,016,525 toneladas siendo los principales estados productores: Zacatecas (37.9 %), Durango (12.9 %), Sinaloa (11.9 %), Chihuahua (7.34 %) Nayarit (4.85 %), Guanajuato (3.61 %), Chiapas (3.21 %), San Luis Potosí (2.07 %) y Veracruz (2.02 %).

A pesar de que no hay cifras oficiales se estima que las pérdidas de tal producción son del orden de las que se dan en Guatemala ya que la infraestructura en cuanto al almacenamiento es parecida, además de que en nuestro país se dan también en forma natural las condiciones ambientales como son las altas temperaturas y humedades relativas que propician el fenómeno del endurecimiento. Entendiendo que la humedad relativa (H.R.) representa la cantidad de agua en el aire expresada como porcentaje, de la cantidad total de agua que ese aire puede contener a la misma temperatura.

Un frijol que es almacenado en condiciones de alta temperatura y alta humedad relativa pierde calidad, se endurece (Elias 1982; Jones y Boulter 1983). Esto provoca que el industrial y el ama de casa ocupen más tiempo y energía para suavizarlo. Además debido al largo tiempo de cocción que este frijol requiere para ser palatable sus niveles nutricionales son menores (Bressani et al 1963; Sievwright y Shipe 1986). Por todo lo anterior este frijol es rechazado y se pierde para consumo humano.

Esto es muy grave ya que dichas pérdidas, sumadas a las que se dan en los demás países acrecentan el problema de la escasez de alimentos, que en sí es el principal problema que afrontan los países del tercer mundo.

1.3 Proceso de cocción

Aunque existen algunas leguminosas que se consumen inmaduras o en estado fresco, la mayoría entre ellas el frijol se cosechan maduras, se secan aproximadamente a un 10 % de contenido de humedad del grano y se almacenan en condiciones ambientales.

Posteriormente para su aprovechamiento tanto en la industria como en la alimentación requieren de un tiempo de cocción para suavizarse. Durante la cocción, el grano además de ablandarse, pierde toxicidad, adquiere sabor agradable y se vuelve digerible. (Stanley y Aguilera 1985)

En la literatura se ha propuesto que durante el proceso de cocción se produce la separación de las células del cotiledón de frijol. Tal separación ocurre porque la lámina media se solubiliza lo que provoca una pérdida en la rigidez de tal estructura. (Sefa Dedeh y Stanley 1979^a; Jones y Boulter 1983)

La lámina media es la estructura que mantiene las células individuales juntas y rígidas, consiste en su mayor parte de pectina que interacciona con iones calcio y magnesio, tal interacción provoca que sea insoluble (Michiko 1987). La pectina es un polímero de ácido galacturónico parcialmente esterificado con metanol.

Una posibilidad es que durante el proceso de cocción los cationes abandonen esta asociación y sean quelados o atrapados por la fitina provocando la solubilización de la pectina y por ende la suavización del frijol.

1.4 Fenómeno del endurecimiento

El frijol al igual que otras semillas de leguminosas presenta una tendencia natural a envejecer. Una de las manifestaciones del envejecimiento o deterioro es el incremento progresivo en la dureza del grano (endurecimiento), el cual se hace evidente durante el proceso de cocción. (Elias 1982; Stanley y Hohlberg 1987)

Se ha observado, sin embargo, que la velocidad con que se da este fenómeno va a depender tanto del tiempo de almacenamiento, así como de la temperatura y humedad relativa de la atmósfera en que se encuentra almacenado. De tal forma que cuando el frijol se almacena en condiciones de alta humedad relativa y alta temperatura se deteriora o endurece muy rápidamente. (Stanley y Aguilera 1985; Hinks y Stanley 1986; Aguilera y Ballivian 1987)

Siendo mayor y en menor tiempo el deterioro cuando actúan en forma conjunta ambos factores que cuando actúa cada uno por separado, (Jones y Boulter 1983; Aguilera y Ballivian 1987). Un frijol deteriorado es considerado duro, cuando el tiempo que tarda en suavizarse es significativamente mayor comparado con el de un grano fresco o bien cuando no llega a cocerse.

Existen dos categorías en que se han clasificado los granos duros: 1) "frijol de cáscara dura", "hard shell" y 2) "frijol de difícil cocción", "Hard to cook". (Stanley y Aguilera 1985)

Un "frijol de cáscara dura" es aquel que debido a sus características estructurales (tamaño y estructura del hilio, micrópilo y testa), (Deshpande y Cheryan 1986), no alcanza a hidratarse lo suficiente para ablandarse durante la cocción. Mientras que uno que entra en la categoría de "frijol de difícil cocción" a pesar de que se hidrata convenientemente su tiempo de cocción es largo.

El endurecimiento acelerado del frijol esta acompañado de cambios tanto en su composición química como en su estructura, (Stanley y Aguilera 1985). Entre algunos de los constituyentes químicos que se ha planteado que se modifican durante el almacenamiento del grano en condiciones adversas se encuentran lípidos, proteínas, almidón, pectina, fitina, iones divalentes y polifenoles etc.

Algunos autores han propuesto que las proteínas (Sefa-Dedeh y Stanley 1979^b; Stanley y Hohlberg 1987), lípidos (Munata 1964; Priestley y Leopold 1979; Stewart y Bewley 1980) y almidón (Aguilera y Steinsapir 1985; Stanley y Hohlberg 1987), sufren modificaciones físicas o químicas en un frijol endurecido. Sin embargo las evidencias que aportan no son concluyentes en demostrar que los cambios sugeridos realmente ocurren durante el almacenamiento del grano en tales condiciones, o bien si son producto de la presencia de hongos que se desarrollan durante el tiempo de almacenamiento o durante el progreso de la metodología de cuantificación empleada. Por otro lado si en verdad se

presentan estas modificaciones no se ha encontrado su relación con el fenómeno del endurecimiento.

Jones y Boulter, (1983) usando microscopía de luz observaron que durante la cocción las células del cotiledón de un frijol duro no se separaban como en un frijol fresco sino que permanecían juntas unidas por la lámina media, la cual permanecía intacta.

Tales resultados se han interpretado como que el problema del endurecimiento del frijol podría estar muy relacionado con tal falla en la separación celular. (Aguilera *et al* 1986; Hincks y Stanley 1986)

Debido a lo anterior las modificaciones que se presentan en moléculas que están relacionadas directamente con la separación celular como son la fitina, pectina, iones divalentes y polifenoles, han servido de base para la elaboración de varias hipótesis que tratan de explicar el fenómeno.

Algunas de las moléculas que se ha planteado que pueden estar involucradas en la disminución de la separación celular en un frijol endurecido son los polifenoles. Tales compuestos en la actualidad han recibido una gran atención debido a su influencia adversa sobre el color, sabor y calidad nutritiva del grano.

Los polifenoles más comunes en las leguminosas son los taninos y los flavonoides. Los taninos que parecen ser los más importantes, son productos metabólicos normales, consistiendo de compuestos fenólicos solubles en agua que tienen pesos moleculares entre 500 y 3,000 daltones y presentan capacidad de precipitar gelatinas y otras proteínas (Grupta y Haslam 1980). Por su parte los flavonoides que son compuestos que presentan color, se

encuentran presentes comunmente en 2 formas monoméricas la catequina y la epicatequina.

Algunos autores proponen que los compuestos fenólicos podrían influir en el endurecimiento del frijol por 2 vías. (Elias 1982)

Por una parte, proponen que la oxidación de polifenoles de la testa causada por la actividad de la enzima polifenolasa provocaría un oscurecimiento y una mayor impermeabilidad de tal estructura. Se ha propuesto que esta mayor resistencia de la testa al paso del agua podría estar relacionada con la dureza que alcanza el grano durante el almacenamiento.

Por otro lado, se ha propuesto que los polifenoles estarían involucrados en un mecanismo de lignificación que posiblemente sería contribuyente en el proceso de endurecimiento del grano. (Varriano-Marston *et al* 1981)

La lignina es una molécula de estructura variable que en general presenta una estructura tridimensional que consiste de cadenas cortas lineales entrecruzadas por una gran cantidad de cadenas unidas covalentemente. No posee carga, es insoluble y esta ampliamente distribuida en tejidos de plantas.

La función de la lignina es la de disminuir la permeación a través de las paredes celulares, impartir rigidez a los enlaces entre las células y crear una estructura resistente a impacto, compresión y doblamiento (Sorkanen y Ludwig 1971).

Se ha planteado que los polifenoles por acción de la enzima peroxidasa, pierden un átomo de hidrógeno de su estructura y se convierten en radicales libres. Los cuales se combinan al azar formando largas cadenas de lignina. A medida que se van combinando

los radicales libres pueden interactuar covalentemente con los polisacáridos y proteínas presentes en las paredes celulares y la lámina media (Blouin et al 1982), en un proceso denominado lignificación.

Algunos estudios previos apuntan o sugieren a la lignificación como un posible participante en el mecanismo de endurecimiento del grano de frijol. (Muller 1967; Molina et al 1976; Whitmore 1978; Hink y Stanley 1987).

Sin embargo, debido a que es relativamente reciente requiere de mayor experimentación principalmente en el área bioquímica ya que la mayoría de los resultados obtenidos a la fecha, se basan en observaciones al microscopio electrónico de aspectos estructurales del grano.

Otra hipótesis, quizá la más apoyada es la que propone que el ácido fitico (fitina) juega un papel primario en el fenómeno de endurecimiento del grano de frijol, (Stanley y Aguilera 1985). La fitina, hexofosfato de mioinositol, es una molécula por medio de la cual se almacena fósforo en todas las semillas de leguminosas (Cheryan 1980; Reddy et al 1982 y Oberleas 1983). Su estructura altamente polar le confiere la capacidad de ser un poderoso quelante natural de cationes mono y divalentes, (Lolas y Markalis 1975 y Kon y Sanshuck 1981). Esta hipótesis que tiene sus primeros antecedentes en los trabajos de, Mattson, (1946) plantea que al ser la fitina un quelante natural de cationes divalentes, atrapa iónicamente al Ca^{++} y Mg^{++} de la lámina media, evitando que interaccionen con la pectinas que ahí se encuentran, durante el almacenamiento del grano en condiciones adversas, la fitina es

diminuida enzimáticamente por la fitasa lo que reduce su potencial quelante dejando libres a los cationes divalentes y en posibilidad de interaccionar con la pectina provocando que su solubilidad sea menor que en el grano no almacenado.

Esta menor solubilización de la pectina durante la cocción del grano almacenado se ha planteado que es la responsable de la restricción en la separación celular del frijol duro y por lo tanto de su falla para suavizarse.

Esta hipótesis cuenta con muy convincentes evidencias a su favor ya que algunos autores han demostrado que en un frijol duro hay una disminución significativa en el contenido de fitina del orden del 35 %, (Jones y Boulter 1983) respecto a un frijol control. Bernal *et al* (1987) encontraron que la disminución es muy rápida y ocurre tempranamente durante el almacenamiento. También observaron que la fitasa una fosfohidrolasa que lleva a cabo la hidrólisis de la fitina produciendo inositol y fosfato, se encuentra activa.

Al mismo tiempo Kon y SanshuK (1981) reportaron que la fitina esta muy relacionada con el tiempo de cocción, ya que si a un frijol control se le añade EDTA o fitina su tiempo de cocción se puede reducir. De igual forma (Moscoso *et al* 1984; Hincks y Stanley 1986) encuentran correlación significativa entre el contenido de fitina de frijol y su tasa de ablandamiento.

Sin embargo, existen otros autores (Crean y Haisman 1963; Rosenbeaum y Baker 1969; Varriano-Marston *et al* 1981) que afirman que la fitina aunque disminuye en cantidad en un frijol duro no es determinante en el endurecimiento. Además se ha observado que en

un estado de endurecimiento avanzado la relación entre la textura y el contenido de fitina en el grano ya no se presenta. (Bernal et al 1987)

Las divergencias en los resultados en cuanto al papel de la fitina dentro del endurecimiento del frijol nos demuestran que es un error tratar de explicar de una manera simplista en base a una sola teoría este proceso biológico tan complejo

De tal forma que aunque muchos investigadores hayan encontrado correlación significativa entre la disminución de la fitina y el endurecimiento, este parámetro quizá explica solo una parte del proceso del endurecimiento.

