

54  
2ij



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO



Facultad de Química

ACTIVIDAD DE ALGUNAS ENZIMAS HIDROLITICAS DURANTE  
EL PROCESO DE ENDURECIMIENTO DEL FRIJOL



*T E S I S*

Que para obtener el Título de  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a

SILVIA CONCEPCION GOMEZ DE LA SERNA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



MEXICO, D. F.

1991



## **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

<b>Capítulo I.-</b>	<b>Introducción.</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo II.-</b>	<b>Generalidades.</b>	<b>2</b>
	Origen del cultivo del frijol.	2
	Características del cultivo.	4
	Endurecimiento del frijol.	6
	Procesamiento del frijol.	7
	Problemas de almacenamiento.	8
	Hipótesis general del proceso de endurecimiento.	9
	Mecanismos del proceso de endurecimiento.	11
	Papel de los polifenoles.	12
	Papel de otras sustancias.	13
	Papel de las sustancias pécticas.	16
	Papel del ácido fítico.	17
	Minerales.	19
	Sustancias pécticas.	20
	Estructura de la pectina.	22
	Enzimas pectolíticas.	24
	Acido fítico.	27
	Fitasa.	29
	Antecedentes inmediatos.	31
<b>Capítulo III.-</b>	<b>Objetivos.</b>	<b>33</b>
<b>Capítulo IV.-</b>	<b>Hipótesis.</b>	<b>34</b>

Capítulo V.- Materiales y Métodos.	35
A) Material biológico.	35
B) Reactivos.	35
C) Métodos.	38
Deterioro de los granos de frijol.	38
Obtención del extracto enzimático de poligalac- turonasa.	38
Determinación de la actividad enzimática de poligalacturonasa (PG).	39
Determinación de azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico. (DNS) (Miller, 1959).	40
Obtención del extracto crudo enzimático para determinación de fitasa.	40
Determinación de la actividad enzimática de fitasa.	41
Determinación de proteínas totales.	41
Método para la determinación de fósforo inor- gánico (o-fosfato) según el método de Taussky y Shorr (1953).	43
Capítulo VI.- Resultados.	44
A) Obtención del material biológico.	44
B) Obtención del extracto y determinación de la actividad de poligalacturonasa.	45
C) Obtención del extracto y determinación de la actividad de fitasa.	52
Capítulo VII.- Discusión.	67
Capítulo VIII.- Conclusiones.	72
Capítulo IX.- Bibliografía.	73

## CAPITULO I.- INTRODUCCION

Las plantas leguminosas que pertenecen a la familia de las *Leguminosae* ocupan un lugar importante en la nutrición de grandes sectores de la población mundial, así como en lo que respecta al plano económico en la producción alimentaria. Esta familia, que comprende unos 600 géneros y 13000 especies, ocupa el segundo lugar en orden de importancia, entre las familias de las plantas provistas de semilla (Aykroyd, 1964).

Las leguminosas se cultivan en todo el mundo, tanto en los trópicos como en las zonas templadas. Tienen un alto contenido de proteínas que oscila desde el 17 al 25% en los granos secos, mientras que en los cereales esa oscilación va del 6 al 14% (Aykroyd, 1964).

Su contribución al suministro mundial de proteínas es considerable lo que reviste un interés bastante destacado desde el punto de vista de la nutrición. Entre las leguminosas más importantes para el consumo humano está el frijol.

## CAPITULO II.- GENERALIDADES

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) se cultiva principalmente con el fin de cosechar semilla seca; ésta provee del 20 al 50% de la proteína de las poblaciones rurales (Gutiérrez, 1986). La proteína del frijol presenta un alto contenido de lisina y leucina que junto con la proteína de los cereales constituye un buen complemento alimenticio (Tabla 1).

### ORIGEN DEL CULTIVO DEL FRIJOL

El frijol común ha venido proporcionando alimento a los pueblos de América desde antes de la llegada de Colón al Nuevo Mundo y sigue constituyendo, junto con el maíz, el alimento básico de gran parte de los pobladores del Continente Americano (Souza, 1979).

Al género *Phaseolus* se le conocen 180 especies de las cuales 126 proceden de América, siendo 70 de éstas originarias de México. La evidencia arqueológica señala que el cultivo del frijol tiene una antigüedad de seis a siete mil años, de acuerdo a los hallazgos hechos en Tehuacán, Puebla (Kaplan, 1967).