Una tercera hipótesis que esta muy ligada a las anteriores es la que se basa en las modificaciones de la pectina, la cual es un constituyente importante de la lámina media.

Jones y Boulter, (1983) reportaron que en un frijol que ha sido almacenado durante algún tiempo en condiciones de alta humedad y alta temperatura la pectina presenta un menor número de grupos metilo y una solubilidad mucho más baja respecto a un frijol fresco.

Estos resultados se han interpretado como que durante el almacenamiento ocurre una desmetilación de la pectina provocada por una hidrólisis que puede ser alcalina, ácida o enzimática, siendo las dos primeras poco probables ya que en la célula normalmente el pH es constante.

Existe una enzima llamada pectinmetilesterasa que lleva a cabo la desmetilación de la pectina liberando como productos metanol y protones. Podría ser que en tales condiciones de almacenamiento la

enzima se activara provocando que en la pectina aumente el número de grupos carboxilos libres, los cuales a su vez pueden modificar el número de cationes divalentes (calcio y magnesio) en la lámina media o bien la fuerza de la interacción con los que ya estan unidos provocando con ello que sea más difícil su salida de la pectina. Lo anterior resultaria en una disminución de la solubilidad de la pectina y un aumento en el tiempo de cocción.

Esta hipótesis resulta interesante para explicar la restricción de la separación celular. Sin embargo esta basada en muy pocos datos experimentales, los cuales no establecen si existe correlación real entre el grado de metilación y el tiempo de cocción de grano, ya que podria ocurrir que la disminución del número de grupos metilos de la pectina que ha sido reportada fuera un proceso que se lleva a cabo durante el almacenamiento, en condiciones adversas, de manera paralela e independiente del fenómeno del endurecimiento. Debido a ello, como una contribución al conocimiento de este fenómeno, se investigo si el proceso de desmetilación de la pectina interviene en el deterioro (dureza) del grano. Para ello existe la necesidad de seguir la cinética de endurecimiento del frijol almacenado en condiciones de alta humedad relativa y alta temperatura y al mismo tiempo analizar la pectina, en cuanto a su composición de grupos metilos, y la actividad de la enzima pectinmetilesterasa a medida que el frijol se va haciendo más duro. Esperándose que si existe relación entre ellos, entonces a medida que sea mayor el endurecimiento, disminuirá proporcionalmente el grado de metilación de la pectina y consecuentemente la enzima pectinmetilesterasa estará activa.

Al mismo tiempo los resultados que se obtengan con una variedad de frijol será necesario compararlos con los de otras variedades para ver si es o no un mecanismo común el que se presenta durante el endurecimiento.

II. OBJETIVOS

Para probar la hipótesis anterior, se sugiere la realización de los siguientes objetivos:

1.-Obtener frijol de distintos tiempos de almacenamiento en condiciones de deterioro acelerado y determinar su cinética de hidratación en el almacén.

2.-Realizar cocciones para cuantificar el grado de dureza alcanzado por el grano a los distintos periodos de almacenamiento.

3.-Cuantificar la actividad de la enzima pectinmetilesterasa en frijol control y a los diferentes tiempos de almacenamiento.

4.-Obtener pared celular de frijol con diferente grado de dureza y cuantificar su grado de metilación.

III. MATERIAL Y METODOS

3.1 Reactivos

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron reactivos de grado analítico.

3.2 Equipo

A continuación se enlista el modelo y marca del equipo utilizado en el desarrollo del presente trabajo.

Centrifuga refrigerada MSE LR-6, Centrifuga clinica IEC HN-S, Centrifuga Beckman J2-21, rotor JA20, Espectrofotómetro UV/Vis Pye Unicam SP6-550, Homogeneizador Politron Kinametica GMBH, Homogeneizador Ultraturrax Ika Werk, Estufas con circulación de aire forzado Felisa, Balanza analitica E.Mettler H6, Balanza granataria, Incubadora agitadora de temperatura controlada, sonicador, Potenciometro Conductronic digital, Plato giratorio Thermolyne tipo 1000, Molino de café Coffret de Moulinex, Cromatógrafo de Gases Varian Modelos 1400 y 2700, Texturómetro Universal Instron modelo A-1022.

3.3 Material Biológico

En la realización de este trabajo, se utilizó frijol *Phaseolus vulgaris* de las variedades: Michigan 800, Bayo 400, Cacahuatate Jalisco, Pinto Nacional, Ojo de Cabra, Negro Jamapa, Negro Huasteco y Negro Veracruz, cosecha 1986 que se obtuvo del Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Biología de la UNAM.

El grano se guardó en el laboratorio a temperatura ambiente, en frascos de vidrio cerrados hasta su utilización.

Para el desarrollo del trabajo se utilizaron únicamente granos que por inspección visual no presentaban daño aparente.

3.3.1 Características del material biológico.

En el presente trabajo era conveniente utilizar material biológico homogéneo en cuanto a su carga genética e historial agronómico. Debido a ello se utilizaron variedades de frijol que fueron cultivadas especialmente para el proyecto que desarrollan en colaboración el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Biología y el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, ambos de la U.N.A.M.

El grano fue cultivado en terrenos del estado de Guerrero en un mismo clima, suelo, con los mismos fertilizantes y regado con la misma cantidad de agua etc. por lo que las variaciones que se pudieran presentar entre las variedades deberan ser producto de las características genéticas de cada una de ellas y no de variaciones a nivel ambiental.

3.4 Deterioro del grano.

Para deteriorar el frijol se colocaron 5 gramos de cada variedad en cajas Petri de plástico de 8.7 cm de diámetro, con perforaciones, las cuales se metieron en una cámara de deterioro.

La cámara consiste en una caja de plástico transparente de 35 X 25.5 X 13.5 cm en la cual se pone 1 litro de una solución saturada de cloruro de sodio (comercial), para mantener en su interior una humedad relativa del 75%. Dentro de la cámara se coloca una base de plástico con perforaciones sobre la cual se colocan las cajas de Petri, esto con el fin de evitar que el grano se empape con la solución salina.

La cámara perfectamente cerrada se colocó en un horno a circulación forzada de aire a temperatura constante de 41 °C. Estas condiciones de temperatura y humedad relativa se utilizaron porque no permiten el desarrollo de hongos y con ello se evita la existencia de variables ajenas a nuestro sistema de trabajo.

Los granos se dejaron en la cámara durante 7, 14, 21 y 33 días. A los tiempos indicados se sacaron las muestras y se guardaron en frascos perfectamente cerrados en una temperatura de -20°C.

3.5 Determinación del tiempo de cocción del grano.

Para determinar el tiempo de cocción de las diferentes variedades de frijol a los distintos días de deterioro se siguió la siguiente metodología.

Para el frijol control, se colocaron 240 gramos en una olla de peltre con 2 litros de agua bidestilada hirviendo; durante el tiempo que dura la prueba el volumen se mantiene constante añadiendo agua hirviendo.

El frijol fue dividido en 12 grupos de 20 gramos cada uno y metido en bolsas de gasa. A los 45 minutos de cocción se sacaron 3 bolsas (60 gramos) de frijol y se empaquetaron herméticamente en bolsas de plástico. Lo anterior se repitió para 55, 65 y 90 minutos de cocción.

Esta cinética de cocción se realizó para conocer cuales tiempos de cocción eran los apropiados para observar cambios estructurales aparentes en el grano. Además de cuantificar las velocidades de cocción del grano fresco de las distintas variedades.

Para los granos con 7, 14, 21 y 33 días de almacenamiento se colocaron sólo 6 bolsas con 20 gramos de frijol cada una (120 gramos) pues se hicieron únicamente 2 tiempos de cocción 45 y 90 minutos, repitiéndose exactamente lo que se hizo con el grano control.

En todos los casos, la dureza al corte (cuantificación de textura) fue determinada en un Texturómetro Universal Instron modelo A-1022 equipado con un transductor de compresión de 500 kg y como accesorios la celda Kramer cuyo rango era de 5 a 500 Kg de fuerza, la cual era calibrada en la escala más pequeña con una pesa de 5 Kg .

Para cada cuantificación se utilizaron 20 g de frijol cocido, tal cantidad de muestra fue la que mostró menor variación

experimental en un estudio previo en el que se fue variando la cantidad de frijol.

En todos los casos el tiempo transcurrido entre las cocciones y la cuantificación de la textura no excedió las 2 horas.

3.6 Determinación del contenido de humedad durante el almacenamiento.

El contenido de humedad del grano de frijol se determinó por el método de secado en estufa de circulación de aire forzada propuesto por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos U.S.D.A (1979).

El cual consiste en secar muestras por duplicado de 5 a 10 gramos de frijol en una estufa con circulación forzada de aire a 103°C por 72 horas. El porcentaje de humedad se expresa con base al peso húmedo del grano.

3.6.1 Determinación del contenido de humedad en equilibrio con la humedad relativa de 75 % .

Para este método se requiere contar con cajas de metal con tapa de 5 cm de diámetro con peso constante conocido. Para determinar el peso constante de estas, las cajas se metieron a la estufa a 100°C durante 3 días al término de los cuales se sacaron y se enfriaron durante 25 minutos en un desecador para que no se hidrataran. Ya frías se pesaron tomándose lectura hasta milésimas

de gramo.

Posteriormente se volvieron a meter a la estufa y a los 2 días se volvieron a pesar, este proceso se repitió 3 veces, considerándose que las cajas estaban a peso constante cuando las lecturas se repetían .

En cada una de estas cajas, se colocaron 5 gramos de frijol fresco de cada variedad anotándose su peso en conjunto y considerándose como el tiempo cero de hidratación. Las cajas destapadas se metieron a la cámara que se usó en el deterioro. Las cajas y su contenido se pesaron a los 1,2,3,5,7,9 y 14 días, para ello en cada ocasión las cajas se cerraban y se metían a enfriar en un desecador por 25 minutos, esto era con el fin de evitar que el grano tomara humedad en condiciones diferentes a las que se encontraba en la cámara.

Después de la lectura de los 14 días se determinó el peso seco del grano de frijol, las cajas con los granos se pusieron en la estufa a 100°C durante 72 horas, al término de las cuales se pesaron de la misma manera que se menciona arriba.

Enseguida se volvieron a meter otras 48 horas a la estufa y se pesaron. Esta operación se realizó tantas veces como fue necesario para que la lectura fuera constante, considerándose que esto ocurría cuando el frijol se encontraba a peso seco constante.

A partir de estos datos y con la siguiente relación se obtuvo la velocidad de hidratación para cada una de las variedades.

$$\% \text{ de Hidratación} = \frac{A - B}{C - B} \times 100 - 100$$

donde: A = Peso de caja + Frijol húmedo a los distintos
distintos días de almacenamiento.

B = Peso de caja

C = Peso de caja + frijol a peso seco.

Los datos reportados en este trabajo son el promedio de 2
repeticiones independientes hechas por triplicado.

3.7 Obtención de Harina de Frijol.

Para obtener la harina de frijol, 5 gramos de cotiledones
provenientes de grano control ó de deteriorado, se molieron dos
veces en un molino de café durante 15 segundos con intermedios de
5 segundos. La harina obtenida se guardó en el refrigerador a
-20°C en frascos viales perfectamente cerrados hasta su
utilización.

3.8 Actividad de la Enzima Pectinmetilesterasa.

La actividad de la Pectinmetilesterasa se determinó por
potenciometría (Kertez, 1937; Lee y Mcmillan, 1968). La cual está
fundamentada en la cuantificación de la disminución de pH de una
solución de pectina provocada por la actividad de la enzima pectin
metilesterasa.

3.8.1 Obtención del extracto enzimático

Para obtener el extracto enzimático, 0.5 g de harina de frijol fueron colocados en un vaso de precipitados de 25 ml, se le añadió 20 ml del buffer de extracción (tris 0.1 M pH 9.0 NaCl 1.5 M y CaCl_2 0.05 M). Se agitó por 1 hora en un plato giratorio a 4°C y posteriormente se centrifugó a $12,100 \times g$ durante 10 minutos a una temperatura de 4°C . El precipitado se desechó y el sobrenadante después de medir su volumen se conservó en hielo hasta la cuantificación de la actividad enzimática.