El contenido total de proteína en el frijol es de alrededor del 22% y tiene una calidad que, desde un punto de vista meramente analítico, puede considerarse "adecuada", aunque desde el punto de vista nutricional se considera como "intermedia" ya que no posee algunos

TABLA (1)

CONTENIDO DE AMINOACIDOS ESENCIALES EN MAIZ Y FRIJOL		
AMINOACIDO	MAIZ (g DE AMINOACIDOS/g DE PROTEINA)	FRIJOL (g DE AMINOACIDOS/g DE PROTEINA)
lisina	2.84	7.39
isoleucina	4.43	5.43
treonina	3.90	4.28
valina	5.06	5.82
leucina	12.89	8.43
triptofano	0.62	0.93
metionina	1.87	1.02
fenilalanina	4.61	5.47

Fuente: Hernández, M., Chávez, A., Bourges, H. (1987).

aminoácidos que el cuerpo necesita para cubrir las exigencias propias de sostén y desarrollo. La solución al problema en la deficiencia de ciertos aminoácidos indispenables en algunos alimentos consiste en combinarlos de modo tal que un alimento cubre las deficiencias del otro y viceversa. Este es el caso de granos como el frijol y el maíz, pilares de la alimentación mexicana: las concentraciones de lisina, treonina y triptofano en el maíz - que principalmente se consume en forma de tortillas - son muy bajas, pero éstos se complementan con el frijol el cual es deficiente en los aminoácidos azufrados metionina y cisteína (Scrimshaw, 1976).

A pesar de que las diferencias socio-económicas entre los diferentes patrones dietarios de la población mexicana son muy grandes, el frijol y el maíz constituyen el centro de todas las dietas que los componen.

La situación económica actual del país ha mermado en forma importante el poder adquisitivo de la población de menos recursos, por lo que la mayoría de la población cubre sus necesidades nutrimentales - principalmente de energía y proteínas - con fuentes de origen vegetal, eliminando casi totalmente las de origen animal.

#### CARACTERISTICAS DEL CULTIVO

En general el frijol se adapta mejor a regiones con una altura no inferior a 300 metros sobre el nivel del mar, en donde la temperatura nocturna no sea muy superior a 25°C, con buena luminosidad y una precipitación pluvial bien distribuida durante el ciclo vegetativo sin

que la humedad ambiental sea excesiva.

Existen muchos tipos diferentes de frijol que difieren no solamente en su adaptación a diferentes zonas ecológicas, sino también en hábito de crecimiento y apariencia general de la planta, en el color, forma y tamaño de la semilla, así como por su sabor; estas últimas características son determinantes en cuanto a la aceptación del producto por el público de diferentes regiones geográficas ó países, lo que complica seriamente los programas de mejoramiento varietal a nivel regional.

Deben mencionarse como factores adicionales a favor del frijol como fuente de nutrimentos, la facilidad de su preparación para el consumo y la multiplicidad de formas comestibles (vainas, tallos, hojas tiernas, granos inmaduros ó secos).

En general el frijol constituye un buen complemento a las dietas que se consumen regularmente en los trópicos, caracterizadas por altas ingestas de carbohidratos y un mínimo de proteína animal (Bressani, 1973).

La diversidad topográfica y climática del territorio mexicano incide doblemente en las posibilidades de la agricultura nacional ya que, por una parte, propicia una gran diversificación de cultivos y, por otra, reduce el área de aprovechamiento. Aunque cerca del 28% de la superficie del país está constituida por terrenos montañosos y zonas áridas y semiáridas, el aprovechamiento del suelo para sus áreas de cultivo es cercano al 90%, predominantemente en zonas con grandes superficies planas como la planicie septentrional, los estados del noroeste y la planicie costera del Golfo de México (Bourges, 1981).

Los principales estados productores del frijol de la República Mexicana son los siguientes: Zacatecas, Durango, Jalisco, Nayarit, Sinaloa, Chihuahua, Veracruz, Guanajuato, San Luis Potosí y Chiapas (SARH, 1986).

#### ENDURECIMIENTO DEL FRIJOL

Las pérdidas post-cosecha de los granos básicos en nuestro país no han sido cuantificadas; sin embargo, se estima que el 10% de la producción de granos se pierde después de la cosecha.