En ocasiones la medición de la enzima no se hizo inmediatamente sino hasta 24 horas después, en ese caso el extracto enzimático se congeló a -20°C .

3.8.2 Actividad Enzimática

Para determinar la actividad enzimática sobre un plato giratorio se colocó un refractario de $21 \times 20.5 \times 5$ cm con agua a temperatura constante de 39°C Dentro del refractario y sostenido por pinzas para bureta se colocó un vaso de precipitados de 30 ml que contenía 25 ml de una solución de pectina al 0.5 % con NaCl 0.15 M .

Tanto en el refractario como en el vaso de precipitados se colocaron agitadores magnéticos de tamaños apropiados para que el agua homogeneizara su temperatura y que la mezcla de reacción tuviera una agitación constante y uniforme .

Se midió el pH inicial de la pectina, así como el que alcanzaba al añadirle 1.7 ml del extracto enzimático, este último pH

casi siempre fué de 7.4 que esta dentro del rango de pH óptimo (7.2-7.8) de la pectinmetilesterasa (PME) (Hagerman y Austin, 1986).

Se tomó como pH del tiempo cero, el que alcanzaba la pectina al añadir la enzima y posteriormente se siguió la variación de pH cada 5 minutos durante 30 minutos.

Una buena agitación fue muy importante para que fueran rápidamente evidentes los cambios de pH que se generaban.

La capacidad amortiguadora del ensayo enzimático fué determinada mediante una curva de disminución de pH provocada por la adición de cantidades conocidas de H^+ .

Una unidad de PME se definió como:

1 U. de P M E = 1 μ mol de H^+ generados/mg de Prot./60 minutos.

3.8.2.1 Determinación de Proteína

Para determinar la cantidad de proteína en el extracto enzimático se utilizó el método de Lowry *et al.*, 1951.

Los datos reportados son el producto del promedio de 2 repeticiones independientes hechas por triplicado.

3.9 Obtención de Pared Celular.

Para obtener la pared celular se colocaron 1.5 g de harina de frijol en un tubo de plástico de 2.7 cm de diametro, se le añadió 12 ml de buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4 con NaCl 2 M y 9 mM de Mercaptoetanol este último se adiciona en el momento de usarse. Se homogeneizó por 60 segundos en el Ultraturrax a máxima velocidad,

centrifugándose posteriormente a 3,000 r.p.m durante 10 minutos.

El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en un volumen similar de buffer. Nuevamente se centrifugó y se desechó el sobrenadante.

La pastilla así obtenida se lavó 2 veces con 5 ml de acetona cada vez y 1 vez con eter, las lavadas fueron con el fin de eliminar el exceso de material intracelular. Después de cada lavada se centrifugó de la misma manera arriba mencionada.

La pared celular obtenida se puso a secar por 48 horas en la estufa a 40°C

De esta forma se obtuvo por triplicado la pared celular de las diferentes variedades a los diversos días de deterioro.

3.10 Cuantificación del Grado de Metilación de la Pectina.

Para cuantificar el contenido de grupos metilos de la pectina de la pared celular de las distintas variedades de frijol se siguió la técnica de McFeeters y Armstrong (1934).

3.10.1 Hidrolisis alcalina de la pared celular.

Debido a que el metanol no se encuentra libre (en forma volátil) sino esterificando a la pectina, para poder cuantificarlo, fué necesario liberarlo de esta asociación por ello se efectuó la hidrólisis alcalina de los grupos metilos de este compuesto de la pared celular.

Se pesaron 200 mg de pared celular y se colocaron en un frasco vial al que se le añadieron 1.7 ml de H₂O y 0.3 ml de NaOH 1M, se tapó perfectamente, se sonicó por 4 minutos y se dejó agitando toda la noche (16 horas) a 25°C. El ultrasonido se utilizó con el objeto de romper estructuras y facilitar la exposición de los grupos carboxilos esterificados con metanol a la acción desmetilante de la sosa.

Al día siguiente se precipitaron las proteínas del hidrolizado añadiéndole 0.4 ml de una mezcla fosfórico-fórmico que estaban en proporción 3 a 1 y se centrifugó a 12,100 x g por 10 minutos a 4°C.

La centrifugación a 4°C fue para evitar que el metanol producido en la hidrólisis alcalina se escapara.

Se debe señalar que con la precipitación se logró que el hidrolizado se aclarara un poco ya que originalmente se encontraba muy turbio.

La pastilla se desechó y el sobrenadante se inyectó casi inmediatamente al cromatógrafo de gases.

3.10.2 Análisis Cromatográfico

La cuantificación de los productos obtenidos durante la hidrólisis alcalina de la pared celular se hizo por cromatografía de gases.

Para ello se utilizó una columna de acero inoxidable de 6 pies de largo X 1/8 pies de diámetro con Carbowax 20M al 10 % sobre Chromosorb W H P 80-100.

Primero se buscaron las condiciones en las cuales en nuestra columna se separaran apropiadamente, el metanol de los demás componentes que se pensaba podrían estar presentes en el hidrolizado como el etanol y otros compuestos volátiles.

Se encontró que con temperaturas del detector a 200°C, el inyector a 150°C y la columna a 60°C, se podría separar en forma aceptable.

Es decir en esas condiciones cada uno de los compuestos tiene un tiempo de retención característico que no se sobrepone con ningún otro y que es reproducible si se mantienen las condiciones constantes. De esta manera se determinó el tiempo de retención del metanol el cual es muy importante para su reconocimiento entre los picos que resultan en un cromatograma de la muestra. (McNair 1981)

En cromatografía de gases es recomendable inyectar volúmenes pequeños de muestra de 1 a 3 μ l. De esa forma se hizo la curva patrón de metanol inyectando de 1 a 3 μ l de una solución de metanol al 0.1 %. Sin embargo se tuvieron que inyectar hasta 5 μ l de nuestro hidrolizado debido a las concentraciones tan bajas de metanol que se tenían.

Hay que aclarar que debido a esto y a que en nuestro sistema existe una gran cantidad de compuestos orgánicos como grasas, carbohidratos, etc. se tuvieron muchos problemas con la columna la cual se ensuciaba muy rápidamente y se tapaba por lo que era preciso cambiarla por una nueva.

Fue por ello que se pensó en agregarle una precolumna de 12.5 cm de largo con OV 101 al 3 % en la parte del inyector que era generalmente la que mayor problema presentaba. La precolumna

aunque no es usada para este tipo de columnas tuvo aparentemente un buen resultado ya que por una parte la columna no se volvió a tapar (aunque seguía ensuciándose) y por otra no se afectó la eficiencia de la columna.

Las muestras inmediatamente obtenidas se inyectaban, haciendo previamente en cada ocasión la curva patrón de metanol, de esta manera se calculaba la concentración de este alcohol de acuerdo a las condiciones de la columna en ese momento .

La cuantificación del metanol de la muestra se hacía en base a la curva patrón de metanol comercial en la cual se relaciona la cantidad de metanol inyectada con el área bajo la curva obtenida.

En el cromatograma de la muestra el metanol era reconocido entre los demás picos en base a su tiempo de retención.

En el diagrama 3.1 se muestra en forma esquemática las diversas determinaciones practicadas al grano de frijol para el logro de los objetivos planteados en este trabajo.

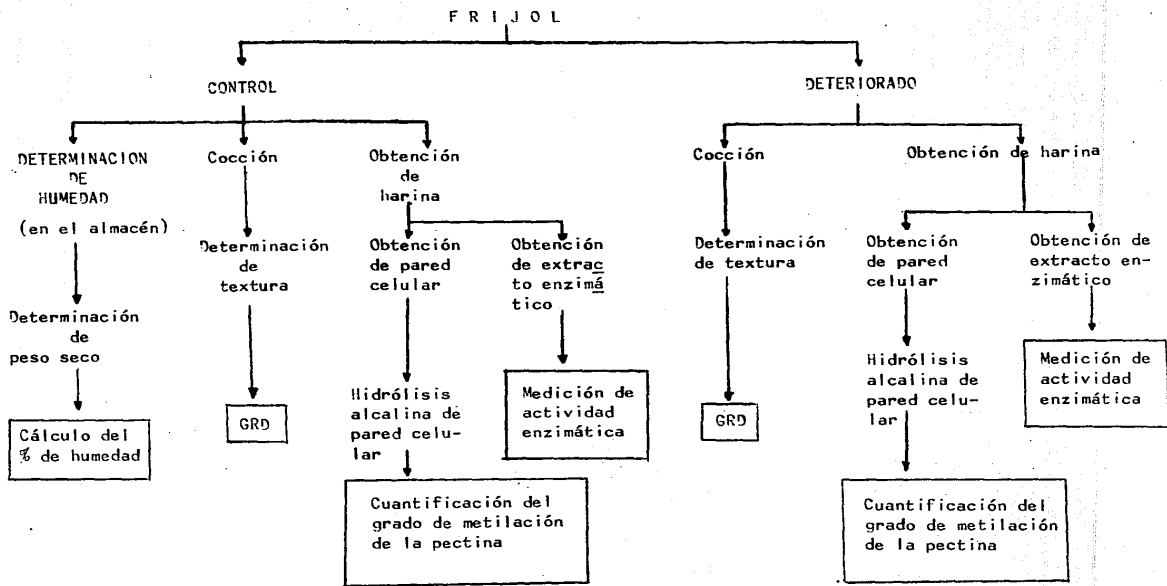


Diagrama 3.1 Determinaciones practicadas al grano de frijol.

IV. RESULTADOS

Los resultados de este trabajo se plantearán en dos partes: la primera de las cuales abarcará el efecto del almacenamiento en la textura del grano y la siguiente los experimentos bioquímico-fisiológicos llevados a cabo en el grano almacenado.

4.1 Efecto del almacenamiento sobre la textura del frijol.

El frijol cuando es almacenado en condiciones adversas se deteriora (Hincks y Stanley 1986; Aguilar y Ballivian 1987; Stanley y Hohlberg 1987). El grado de deterioro que alcanza depende del tiempo de almacenamiento así como de la temperatura y de la humedad relativa en el almacén.

Esta pérdida de calidad del frijol se manifiesta durante el proceso de cocción. El grano almacenado requiere de mayor tiempo de cocción para suavizarse que el requerido por un frijol que no ha sido almacenado. De tal suerte que un parámetro para estimar el deterioro que sufre el grano durante su almacenamiento es determinar la textura del grano durante la cocción la cual refleja su grado de dureza.

En el desarrollo de este trabajo experimental se utilizó frijol con diversos grados de deterioro, el cual se obtuvo almacenando el grano durante 7, 14, 21 y 33 días a 41°C y 75 % de humedad relativa.

Para cuantificar el grado de deterioro de cada una de las variedades utilizadas a los distintos días de almacenamiento se determinó la textura del grano a 2 tiempos de cocción 45 y 90 minutos. Tales tiempos fueron escogidos porque en un experimento previo de cinética de cocción, se encontró que a lo largo de 120 minutos de cocción el ablandamiento del grano era monotonico. (Quiroz, R. 1989)

La textura del grano o grado de ablandamiento a los dos tiempos de cocción utilizados fue cuantificada como la fuerza en Kilogramos requerida para romper una cantidad conocida de grano y los resultados reportados como el grado relativo de dureza (GRD). Este es el cociente resultante de dividir la textura que presenta el frijol cocido durante un tiempo dado a cualquier periodo de almacenamiento entre la textura que presenta el grano cocido al iniciarse el tratamiento es decir al tiempo cero de almacenamiento.

La textura del grano al tiempo cero de cocción no se pudo cuantificar debido a que la fuerza requerida para romperlo era mayor a la capacidad de la celda disponible, su valor fue calculado por extrapolación en las graficas de textura contra tiempo de cocción.

Las graficas que se obtienen en el Instron, utilizando la celda Kramer representan la fuerza que hay que aplicar al grano para romperlo. Observando estas graficas se puede apreciar que en algunas de las curvas, la minoria, se dibujan claramente 2 picos mientras que en la mayoria se presenta un solo pico bien definido y posteriormente un gran abultamiento al final, lo anterior se

ejemplifica para algunas variedades en la fig. 3.1 (a y b).

Este tipo de comportamiento también se ha observado cuando la textura del grano se determina en el frijol utilizando un penetrómetro y se ha interpretado como que el primer pico corresponde a la resistencia a la penetración de la estructura del grano dada principalmente por la testa y la pared celular mientras el segundo pico, corresponde a las propiedades reológicas del frijol como sería la viscosidad del almidón y otros constituyentes intracelulares. (Hincks y Stanley 1986)

Otros autores proponen que el primer pico corresponde a la oposición de la testa a la penetración y el siguiente pico a la oposición del cotiledón y del resto de la testa. (Hincks y Stanley 1986)

En este trabajo se decidió analizar los valores de textura en relación con el almacenamiento considerando únicamente el primer pico de la gráfica (fig. 3.1) generada en el Instron, debido a que Voisey y Larmond (1971) encontraron que existe una gran correlación entre el primer pico y el área bajo la curva de las gráficas generadas en tal instrumento de cuantificación de textura.

El cambio en el grado relativo de dureza (GRD) de las diferentes variedades a los distintos días de almacenamiento aparece en las figuras 3.2 y 3.3. Los resultados representan la textura alcanzada por el grano a los tiempos de cocción de 45 (fig. 3.2) y 90 (fig. 3.3) minutos y son el resultado del promedio de una cuantificación hecha por triplicado.

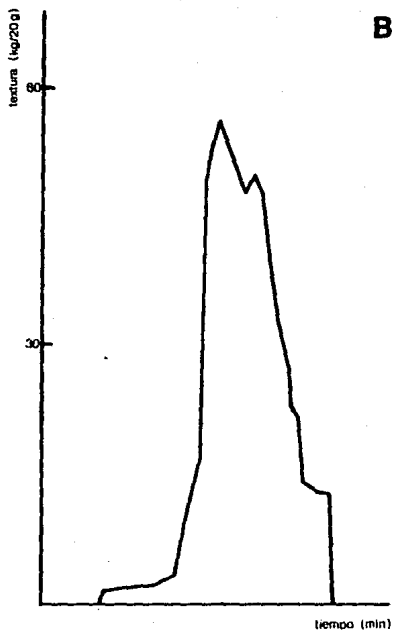
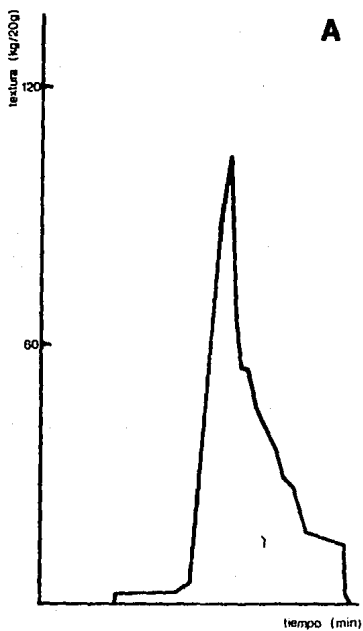


Fig 3.1a. Registro grafico de la dureza al corte que presentan 20g de frijol Negro Veracruz Control con dos tiempos de cocción. La dureza fue determinada en un texturometro Universal Instrón Modelo A 1022

A 45 minutos de cocción

B 90 minutos de cocción

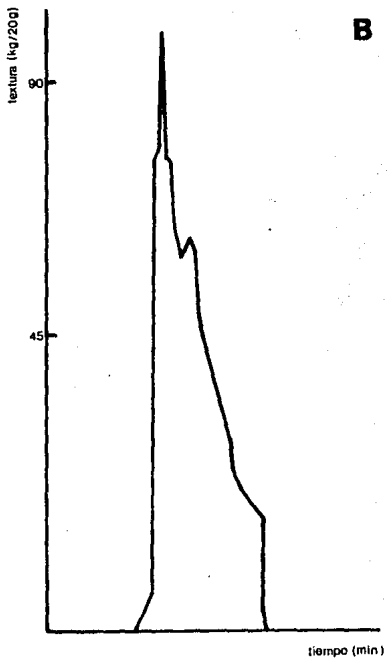
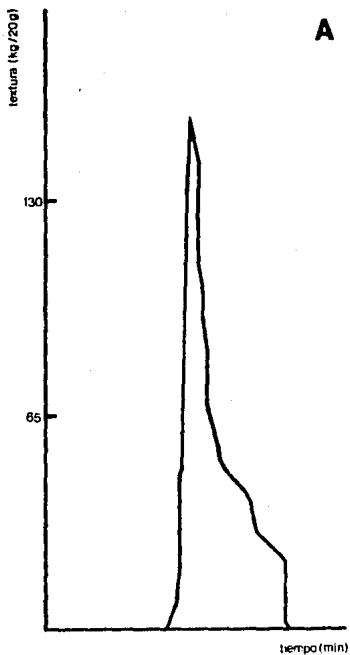


Fig 3.1 b. Registro gráfico de la dureza al corte que presentan 20 g de frijol Ojo de Cabra con 33 días de deterioro a dos tiempos de cocción. La dureza fue determinada en un Texturómetro Universal Instrón Modelo A 1022.

A 45 minutos de cocción

B 90 minutos de cocción

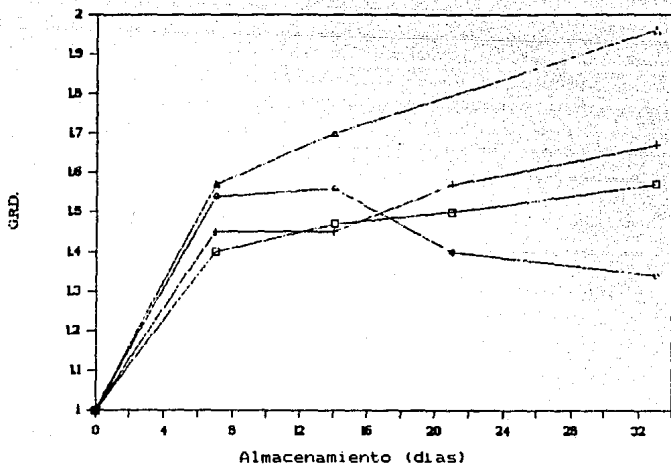


Fig. 3.2 a Efecto del almacenamiento en la dureza relativa de diversas variedades de frijol. El almacenamiento del grano se hizo hasta 33 días a 40°C y 75 % de humedad relativa. El grado relativo de dureza (GRD) se obtuvo dividiendo la textura del grano con 45 minutos de cocción a cualquier tiempo de almacenamiento entre la textura del grano fresco al mismo tiempo de cocción. En todos los casos la textura se registró en un Instron.

- Δ N. Jamapa
- ◊ O. de Cabra
- + N. Veracruz
- ◻ Michigan

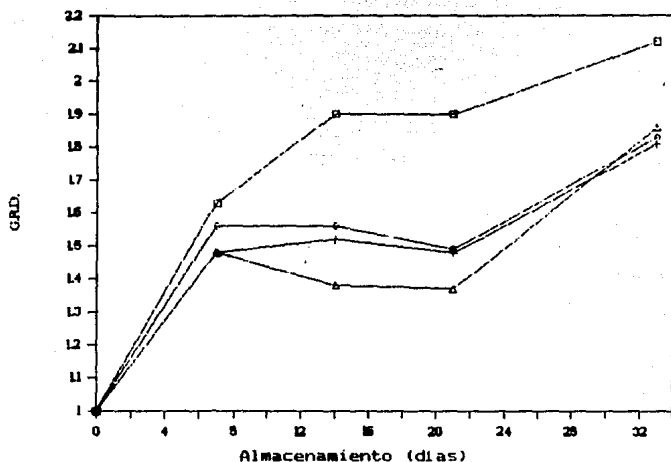


Fig. 3.2 b Efecto del almacenamiento en la dureza relativa de diversas variedades de frijol. El almacenamiento del grano se hizo hasta 33 días a 40°C y 75 % de humedad relativa. El grado relativo de dureza (GRD) se obtuvo dividiendo la textura del grano con 45 minutos de cocción a cualquier tiempo de almacenamiento entre la textura del grano fresco al mismo tiempo de cocción. En todos los casos la textura se registró en un Instron.

- Δ P. Nacional
- ◊ Bayo 400
- + N. Huasteco
- ◻ C. Jalisco

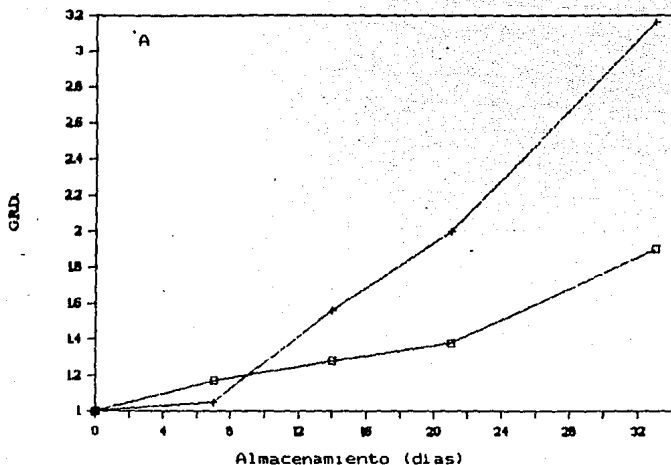
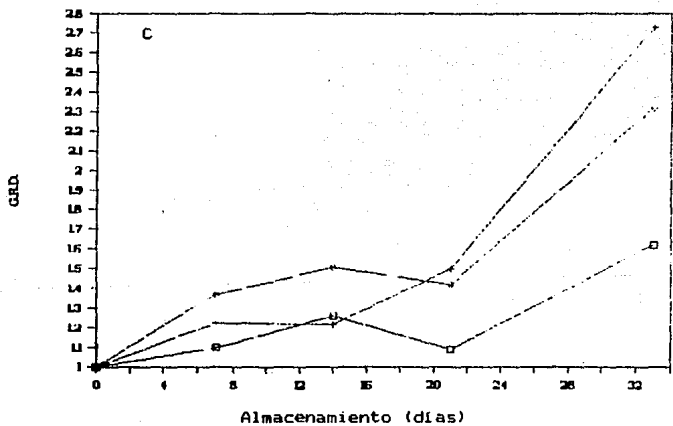
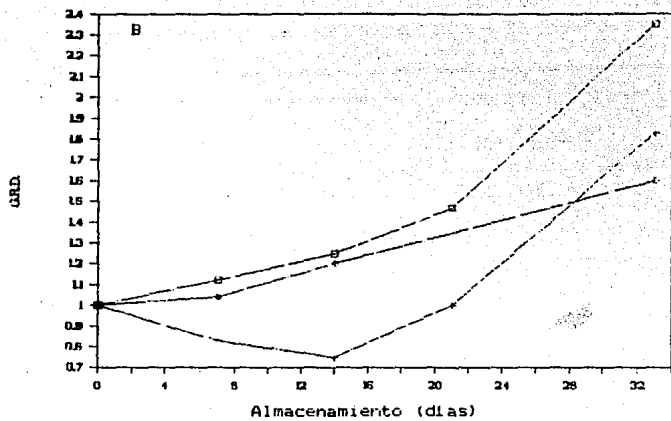


Fig. 3.3 Efecto del Almacenamiento en la dureza relativa de diversas variedades de frijol. El almacenamiento del grano se hizo hasta 33 días a 40°C y 75 % de humedad relativa. El grado relativo de dureza (GRD) se obtuvo dividiendo la textura del grano con 90 minutos de cocción a cualquier tiempo de almacenamiento entre la textura del grano fresco al mismo tiempo de cocción. En todos los casos la textura se registró en un Instron.