Estas pérdidas post-cosecha se deben en gran medida a la carencia de infraestructura adecuada para el almacenamiento de granos, a la falta de personal capacitado en el manejo de las cosechas y a la carente y/o inadecuada asistencia técnica, a la falta de difusión de información técnica existente y a la falta de investigación orientada a resolver los problemas del sector post-cosecha.

Las pérdidas post-cosecha pueden originarse por dos causas: las endógenas y las exógenas.

Las endógenas son aquéllas resultantes de alteraciones en el proceso biológico natural de maduración; en cambio, las exógenas se originan por influencias externas que incluyen alteraciones físicas, ataque de animales e insectos, contaminación de microorganismos ó química y malos sistemas de almacenamiento. La condición conocida como endurecimiento del frijol, cae principalmente en este segundo grupo.

Las pérdidas post-cosecha no solamente son cuantitativas, sino también cualitativas, ejemplo de esto último es el endurecimiento del frijol, que presenta varios problemas: para el ama de casa significa un mayor gasto de energía y de tiempo para su cocción, así como una menor calidad organoléptica que trae consigo que la calidad biológica de la proteína disminuya y porque en muchos casos el sabor del grano sufre también un deterioro notable; desde el punto de vista industrial, este es un problema que dificulta la estandarización de su procesamiento, demeritándose por consecuencia, en forma considerable, la calidad final del producto.

#### PROCESAMIENTO DEL FRIJOL

El frijol común contiene sustancias de acción fisiológica adversa para el hombre que es necesario eliminar antes de su consumo. El proceso de eliminación de estas sustancias se logra a través de la cocción húmeda por períodos de tiempo que varían con el tipo de especie de frijol. Por otro lado, un exceso de cocción puede traducirse en un deterioro en la calidad proteínica del producto, consecuentemente, pierde si no todo, al menos gran parte de su potencial como proteína suplementaria. Entre los aminoácidos más susceptibles se encuentra la lisina (Bressani, 1982).

## PROBLEMAS DE ALMACENAMIENTO

Como se mencionó anteriormente, desde el punto de vista práctico, el fenómeno de endurecimiento del frijol se traduce en un aumento en el tiempo requerido para la suavización del grano durante el proceso de cocción, y en algunos casos en un deterioro de las características organolépticas del producto. A pesar de que este problema ha sido reconocido desde hace mucho tiempo, los esfuerzos por conocer las causas y el mecanismo de este fenómeno son bastante recientes.

Con respecto a las causas ó factores que influyen en el endurecimiento del frijol, éstos son: la humedad del grano, temperatura, humedad relativa del ambiente y el tiempo de almacenamiento.

El frijol es el grano más afectado por las condiciones y el tiempo en que permanece en bodega. En efecto, el frijol es el producto que pierde más fácilmente su humedad, ya que es muy sensible a las condiciones ambientales; además, el secamiento constante lo endurece, siendo éste el principal problema que implica su almacenamiento. Su manejo en grandes cantidades en silos herméticos resulta desventajoso porque su manipuleo produce fácilmente la separación de los cotiledones del frijol, por lo que sólo puede almacenarse en bodegas, dentro de sacos, lo que lo torna sensible a temperaturas altas.

Generalmente es cosechado con una humedad del 16 al 17% . El grano es secado al sol, y después se guarda en toneles ó en sacos.

El frijol con un contenido de humedad entre 13 y 18% requiere de tiempos de almacenamiento mayores de 6 meses para endurecerse siempre

y cuando la temperatura del almacén sea menor de 30°C (Burr, 1968). Sin embargo, el frijol expuesto a 100% de humedad relativa y 41°C, sólo requiere de 14 días de almacenamiento para aumentar su tiempo de cocción (Jackson, 1981).

El proceso de endurecimiento del frijol, durante el almacenamiento inadecuado, ha sido también atribuido a mecanismos que involucran cambios físicos y químicos de otras sustancias, las cuales pueden incidir en la macro y microestructura del cotiledón.

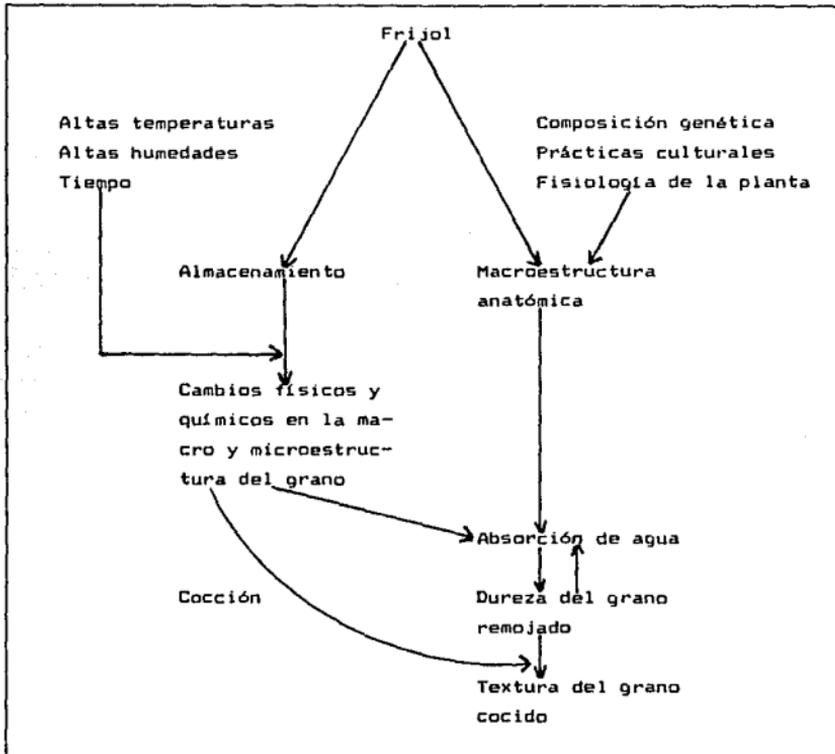
#### HIPOTESIS GENERAL DEL PROCESO DE ENDURECIMIENTO

Hasta la fecha no existen datos concretos y conocidos que expliquen el proceso de endurecimiento, pero podría ponerse en términos generales, como se indica en la figura (1).

La evidencia disponible en la actualidad sugiere que existen 2 vías que dan origen a esa condición. Una vía es inherente a la semilla, o sea aquella que podría originarse de las partes anatómicas del grano, las que, a su vez, podrían ser de origen genético ó adquiridas por la planta, de acuerdo al medio en que se cultiva. Por ejemplo, el espesor de la cáscara y la apariencia de la misma, el tamaño del grano y la longitud del hilum, y posiblemente el contenido de proteína. El papel de estas estructuras puede estar influenciado por el almacenamiento. Esto constituye la segunda vía del endurecimiento, que induce cambios físicos y químicos en la microestructura de la semilla, tanto en la cáscara como en el

FIGURA (1)

HIPOTESIS SOBRE EL PROCESO GENERAL DEL ENDURECIMIENTO DEL FRIJOL



Fuente: Bressani, 1982.

cotiledón. El efecto de cualquiera de las dos vías es el de resistir la absorción del agua, siendo por ello necesario incrementar el tiempo de cocción para suavizarlos (Bressani, 1982).

Gloyer (1921) identificó dos problemas como los causantes de la pérdida de la propiedad de ablandamiento de los frijoles:

a) Cáscara dura ó impermeabilidad de la cáscara de los frijoles al agua. Los granos afectados por este problema sufren una rehidratación lenta, lo que afecta las propiedades de cocimiento y de germinación de las semillas.

b) Esclerema, que se considera como la impermeabilidad de los cotiledones al agua debido a cambios enzimáticos que ocurren durante el almacenamiento. Como resultado, el frijol pierde su propiedad de ablandamiento, requiriendo más tiempo de cocción que los frijoles normales.

#### MECANISMOS DEL PROCESO DE ENDURECIMIENTO

Los posibles mecanismos que expliquen el proceso de endurecimiento deben involucrar aspectos físicos, químicos y bioquímicos de las dos partes anatómicas de la semilla, esto es, la testa y el cotiledón.

Los conocimientos adquiridos hasta la fecha permiten elaborar varias hipótesis que pueden servir de base para discutir el proceso de endurecimiento del frijol. No es necesario que estas hipótesis sean vistas independientemente, sino más bien en forma interrelacionada,

para explicar y comprender este fenómeno. A continuación se exponen algunas de estas hipótesis.