Las variedades están agrupadas por color:

- A) bayos + Michigan □ Bayo 400
 B) negros + N. Huasteco □ N. Veracruz ◊ N. Jamapa
 C) pintos + P. Nacional □ O de Cabra ◊ C. Jalisco

Fig. 3.3 continuación



En las gráficas, en general, se puede apreciar que en las condiciones de deterioro utilizadas las variedades estudiadas tienden a aumentar su dureza, es decir, requieren de un mayor tiempo para su suavización a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento, lo anterior se observa a ambos tiempos de cocción utilizados, también puede notarse que el grado de endurecimiento alcanzado por cada variedad no es el mismo .

Tratando de agrupar las variedades de acuerdo a su tendencia al deterioro, con los datos de textura se realizó un análisis de varianza y comparación de medias (Prueba de Schéfe, Winer, 1971).

Los resultados a los 45 minutos de cocción (fig. 3.2) muestran que durante los 7 primeros días de almacenamiento las variedades se deterioran muy rápidamente, al final de tal periodo, en todos los casos ya existen diferencias significativas (α 0.99) respecto al control.

El análisis de las gráficas de la fig. 3.2 permite agrupar a las variedades estudiadas en 2 grupos. Aquellas que presentan solo 2 velocidades de endurecimiento durante todo el periodo estudiado y las que presentan 3. En el primer grupo (fig 3.2 a) estarían Michigan, Negro Veracruz, Negro Jamapa y Ojo de Cabra donde el cambio de velocidad de endurecimiento, dado por el cambio de pendiente, se realiza a los 7 días y posteriormente presentan un endurecimiento casi nulo, mientras que en el segundo (fig. 3.2 b) estarían Pinto Nacional, Negro Huasteco y Bayo 400 con 2 periodos rápidos de endurecimiento de 0 a 7 días y de 21 a 33 días separados por un periodo en que el endurecimiento no aumenta con el tiempo de almacenamiento. El Cacahuete Jalisco también caería

dentro de este segundo grupo solo que el primer período de rápido endurecimiento se prolonga hasta los 14 días.

Analizando de igual forma los resultados obtenidos a 90 minutos de cocción en la fig. 3.3 (A, B y C) de las 8 variedades estudiadas, unicamente Bayo 400 y Cacahuate Jalisco presentan un endurecimiento muy rápido durante los 7 primeros días de almacenamiento. Las otras variedades muestran un endurecimiento más lento no presentando durante tal período diferencias significativas respecto al control.

Posteriormente y a medida que el tiempo de almacenamiento transcurre todas las variedades a excepción de Michigan y Cacahuate Jalisco presentan en forma sostenida un pequeño incremento en su endurecimiento. Sin embargo lo que verdaderamente llama la atención es el gran cambio de textura ó aumento de dureza que se presenta en todas las variedades entre los días 21 y 33 de almacenamiento. Tales aumentos van de un 50 % al 100 % dependiendo de la variedad.

En cuanto a las variedades Michigan y Cacahuate Jalisco se tiene que la primera, se endurece rapidamente a partir del séptimo día mientras que la segunda presenta un comportamiento incierto hasta el día 21 de almacenamiento. (fig. 3.3)

El grado de dureza observado en las variedades a los 33 días de almacenamiento depende de si en la determinación del parámetro se utilizan los datos generados a los 45 o a los 90 minutos de cocción (Tabla I), ya que por ejemplo Michigan, Negro Veracruz, Ojo de Cabra y Pinto Nacional presentan un mayor deterioro si el G.R.D. se determina a los 90 minutos de cocción que a los 45

TABLA I. GRADO RELATIVO DE DUREZA A 45 Y 90 MINUTOS DE COCCION DE DIVERSAS VARIETADES DE FRIJOL ALMACENADAS DURANTE 33 DIAS

Variedad ^a	Tiempo de Cocción (Minutos)	
	45	90
	G.R.D. ^b	
O. Cabra *	1.34	1.61
P. Nacional *	1.86	2.73
C. Jalisco *	2.12	2.31
N. Huasteco □	1.82	1.83
N. Veracruz □	1.67	2.35
N. Jamapa □	1.97	1.60
Michigan ■	1.57	3.16
Bayo 400 ■	1.81	1.90

a) Agrupados por color de testa

- * Pintos
- Negros
- Bayos

b) Variedades comparadas en dureza a los 0 y a los 33 días de almacenamiento. Analizando el primer pico de la gráficas generadas en el Instron.

GRD = Grado Relativo de Dureza

El grado relativo de todas las variedades al tiempo cero de almacenamiento es uno.

minutos, mientras que Cacahuate Jalisco, Bayo 400 y Negro Huasteco presentan un mismo grado de deterioro independientemente del tiempo utilizado para su determinación en el proceso de cocción.

Contrastando con estos dos comportamientos se encuentra al Negro Jamapa el cual presenta menor grado de dureza o de deterioro a los 90 minutos de cocción que a los 45 min.

4.2 Niveles de hidratación del grano de frijol durante su almacenamiento

El frijol almacenado en condiciones de alta humedad relativa y alta temperatura tiende a tomar agua en forma paulatina hasta que su contenido de humedad se equilibra con las condiciones externas.

El agua que toma el grano mientras esta almacenado es muy importante ya que al llegar a un cierto nivel, puede inducir cambios fisicoquímicos en las estructuras y/o componentes del grano que podrían participar en el fenómeno del endurecimiento. Por ejemplo activación de enzimas: proteasas, pectinmetilesterasa, fitasa, peroxidasas etc., cambios en la estructura de la pared celular, entrecruzamiento de proteínas, mal ensamblaje de membranas etc. (Hincks y Stanley 1986)

Lo anterior sugiere que la cantidad de agua tomada por el grano así como la velocidad con que la toma podrían influir en el comportamiento del frijol en el almacén.

Dado que las variedades de frijol aquí utilizadas presentan diferencias en cuanto a su susceptibilidad al endurecimiento se

determinó la velocidad de hidratación de cada variedad en las condiciones de trabajo 41°C y 75 % de H.R. y se buscó alguna correlación entre ellas.

La velocidad de hidratación de las 8 variedades se presenta en las figuras 3.4, 3.5 y 3.6 como el promedio de los resultados de 2 repeticiones independientes hechas por triplicado.

La cinética de toma de agua se siguió por espacio de 14 días, ya que se observó que los frijoles a partir de los primeros días de almacenamiento dependiendo de la variedad alcanzan un porcentaje de hidratación en que se mantienen constantes. Debido a ello no se consideró importante abarcar un período de tiempo más amplio.

En las tres figuras, se puede apreciar que originalmente todas las variedades presentan entre un 7 y un 8 % de contenido de humedad. Tal contenido de humedad se va modificando de diferente manera en las distintas variedades. Durante los 3 primeros días de almacenamiento existen 2 grupos estadísticamente diferentes.

Uno de los grupos formado por las variedades Michigan, Negro Jamaña, Ojo de Cabra, Pinto Nacional y Bayo 400 que presentan una velocidad de toma de agua menor (figs. 3.4 y 3.5) que la que presentan las variedades Cacahuate Jalisco, Negro Huasteco y Negro Veracruz que forman el otro grupo (fig. 3.6).

A partir del quinto día los grupos desaparecen y siete de las variedades tienen un comportamiento similar. Todas ellas se mantienen a partir de ese momento en el grado de hidratación que alcanzaron hasta entonces, el cual, está en equilibrio con las condiciones de almacenamiento. Tal grado de hidratación es de un 22 a 24% en cinco de las variedades y de un 18% para las otras

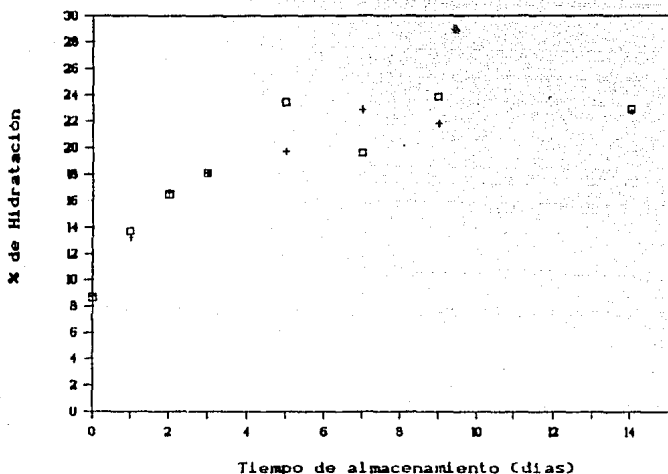


Fig.3.4 Velocidad de hidratación durante un periodo de 14 días en las condiciones de almacenamiento utilizadas (40°C y 75 % de H. R) de las variedades (□) Bayo 400 y (+) Pinto Nacional. Estas variedades junto con Michigan, Ojo de Cabra y Negro Janapa forman un sólo grupo estadísticamente definido en cuanto a su velocidad de toma de agua durante los 3 primeros días de almacenamiento con un $\alpha = 0.95$ en un análisis de varianza y una comparación de medias Prueba de Schéfe.

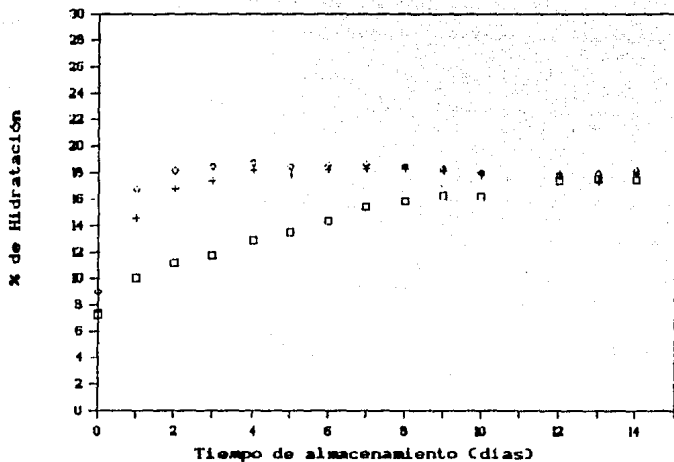


Fig.3.5 Velocidad de hidratación durante un período de 14 días en las condiciones de almacenamiento utilizadas (40°C y 75 % de H. R.) de las variedades (□) Ojo de Cabra, (+) Negro Jamapa y (○) Michigan.

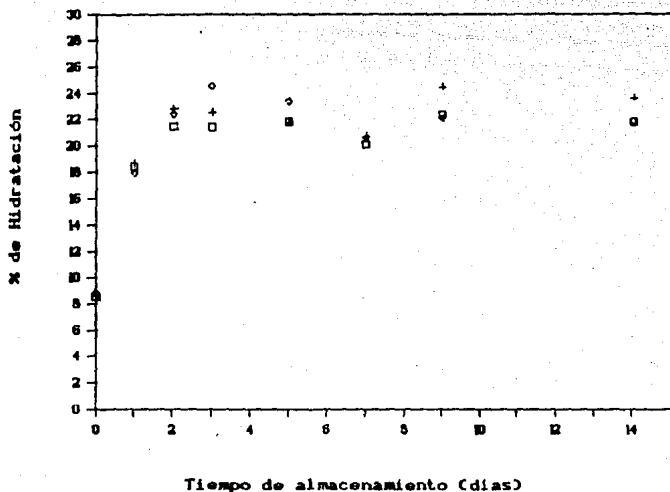


Fig.3.6 Velocidad de hidratación durante un periodo de 14 días en las condiciones de almacenamiento utilizadas de las variedades (□) Negro Huasteco, (+) Negro Veracruz y (◊) Cacahuate Jalisco las cuales forman un sólo grupo estadísticamente definido en cuanto a su velocidad de toma de agua durante los 3 primeros días de almacenamiento a 0.95 con un análisis de varianza y una comparación de medias Prueba de Schéfe.

dos: Michigan y Negro Jamapa.

La variedad Ojo de Cabra por su parte, se comporta de manera diferente a las demás, debido a que presenta una menor velocidad de hidratación y aumenta gradualmente su contenido de humedad y tarda doce días en equilibrarse a un 18 % con la humedad relativa del ambiente.

Si se comparan los resultados anteriores, con la textura que presentan los diferentes grano después de 33 días de almacenamiento (Tabla I), se puede ver que a los 45 minutos de cocción se presenta en la mayoría de las variedades una gran concordancia entre la velocidad con la que toman el agua en el almacén y su tendencia a endurecerse. De tal manera que las variedades que toman el agua con mayor rapidez parecen ser más susceptibles a endurecerse, con excepción de Negro Jamapa y Negro Veracruz.

Para los 90 minutos de cocción, aparentemente no existe relación entre ambos parámetros.

4.3 Correlación entre la dureza del grano y el grado de metilación de la pared celular.

El ablandamiento de frijol que ocurre durante el proceso de cocción es debido según la hipótesis más aceptada a la separación de las células del cotiledón; tal separación es menor o no se presenta en el caso del grano endurecido que ha sido almacenado en condiciones adversas. Debido a ello se ha planteado que el

problema del endurecimiento de frijol guarda estrecha relación con tal falla en la separación celular. (Jones y Boulter 1983; Stanley y Aguilera 1985; Hincks y Stanley 1986)

Las células del cotiledón se encuentran unidas por la lámina media, la cual, se encuentra constituida, entre otras sustancias, por pectina. En un frijol fresco se ha planteado que la pectina se solubiliza durante la cocción, favoreciendo el proceso de separación celular, mientras que, en un grano duro la solubilización de la pectina es menor. En base a lo anterior se ha sugerido que el proceso de endurecimiento podría ser provocado, entre otros factores, por cambios que sufre la pectina durante el almacenamiento del grano. Observaciones previas han mostrado que en un grano deteriorado existe una disminución en el contenido de grupos metilos de la pectina en comparación con un grano recién cosechado (Jones and Boulter 1983); esto se ha interpretado como que este fenómeno de desmetilación puede estar relacionado estrechamente con el endurecimiento del grano, sin embargo, no se puede concluir que esto sea cierto hasta realizar estudios de la cinética de endurecimiento que comprueben que efectivamente a medida que un frijol se va endureciendo, el grado de metilación de la pectina va disminuyendo proporcionalmente.

A fin de responder a esta pregunta se cuantificó el grado de metilación de la pectina en el frijol fresco o control y a los diferentes días de almacenamiento en nuestras condiciones de trabajo, para observar cuál es su comportamiento a medida que el frijol se va endureciendo y posteriormente correlacionarlo con la dureza alcanzada por el grano.

Los resultados que se aprecian en la tabla II muestran el promedio de los valores obtenidos en dos cuatificaciones hechas por duplicado cada una, para cinco variedades que se escogieron como representativas de las diferentes susceptibilidades al endurecimiento. El contenido inicial de grupos metilo cuantificado como mg de metanol/g de pared celular es diferente para cada variedad presentando menor grado de metilación las variedades más susceptibles al deterioro (Pinto Nacional y Cacahuete Jalisco). Todas las variedades entre cero y 21 días de deterioro sufren una disminución en el contenido de los grupos metilos de la pectina. La disminución observada, no es la misma, sin embargo, para todas ellas ya que algunas sufren una desmetilación del orden del 30% mientras otras alcanzan sólo un 10%.

Arreglando las variedades en orden decreciente de desmetilación de acuerdo con los datos de la tabla II, se encuentra que Bayo 400 y Negro Huasteco son las variedades con la mayor pérdida de grupos metilos 29.6 % y 28.2 % respectivamente. Las siguientes tres variedades muestran una desmetilación bastante más pequeña que las anteriores, ya que Cacahuete Jalisco, Pinto Nacional y Negro Veracruz apenas alcanzan un 13.1, 10.1 y 11.4% de desmetilación respectivamente.

Comparando estos resultados con los de desarrollo de dureza de las distintas variedades en el almacén se puede ver que no existe correlación directa entre la susceptibilidad o resistencia al endurecimiento de una variedad y el porcentaje de desmetilación de la pectina. Así Cacahuete Jalisco y Pinto Nacional con una desmetilación pequeña aparecen como variedades muy susceptibles.

TABLA II DESMETILACION DE LA PECTINA MOSTRADA POR DIVERSAS VARIETADES DE FRIJOL DURANTE SU ALMACENAMIENTO POR 33 DIAS A 40° C Y 75 % DE HUMEDAD RELATIVA

Variedad	Tiempo de Almacenamiento (días)		% Diminución
	0	21	
	mg de Metanol/g de P.C.		
B. 400 *	2.09	1.47	29.66
P. Nacional ◻	1.39	1.25	10.07
C. Jalisco ◻	1.53	1.33	13.07
N. Veracruz ■	1.84	1.63	11.41
N. Huasteco ■	1.70	1.22	28.23

a) Agrupadas según el color de la testa

- * Bayos
- ◻ Pintos
- Negros

4.4 Cambios en los niveles de Actividad de la enzima Pectinmetilesterasa durante el almacenamiento del grano.

El fenómeno del endurecimiento es muy complejo, se ha sugerido que en él intervienen muchos factores y debido a ello, se han planteado diferentes hipótesis para tratar de explicarlo. Una de las hipótesis propuestas, como ya se ha mencionado, es la que señala a la desmetilación que sufre la pectina en un frijol almacenado como uno de los factores responsables del endurecimiento del grano.

La desmetilación de la pectina es producida por hidrólisis que puede ser ácida, alcalina o enzimática, siendo en este caso, la tercera la única que tiene condiciones apropiadas para ocurrir *in vivo*, ya que normalmente, el pH celular es constante. La enzima que podría ser responsable de esta desmetilación es la Pectinmetilesterasa, la cual, se cree que se encuentra activa durante el almacenamiento del grano en condiciones adversas.

De ser cierto lo que se señala en el párrafo anterior se tendría que observar que existe una correlación entre el grado de desmetilación de la pectina y los niveles de actividad enzimática. Sin embargo, hasta ahora no se han reportado datos de la actividad de esta enzima y de su relación exacta con el proceso de desmetilación de la pectina en el grano de frijol. Por ello se decidió cuantificar los niveles de actividad de dicha enzima en el frijol control y observar como se modifica esta a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento para posteriormente

correlacionar tales resultados con la existencia o no de desmetilación de la pectina y el aumento de dureza en el grano.

Los resultados se presentan en las figuras 3.7 y 3.8 como el promedio de 2 repeticiones independientes hechas por triplicado.

Ambas gráficas muestran las 2 tendencias seguidas por las variedades, respecto a la actividad de la enzima pectinmetil esterasa, durante su almacenamiento en condiciones adversas.

La primera de las cuales que corresponde a las variedades Negro Huasteco, Negro Veracruz y Cacahuete Jalisco es que la actividad de la enzima, se mantiene constante a lo largo del tiempo de almacenamiento (Fig 3.7).

La otra tendencia que muestran las variedades Bayo 400 y Pinto Nacional es que la actividad enzimática se mantiene constante en los primeros 7 días de almacenamiento, posteriormente entre 7 y 15 días existe una disminución significativa en la actividad (α 0.99), a partir de este momento la actividad ya no varía y se mantiene constante (fig. 3.8).

Sin embargo, a pesar de que se presentan estas 2 tendencias bien claras, no es posible agrupar a las variedades de una forma bien definida estadísticamente.

Es por ello que al observar los resultados y ver las diferencias en las actividades enzimáticas entre las distintas variedades, únicamente se puede decir que Bayo 400 es la variedad que presenta la mayor actividad seguida por las variedades Pinto Nacional, Cacahuete Jalisco, Negro Veracruz y Negro Huasteco en orden descendente de actividad. Ocurriendo durante todo el tiempo de almacenamiento, que Bayo 400 tenga siempre los niveles más

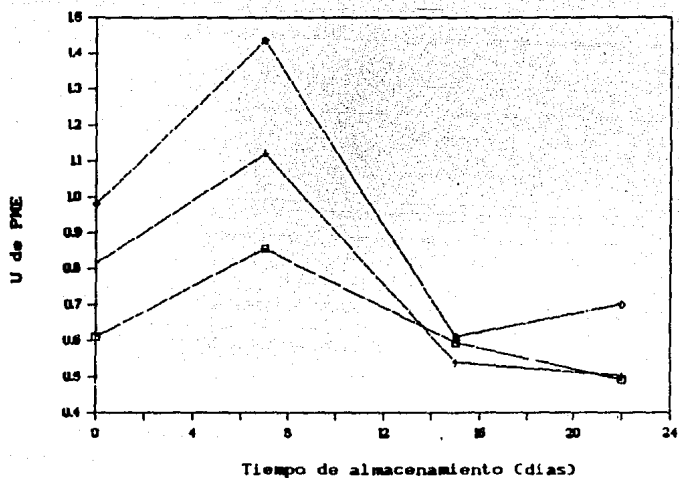


Fig.3.7 Actividad de la enzima Pectinmetilesterasa (PME) de las variedades (◻) Negro Veracruz, (+) Negro Huasteco y (◊) Cacahuate Jalisco a los diferentes tiempos de almacenamiento a 40°C y 75 % de humedad relativa.

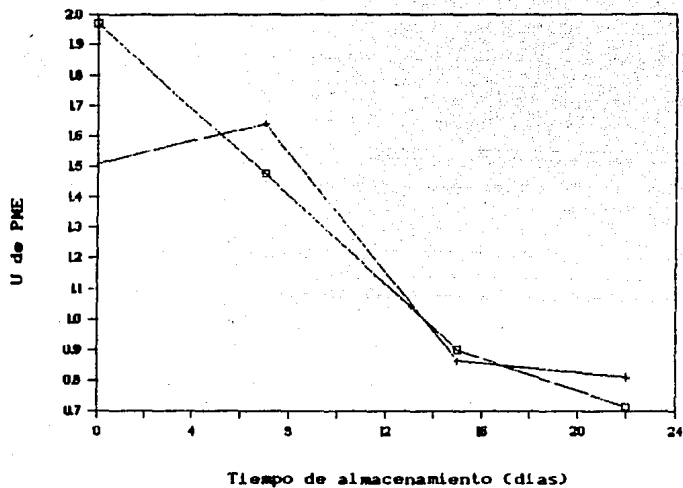


Fig.3.8 Actividad de la enzima Pectinmetilesterasa (PME) de las variedades (□) Bayo 400 y (+) Pinto Nacional a los diferentes tiempos de almacenamiento a 40°C y 75 % de humedad relativa.

altos de actividad enzimática, mientras que Negro Veracruz y Negro Huasteco los niveles más bajos.

La comparación de los resultados anteriores con los obtenidos del por ciento de desmetilación, nos indica que los niveles de desmetilación no dependen de la actividad de la Pectinmetilesterasa presente en el grano ya que con solo la mitad de la actividad presente en Bayo 400 el Negro Huasteco sufre el mismo porcentaje de desmetilación.

V DISCUSION

La cocción del frijol es un proceso continuo que comprende diversos eventos, remoción de iones divalentes de la lamela media (Mattson 1946; Elias 1982; Jones y Boulter 1983), salida de ácido fítico y proteínas del protoplasto (Elias 1982; Aguilera y Stanley 1985) y solubilización de pectinas de la lamela media (Sefa-Dedeh y Stanley 1979^o; Loh et al 1982; Van Buren 1986). Estos eventos pueden realizarse en forma simultánea a diferentes velocidades o bien en forma sucesiva, resultando de cualquier modo en la suavización del grano.

Las condiciones de almacenamiento utilizadas en este trabajo permitieron obtener grano con una menor velocidad de cocción (Figs.3.2, 3.3 y Tabla I) lo que sugiere que en frijol endurecido los eventos que participan en el proceso de cocción se realizan en forma similar al control pero a menor velocidad. Durante el almacenamiento las 8 variedades se endurecen con respecto al control, sin embargo, el grado de dureza que muestra el grano almacenado con respecto al control depende de si la comparación se hace en el periodo de almacenamiento comprendido entre 0 y 21 días ó entre 0 y 33 días ó si el G.R.D. se obtiene a los 45 ó a los 90 minutos de cocción para un mismo tiempo de almacenamiento.