#### PAPEL DE LOS POLIFENOLOS

Una de estas hipótesis considera a los pigmentos que caracterizan los diferentes colores de las semillas de leguminosas y que están localizados en la testa. Algunos estudios (Elías, 1982) sugieren una posible relación entre el contenido de polifenoles y el proceso de desarrollo de la dureza del frijol durante el almacenamiento. En dichos estudios se ha observado una disminución significativa en el contenido de polifenoles (expresado como catequinas) en el frijol común almacenado durante 6 meses. Este descenso se acompañó de un incremento de la actividad de la polifenoloxidasa, de la dureza, y de tiempo de cocción del grano. Aún más interesante, el menor contenido de catequina guardó relación directa con las condiciones de almacenamiento que favorecen el desarrollo del proceso de dureza del frijol.

Aunque bioquímicamente es fácil suponer y esperar que bajo las condiciones de almacenamiento opere un mecanismo enzimático que explique la disminución de la catequina, no se dispone todavía de una explicación categórica que pueda relacionar este descenso con el desarrollo de la dureza del grano.

A la luz de lo que hoy día se sabe, es posible que los polifenoles pueden estar relacionados con la dureza de la semilla y el

tiempo de cocción mediante dos mecanismos: el de la polimerización activa, principalmente en la testa, y el de la proteína lignificada en el cotiledón, afectando ambos la capacidad de hidratación de la semilla, el primero obstaculizando la penetración del agua y el segundo, limitando su capacidad imbibitoria. Conviene, pues, realizar estudios futuros con miras a identificar los fenoles presentes en la testa y medir su estabilidad y cambios en concentración durante el almacenamiento. Esta reducción en el contenido de polifenoles durante el almacenamiento podría también estar relacionada a la pérdida de sabor y de color que acusa el agua de cocción de muestras almacenadas inadecuadamente.

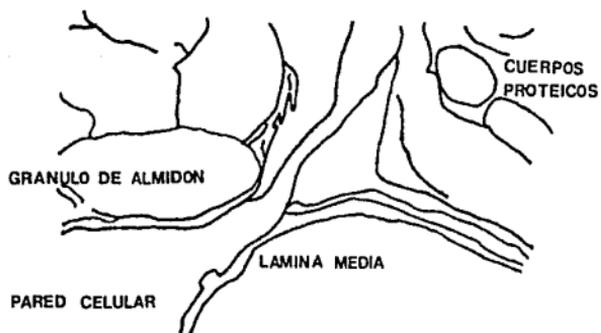
#### PAPEL DE OTRAS SUSTANCIAS

Como se había mencionado anteriormente, el proceso de endurecimiento del frijol durante el almacenamiento inadecuado, se ha atribuido también a mecanismos que involucran cambios físicos y químicos de otras sustancias las cuales pueden incidir en la estructura del cotiledón.

Dichos cambios están basados principalmente en los constituyentes del cotiledón, como lo son el almidón, las proteínas, los lípidos y desde el punto de vista estructural, la pared celular y la lámina media (Figura 2). La pared celular está formada sobre todo de celulosa, embebida en una matriz formada principalmente de hemicélulosa y sustancias pécticas. La lámina media, estructura que

FIGURA (2)

MICROESTRUCTURA DEL CÓTILEDON



mantiene las células individuales juntas, consiste en su mayor parte de sales de calcio de polímeros de ácido galacturónico que han sido parcialmente esterificados con metanol. Estudios de la estructura celular en cotiledones de las habas, relizados con el microscopio electrónico, revelan una disolución gradual de la lamela media durante la cocción. Cuando el tejido está completamente cocido la lamela media aparece completamente disuelta, observándose una separación de las células (Rockland, 1974). Posteriormente, empieza la gelatinización de los gránulos del almidón, dependiendo del tiempo y la temperatura. El proceso de gelatinización extracelular del almidón del frijol (*Phaseolus lunatus*), y los cambios morfológicos que sufre el grano durante este proceso han sido estudiados (Rockland, 1974) y observados microscópicamente. Asimismo, estudios sobre el proceso de gelatinización intracelular del almidón (Hahn, 1977) en frijoles remojados en agua y en soluciones salinas, y sometidos al proceso de cocción demostraron que, debido a las restricciones impuestas por las paredes celulares que permanecen intactas a la temperatura de gelatinización, no se llevó a cabo la dilatación y proyección de los gránulos de almidón. A medida que el proceso de cocción continúa la suavidad del grano aumenta sin que se observen mayores cambios en la microestructura de la semilla, hecho indicativo de que otros factores contribuyen a la suavización del grano durante el proceso de cocción.

Con respecto a la posible contribución del almidón a la textura del grano, se ha sugerido (Hughes, 1975; Linehan, 1969; Bretzloff, 1968) que, en el caso de algunos alimentos, la

solubilización y difusión del almidón de las células durante el proceso de cocción, puede aumentar la adhesión intercelular. Esta adhesión sería la resultante de la liberación de la amilosa a través de las paredes celulares, promoviendo así la unión de las células mediante enlaces de hidrógeno con polisacáridos de la pared celular. Así, dicho mecanismo dependería de las propiedades fisicoquímicas, tales como la solubilidad y el poder de hinchamiento del almidón.

Otros investigadores han querido implicar cierta asociación entre el desarrollo de la dureza en el frijol y el proceso de retrogradación del almidón (Hellendoorn, 1979), a semejanza de resultados similares obtenidos con el almidón en el caso del almacenamiento del arroz, sin embargo, no se ha encontrado ninguna correlación con el desarrollo de la dureza del frijol (Elías, 1982). Con respecto a otros polisacáridos, algunos investigadores (Hamad, 1965) han encontrado una relación entre ciertas fracciones de las sustancias pécticas y la capacidad de absorción de agua del frijol común. No obstante, en otros estudios (Molina, 1976), no se ha podido corroborar esta relación.

Finalmente, se ha tratado de correlacionar la composición de los lípidos con el tiempo de cocción del frijol común (Takayama, 1965) sin que se haya podido demostrar concluyentemente en esta correlación.

#### PAPEL DE LAS SUSTANCIAS PECTICAS

Kon (1980) sugirió que el ablandamiento de las leguminosa durante la cocción implica un intercambio de calcio presente en el pectato de calcio insoluble de las leguminosas con el sodio y el potasio

presentes en el fitato de sodio y potasio soluble. Cuando se cuecen los materiales vegetales, las protopectinas son parcialmente hidrolizadas a pectinas solubles en agua en proporción directa con la severidad del proceso de cocción (Doesburg, 1963).

También se ha sugerido que el proceso de ablandamiento de los frijoles secos depende de la razón de disolución de la lamela media (Sefa-Dedeh, 1979; Rockland, 1974).

La razón de rompimiento de la protopectina durante el proceso de cocimiento puede ser estimada siguiendo los cambios que se suscitan en el contenido de sustancias pécticas insolubles en función del tiempo de cocción de los tejidos.

#### PAPEL DEL ACIDO FITICO

Entre otros factores que podrían contribuir a la suavización del grano durante el proceso de cocción, se ha sugerido (Mattson, 1946; Muller, 1967) que en las paredes celulares se lleva a cabo la reacción de fitatos con pectatos insolubles de calcio y magnesio, transformándolos en pectatos solubles de sodio y potasio. Es probable que el papel del ácido fítico y de los fitatos sobre la textura de las semillas se deba a que éstos representan del 60 al 90% del fósforo presente en los granos.

De acuerdo a Mattson (1950), el deterioro que ocurre en la calidad de cocción de los guisantes secos durante su almacenamiento, se debe al rompimiento hidrolítico del fitato por la enzima fitasa, lo

que resulta en la formación de fosfato inorgánico, el cual no actúa como un precipitante de calcio y magnesio al pH de los guisantes. Haisman (1962) reportó que el remojo por 18 horas a 20°C, de guisantes almacenados a 37°C, a una humedad relativa del 75% durante 12 meses, se tradujo en una pérdida considerable de ácido fítico; además, los guisantes eran de difícil cocimiento. Por otra parte, aquéllos de fácil cocción no experimentaron grandes pérdidas de ácido fítico durante el remojo. Se observaron pérdidas adicionales durante el proceso de cocción para ambas muestras, pero los guisantes de fácil cocción retuvieron cantidades relativamente mayores de ácido fítico. Por otra parte, frijoles rojos almacenados bajo condiciones diferentes de temperatura y contenido de humedad acusaron diferencias en su contenido de fósforo del ácido fítico, luego de ser remojados durante 18 horas a 25°C. Los frijoles almacenados a 2°C no mostraron cambios significativos (al nivel del 5% de probabilidad) en su contenido de ácido fítico durante el almacenamiento. No obstante, los almacenados a 32°C, con un contenido alto de humedad, mostraron un descenso consistente en su contenido de ácido fítico, siendo las muestras almacenadas con un contenido de humedad de 17.9% las que acusaron la mayor reducción (Moscoso, 1981).