Estos resultados se han interpretado como que durante los primeros 45 minutos de cocción del grano se realizan ciertos

eventos que serán llamados "eventos A" que permiten alcanzar cierto grado de suavidad en el grano, mientras que a los 90 minutos se han realizado los "eventos A" más otros diferentes que llamaremos " B " y que aumentan aún más la suavidad del grano. Los resultados también indican que en las variedades aquí estudiadas estos eventos presentan diferente susceptibilidad al almacenamiento. Durante los primeros 21 días de almacenamiento los "eventos A" sufren mayor deterioro que los " B " (Tabla III). La dureza relativa que presenta el grano durante los primeros 21 días de almacenamiento es mayor cuando la determinación se hace a los 45 minutos que a los 90 minutos de cocción (Tabla III). Esto podría deberse a que a los 45 minutos de ebullición los "eventos A" se efectúan sólo parcialmente porque su velocidad ha disminuido por el deterioro sufrido en el almacén , sin embargo, 90 minutos de cocción es tiempo suficiente para que se efectúen en su totalidad, de tal forma que la suavidad adquirida a los 90 minutos dependa sólo de los "eventos B" los cuales se han deteriorado en menor proporción que los " A " como lo indica el menor grado relativo de dureza que presentan los granos almacenados cuando la determinación se hace a este tiempo.

En el periodo de almacenamiento comprendido desde 0 hasta 33 días (Tabla I) las variedades estudiadas se pueden agrupar en 3 tipos: I) las que presentan mayor grado de dureza si la comparación se hace a los 90 minutos que si se hace a los 45 minutos, tal es el caso de las variedades Negro Veracruz, Ojo de Cabra, Pinto Nacional, Cacahuate Jalisco y Michigan ; II) las que presentan igual grado de dureza si la comparación se hace a

**TABLA III. GRADO RELATIVO DE DUREZA A 45 Y 90 MINUTOS DE COCCION
 DE DIVERSAS VARIETADES DE FRIJOL ALMACENADO DURANTE
 21 DIAS**

Variedad ^a	Tiempo de Cocción (Minutos)	
	45	90
G.R.D. ^b		
O. Cabra *	1.40	1.10
P. Nacional *	1.36	1.49
C. Jalisco *	1.90	1.41
N. Huasteco □	1.49	1.00
N. Veracruz □	1.56	1.46
N. Jamapa □	1.85	1.36
Michigan ■	1.49	1.98
Bayo 400 ■	1.48	1.38

a) Agrupados por color de testa

- * Pintos
- Negros
- Bayos

b) Variedades comparadas en dureza a los 0 y a los 21 días de almacenamiento. Analizando el área bajo la curva de las gráficas generadas en el Instrón.

GRD = Grado Relativo de Dureza

El grado relativo de todas las variedades al tiempo cero de almacenamiento es uno.

cualquiera de los tiempos de ebullición ya mencionados Bayo 400 y Negro Huasteco y por último ; III) las que presentan mayor grado relativo de dureza cuando la comparación se hace a los 45 minutos que a los 90 minutos de cocción Negro Jamapa.

Lo anterior sugiere que entre 21 y 33 días de almacenamiento se presenta modificación en mayor grado en los "eventos B" que ocurren a los 90 minutos de cocción.

Estos resultados sugieren que este tiempo de almacenamiento es suficiente para que en algunas variedades los "eventos B" se deterioren en mayor proporción que los "A" (Tipo I), ó que se deterioren en igual proporción (Tipo II) ó bien que no se alcancen a deteriorar los "eventos B" durante este periodo de almacenamiento (Tipo III).

En lo sucesivo las variedades tipo I se denominaran susceptibles, las tipo II medianamente susceptibles y las tipo III resistentes.

Entre los factores que podrían estar jugando algún papel en la susceptibilidad al endurecimiento que muestran las diversas variedades de frijol en el almacén se pueden mencionar: A) la actividad del agua en el grano (Jones y Boulter 1983; Hincks y Stanley 1986); B) cambio en los niveles de quelantes citoplásmicos presentes en el grano (Kon 1979; Sievwright y Shipe 1986 Hincks y Stanley 1987) y C) modificación de constituyentes celulares (Essau 1977; Varriano-Marston *et al* 1981; Elias 1982) que repercuten en cambios en la estructura del grano (Varriano Marston *et al* 1981; Elias 1982). A continuación se discutirán cada uno de estos

parámetros en relación a los datos obtenidos en este trabajo.

A) Actividad de agua en el grano. Las variedades aquí estudiadas toman agua a distintas velocidades durante los 3 primeros días de almacenamiento (Figs. 3.4, 3.5 y 3.6).

Tomando en cuenta esta característica se pueden formar 2 grupos que son similares a los que se forman cuando las mismas se agrupan de acuerdo a su susceptibilidad al deterioro a los 33 días de almacenamiento (Tabla I) cuando la determinación se hace a los 45 minutos de cocción. Esto sugiere que existe una correlación entre la velocidad de toma de agua y la susceptibilidad al deterioro de los "eventos A".

Esta sugerencia se ve apoyada por el hecho de que a excepción de Ojo de Cabra todas las variedades estudiadas poseen el mismo contenido de agua a los 7 días de almacenamiento (Figs. 3.4, 3.5 y 3.6) lo que coincide con el cambio máximo en el G.R.D. en el periodo de 0 - 21 días (Tabla III).

Por su parte los "eventos B" que se deterioran a tiempos más largos no parecen estar correlacionados con la velocidad de toma de agua sino más bien con el tiempo que ha transcurrido desde que el grano adquirió cierta actividad de agua.

B) Cambios en los niveles de quelantes citoplásmicos.

Se ha propuesto que durante la suavización del frijol, la fitina presente en el citoplasma del grano de frijol se solubiliza, migrando hacia afuera de las células y a su paso por la pared celular quela al Ca^{2+} y al Mg^{2+} permitiendo que la lamela

media se solubilice (Stanley y Aguilera 1985). Se ha demostrado que los niveles de fitina disminuyen durante el almacenamiento del grano y que la velocidad de disminución es variedad dependiente (Bernal *et al* 1987). Las variedades aquí estudiadas se pueden agrupar de acuerdo al contenido inicial de fitina en dos grupos Michigan y Negro Veracruz con un alto contenido de fitina y un segundo grupo con un menor contenido que el primero donde estarían agrupadas el resto de las variedades (Bernal *et al* 1987). También se ha demostrado que durante los primeros 15 días de almacenamiento a 41°C y 75 % de humedad relativa Michigan pierde un 8% de su fitina mientras que Ojo de Cabra tiene una pérdida de un 17%.

Sin embargo la susceptibilidad a endurecerse es similar (G.R.D. 1.5) a los 45 minutos de cocción (Fig. 3.2). Ahora bien si el tiempo de cocción es de 90 minutos se puede observar que Michigan es mucho más susceptible que Ojo de Cabra con G.R.D. de 1.7 y 1.2 respectivamente para cada una de ellas, esto puede explicarse de la siguiente forma, la fitina que ambos tienen es suficiente para que en los primeros 45 minutos de cocción se remueva el Ca^{2+} removible de la pared celular suponiendo que este sea uno de los eventos que se realizan a este tiempo de ebullición y que provoca la solubilización de una cierta cantidad de la pectina ahí presente, por lo que se llega a un similar ablandamiento en ambos granos.

Sin embargo a los 90 minutos de cocción la solubilidad de la lamela media de Ojo de Cabra es mayor que la de Michigan, esto podría deberse, a que la fitina que aún se encuentra en Michigan a

este tiempo de cocción ya no es suficiente para quelar el Ca^{2+} que todavía se encuentra en la pared celular y por ello disminuye la solubilidad de su pectina.

También podría deberse a que existen diferencias en las pectinas de los 2 granos, tanto en sus características físicas y químicas como en la cantidad en la que se presentan, lo que podría sugerir que Michigan ó tiene mayor cantidad de pectinas que Ojo de Cabra o sus pectinas tienen ciertas características que las hacen menos solubles que las del otro grano por ello se ablandan en menor proporción. Esto podría además apoyarse en los resultados obtenidos en el laboratorio de las cinéticas de cocción de los granos frescos, ya que ambos granos a pesar de tener diferente cantidad de fitina inicialmente, se cuecen a la misma velocidad, lo que sugiere que en la velocidad de cocción del grano además de la fitina participa otro factor que bien podría ser la estabilidad de la pared celular.

C) Modificación de constituyentes celulares (Fenoles y Metilación de Pectinas).

Entre los constituyentes del grano que se modifican durante el almacenamiento se encuentran los fenoles (Elias 1982; Stanley y Aguilera 1985) y las pectinas (Bartolome y Hoff 1972; Elias 1982; Jones y Boulter 1983; Stanley y Aguilera 1985).

Se ha propuesto que la mayor participación de los polifenoles y la lignificación en el periodo de endurecimiento se produce en etapas avanzadas del mismo, cuando el grano llega a una dureza tal que no es posible suavizarlo aún sometándolo a periodos de

cocción prolongados. Los niveles de endurecimiento del grano reportados en este trabajo no están muy por encima de 2.5 de grado relativo de dureza, por lo que la contribución de estos compuestos al fenómeno de deterioro no fue considerada.

Se ha reportado que el grado de metilación de las pectinas es menor en un grano almacenado que en uno fresco. Esta desmetilación podría realizarse a través de la enzima pectinmetilesterasa. En este trabajo se cuantificó el contenido inicial de metilos en la pectina y la actividad de la enzima durante los primeros 21 días de almacenamiento. El contenido inicial de grupos metilo es diferente en las 5 variedades en que se hizo la determinación (y que se escogieron como representativas de los diferentes grupos de susceptibilidad al deterioro) y correlaciona en forma inversa a la velocidad de cocción del frijol control. Así Bayo 400 se cuece más lentamente que Cacahuat Jalisco sin embargo la cantidad de grupos metilo es mayor en las pectinas de Bayo 400 que en las de Cacahuat Jalisco.

En cuanto al grado de desmetilación que sufre el grano se pueden formar en dos grupos Bayo 400 y Negro Huasteco que pierden un porcentaje mayor de metilos que los que pierden las variedades Pinto Nacional, Cacahuat Jalisco y Negro Veracruz tales grupos son similares a los formados a 33 días de almacenamiento y 90 minutos de cocción, lo cual sugiere que la desmetilación de las pectinas que ocurre en los primeros 21 días de deterioro no es suficiente para contribuir en el proceso de endurecimiento de los "eventos A".

Sin embargo las variedades con una mayor tendencia a perder

grupos metilos como son Bayo 400 y Negro Huasteco, se endurecen más lentamente que las que presentan una menor velocidad de pérdida Pinto Nacional, Cacahuate Jalisco y Negro Veracruz. Según esto último, parece que ni la cantidad inicial ni la remanente de grupos metilo es importante para la susceptibilidad mostrada por el grano al deterioro, el hecho de que la variedad que más pierde grupos metilo en tiempos tempranos sea la que se deteriora menos en el almacenamiento prolongado sugiere que no es la cantidad si no probablemente el tipo de grupos metilo que se eliminan lo que más importa y que esto probablemente este determinado por la estructura de la pared celular.

VI CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El frijol durante su ablandamiento pasa por diferentes eventos a distintos tiempos de cocción, tales eventos se ven afectados diferencialmente durante el almacenamiento del grano. Los eventos que ocurren a los 45 minutos de cocción son los que primero se ven afectados durante los primeros 21 días de almacenamiento. Posteriormente se afectan los que ocurren a los 90 minutos de cocción.

La velocidad de hidratación de las distintas variedades de frijol durante los 3 primeros días de almacenamiento, está relacionada con la susceptibilidad al deterioro que presentan los eventos de ablandamiento que ocurren a los 45 minutos de cocción. No se encontró ninguna relación entre la velocidad de hidratación y los eventos que modifican la textura del grano a los 90 minutos de cocción.

No se presenta una relación directa entre el endurecimiento del frijol durante los primeros 21 días de almacenamiento ni con los niveles iniciales de grupos metilos de la pectina ni con la disminución del grado de metilación de la misma que va adquiriendo el grano durante el tiempo de almacenamiento.

Tampoco se encontró relación entre la actividad de la enzima pectinmetilesterasa y los niveles de desmetilación que se van produciendo en el grano.

Perspectivas

Los resultados encontrados también podrían ser explicados en base a que el porcentaje de dureza alcanzado por el frijol es relativamente bajo. Es decir que el grano con 33 días de almacenamiento en las condiciones utilizadas se encuentra en etapas iniciales de endurecimiento, donde quizá el proceso de desmetilación de la pectina aún no está directamente relacionado con el fenómeno de endurecimiento.

Podría ser que cuando el frijol tenga un grado más avanzado de endurecimiento la desmetilación de la pectina podría ocupar un lugar preponderante como causante del deterioro.

Por ello sería conveniente realizar estudios en los que se abarquen periodos de almacenamiento más largos quizá hasta 10 meses, para poder saber con exactitud si en algún momento en tales niveles de endurecimiento el proceso de desmetilación es preponderante o bien para conocer si este proceso nunca guarda relación directa con el fenómeno del endurecimiento.

VII BIBLIOGRAFIA

- Aguilera, J. M. and Ballivian A. A Kinetic interpretation of textural changes in black beans during prolonged storage. J. Food Sci. 52(3) 691-695,718 (1987).
- Aguilera, J. M., Hau, M. I. and Villablanca W. The effect of solar drying and heating on the hardness of *Phaseolus* beans during storage. J. Stored Prod. Res. 22(4) 243-247 (1986).
- Aguilera, J. M. and Steinsapir, A. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 18 72 (1985).
- Bartolome, L. G. and Hoff, J. E. Firming of potatoes: biochemical effects of preheating. J. Agr. Food Chem. 20 266-270 (1972).
- Bernal-Lugo I., et al. Phytic acid hydrolysis and bean susceptibility to storage hardening. En Prensa.
- Blouin, F. A. Zarins, Z. M. and Cherry J. P. (1982). Discoloration of proteins by binding with phenolic compounds. In *Food Protein Deterioration*. ed. J. P. Cherry. American Chemical Society, Washington D.C. pp. 67-91.

- Bressani, R., Marcucci, E., Robles, C.E., and Scrimshaw, N.S. Nutritive value of Central American beans. 1. Variation in the nitrogen, tryptophan and niacin content of ten Guatemalan black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and the retention of the niacin after cooking. Food Res. 19 263 (1954).

- Bressani, R., Elias, I.G. and Navarrete D.A. Nutritive value of Central American beans. 4. Essential amino acid content of samples of black beans, red beans, rice beans and cowpeas of Guatemala. J. Food Sci. 26 525 (1961).

- Bressani, R., Elias, L. G. and Valiente, A. T. Effect of cooking and of amino acid supplementation on the nutritive value of black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Br. J. Nutr. 17 69 (1963).

- Bressani, R. and Elias, L. G. (1974). Legume Foods. In *New Protein Foods*. ed. A. M. Altschul. Academic Press, New York. pp. 231-297.

- Bressani, R. and Elias, L.G. (1978). Nutritional value of legume crops for humans and animals. In *Advances in Legume Science*. eds. R. J. Summerfield and A.H. Bunting. Royal Botanical Gardens London. pp. 135-155.

- Bunnell, R.H., Keating, J., Guaresimo, A., and Parman, G.K. Alpha-tocopherol content of foods. Am. J. Clin. Nutr. 17 1 (1965).

- Corner, E.J.H. The leguminous seed. *Phytomorph.* 1 117 (1951).
- Cheryan, M. Phytic acid interactions in food systems *CRC Crit. Rev. Food Sci Nutr.* 13 297-335 (1980).
- Crean, D. E. C. and Haisman, D. R. The interaction between phytic acid and divalent cations during the cooking of dried peas. *J. Sci Food Agric.* 14 824-833 (1963).
- Dávila, S. I. Acondicionamiento de Granos. Ingeniería de Postcosecha en Manejo y Conservación de Granos y Semillas P.U.A.L. U.N.A.M. (1986).
- De Moraes, R.M., and Angelucci, E. Chemical composition and amino acid contents of Brazilian beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Sci.* 36 493 (1971).
- Deshpande, S. S., and Cheryan, M. Microstructure and Water Uptake of *Phaseolus* and Winged Beans. *Journal of Food Science.* 51(5) 1218-1223 (1986).
- Elias, L. G. Conocimientos actuales sobre el proceso de endurecimiento del frijol. Publicación INCAP E-1062 (1982).
- Essau, K. Anatomy of Seed Plants. John Wiley & Sons, Inc. 2^o ed. New York. (1977).

- Gupta, R. K. and Haslam, E. (1980). Vegetable tannins-structure and biosynthesis. In *Polyphenols in Cereals and Legumes*. ed. J. H. Hulse. Ottawa Ontario. pp. 15-24.
- Hagerman, A. E., and Austin, P. J. Continuous Spectrophotometric Assay for Plant Pectin Methyl Esterase. *J. Agric. Food Chem.* 34 440-444 (1986).
- Hincks, M. J. and Stanley, D. W. Multiple mechanisms of bean hardening. *J. Food Tech.* 21 731-750 (1986).
- Hincks, M. J., McCannel, A. and Stanley, D.W. Hard-to cook defect in black beans . Soaking and cooking processes . *J. Agric. Food Chem.* 35 576-583 (1987).
- Hincks, M. J. and Stanley, D. W. Lignification: Evidence for a role in hard-to-cook beans. *J. Food Biochem.* 11(1) 41-58 (1987).
- INCAP. (1983). Studies on selected factors and processes which affect the nutritional potential of food legumes. IDRC Final Project Report, Guatemala City. Guatemala.
- Jones, P. M. B., and Boulter, D. The cause of reduced Cooking rate in *Phaseolus vulgaris* following adverse storage conditions. *Journal of Food Science.* 48 623-626 (1983).
- Kertesz, Z. I. Pectic enzymes. The determination of

Pectin-methoxylase activity. J. Biol. Chem. 121 589-598 (1937).

- Kon, S. Effect of soaking temperature on cooking and nutritional quality of beans. J. Food Sci. 44 1329-1334, 1340 (1979).

- Kon, S. and Sanshuck, D.W. Phytate content and its effect on cooking quality of beans. J. Food Pres. 5 169-178 (1981).

- Lee, M. and Mcmillan, J.D. Biochemistry 7 4005-4010 (1968).

- Loh, J. and Breene, W. M. Between-species differences in fracturability loss: Comparison of the thermal behavior of pectin and cell wall substances in potato and chinese waterchestnut J. Text. Studies 13 381-396 (1982).

- Lolas, G. M. and Markakis, P. Phytic acid and other phosphorus compounds of beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Agric. Food Chem., 23 13-15 (1975).

- Lowry, O. H. Rosenbrough, N.J. Farr, A. L. and Randall, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193 265-275 (1951).

- Mattson, S. The cook ability of yellow peas. Acta Agricult. Suecana II 2 185 (1946).

- McFeeters, R. F. and Armstrong, S. A. Measurement of Pectin Methylation in Plant Cell Walls. *Analytical Biochemistry*. 139 212-217 (1984).

- McNair, M. H. *Cromatografía de Gases*. OEA. Washington D. C. (1981).

- Michiko, F. Relationship between pectic compositions and the softening of the texture of Japanese radish roots during cooking. *J. Food Sci* 52(5) 1317-1320 (1987).

- Molina, M. R., Bater, M. A., Gomez-Brenes, R.A., King, K. W. and Bressani R. Heat treatment. A process to control the development of the hard-to cook phenomenon in black beans (*Phaseolus vulgaris*) *J. Food Sci.* 41 661-666 (1976).

- Moreno, E. Hongos de granos almacenados: Su importancia y combate. En *Manejo y conservación de Granos y semillas P.U.A.L U.N.A.M.* (1986).

- Moscoso, W., Bourne, M. C., and Hood, L. F. 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 (1984).

- Muller, F. Cooking quality of pulses. *J. Sci Food Agr.* 18 292 (1967).

- Munneta, P. The cooking time of dry beans after extended storage. Food Technol. 18 1240-1241 (1964).

- Oberleas, D. Phytate content in cereals and legumes and methods of determination. Cereal Foods World 28 352-357 (1983).

- Priestley, D. A. and Leopold, A. C. Absence of lipid oxidation during accelerated aging of soybean seeds. Plant Physiol 63 726-729 (1979).

- Purseglove, J.W. (1968). Tropical Crops-Dicotyledons. Longman Group Limited. London. pp. 1-719.

- Quiroz, R. Tesis de licenciatura: Niveles de iones divalentes y quelantes celulares en frijol con diferente susceptibilidad al endurecimiento. 1989.

- Reddy, N. R., Sathe, S. K. and Salunkhe, D. K. Phytase in legumes and cereals. Adv. Food Res. 28 1- 91 (1982).

- Rockland, L.B. and Radke, T.M. Legume protein quality. Food Technol. 35(3) 79-82 (1981).

- Rosenbaum, T. M. and Baker, B. E. Constitution of leguminous seeds VII Ease of cooking field peas (*Pisum sativum* L.) in relation to phytic content and calcium diffusion. J. Sci. Fd. Agric. 20 709-712 (1969).

- Sánchez, S. O. La Flora del Valle de México. Herrero 2^aed. México (1974).

- Sarkanen, K. V. and Ludwig, C. H. (1971). Definiton and nomenclature. In Lignins. eds. K. V. Sarkanen and C. H. Ludwig Wiley Interscience, New York. pp. 1-89.

- Sgarbieri, V.C. and Whitaker, J.R. Physical, chemical and nutritional Properties of commomm bean (*Phaseolus*) protein. Adv. Food Res. 28 93-166 (1982).

- a Sefa-Dedeh, S. and Stanley, D. W. Textural implications of the microstructure of Legumes. Food Technology 33(10) 77-83 (1979).

- b Sefa-Dedeh, S. and Stanley, D. W. Cowpea proteins I. Use of response surfase methodology in predicting cowpea (*Vigna unguiculata*) protein extractability. J. Agric. Food Chem. 27 1238-1243 (1979).

- Siegel, A. and Fawcet, B. (1976). Food legume processing and utilization. Ottawa. Ontario. pp 81-88.

- Sievwright, C. A., and Shipe, W. F. Effect of storage conditions and chemical treatments on firmness, in vitro protein digestibility, condensed tannins, phytic acid and divalent cations of cooked black beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Food Sci. 51(4)

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

982-987 (1986).

- Stanley, D. W. and Aguilera, J. M. A review of textural defects in cooked reconstituted legumes the influence of structure and composition. *J. Food Biochem.* 2 277-323 (1985).
- Stanley, D. W., and Hohlberg, A. I. Hard-to-cook defect in black beans . Protein and Starch considerations . *J. Agric. Food Chem.* 35 571-576 (1987).
- Stewart, R. R. C. and Bewley, J. D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol.* 65 245 (1980).
- U.S.D.A. (1979) Grain Equipment Manual G.R. 916-5. Federal Grain Inspection Service, Standarization Division, Richard-Geabayer A. B. F. Kansas City Mo.
- Van Buren, J. Snap bean texture softening and pectin solubilization caused by the presense of salt during cooking. *J. Food Sci.* 51(1) 131-134 (1986).
- Varriano-Marston, E. and De Omana, E. Effects of sodium salt solutions on the chemical composition and morphology of black beans (*Phaseolus vulgaris*) *J. Food Sci.* 44(2) 531-537 (1979).
- Varriano-Marston, E., and Jackson, M .Hard-to-Cook Phenomenon

in Beans: Structural Changes During Storage and Imbibition. J. Food Sci. 46 1379-1385 (1981).

- Voisey, W. P. and Larmond, E. Texture of Baked beans- A comparison of several methods of measurement. Journal of Texture Studies 2 96-109 (1971).

- Whitmore, F.W. Lignin-protein complex catalized by peroxidase. Plant Sci. Letters. 13 241-245 (1978).

- Winer, B. J. Statistical principles in experimental design. McGraw-Hill 2^a ed. España. (1971).