Además de la posible reacción entre fitatos y pectatos mencionada, otras posibles implicaciones en la textura estarían relacionadas con la presencia de complejos proteína-fitato encontrados en frijol común (Lolas, 1975; Bourdillon, 1951).

## MINERALES

De acuerdo a Mattson *et al.* (1950), los guisantes son más fáciles de ablandar a medida que aumenta la razón de cationes monovalentes a divalentes. A un contenido dado de ácido fítico, los cationes afectan la propiedad de cocción en el orden  $K > Mg > Ca$ . Los frijoles secos son muy susceptibles a los iones de calcio y magnesio presentes en el agua de remojo ó de cocción, lo que da como resultado una pérdida en la propiedad de cocción (Hamad y Powers, 1965; Crean y Haisman, 1963). Hasta el calcio y el magnesio endógenos afecta adversamente la propiedad de cocción (Mattson, 1946; Quenzer, 1978). Por otra parte, los cationes monovalentes como el sodio y el potasio, tienden a hacer los frijoles de más fácil cocción (Snyder, 1936; Rockland y Metzler, 1967; Mattson, 1950). Con respecto a la relación entre la calidad de cocción y contenido de ácido fítico y calcio, sólo es válida cuando el ácido en cuestión está presente en bajas cantidades (Smithies, 1960).

A pesar de la diversidad de hipótesis y de otras evidencias acumuladas en estudios de almacenamiento y prevención del proceso de endurecimiento, debe de quedar claro el hecho de que los mecanismos de este proceso pueden ser varios y que cada uno puede afectar en mayor ó menor grado dicho fenómeno.

Los estudios realizados a este respecto sugieren también fuertemente que el principal mecanismo de acción es de naturaleza enzimática, debido a las condiciones que favorecen al desarrollo de la dureza durante el almacenamiento, como la eficiencia de los

tratamientos aplicados para evitar este proceso (Elias, 1982).

### SUSTANCIAS PECTICAS

La pectina fué descubierta por Bracannot en 1825. Se trata en realidad de un nombre genérico que abarca a un grupo de sustancias íntimamente emparentadas (las sustancias pécticas). Estas sustancias llenan los espacios intercelulares, laminillas centrales, de los tejidos vegetales; por ejemplo, las frutas forman pectinas con frecuencia en cantidades tan grandes, que constituyen canales amplios que separan las células (Figura 3).

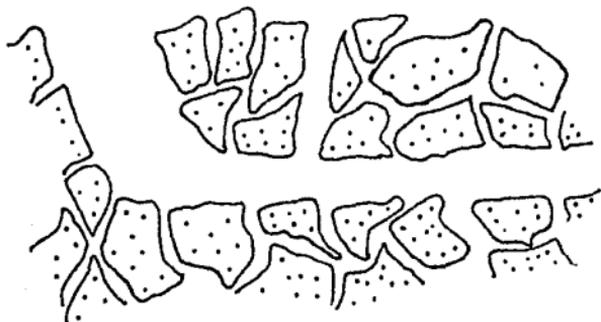
La pectina tiene la propiedad de embeber grandes cantidades de agua y formar coloides. Las sustancias pécticas desempeñan por esto un papel importante en los primeros estadios del desarrollo de los tejidos vegetales, cuando las células se hallan todavía bastante separadas y a una distancia considerable de los canales conductores de agua. Las sustancias pécticas absorben rápidamente el agua y la transfieren y reparten entre las células con mayor facilidad de lo que podría lograrse por ósmosis.

Mientras las sustancias pécticas se hallan situadas en el exterior de las paredes celulares, en la región de las laminillas centrales de los vegetales, se cree que se hallan íntimamente relacionadas con la celulosa. A esta forma, precursora de la pectina propiamente dicha, se le llama protopectina (ó pectosa).

Se ha supuesto que la protopectina es un hidruro de pectina ó que

FIGURA (3)

DIAGRAMA DE LA PECTINA EN FORMA DE CANALES,  
TAL COMO SE OBSERVA BAJO EL MICROSCOPIO



está constituida por la unión de pectina y celulosa con eliminación de algunas moléculas de agua.

#### ESTRUCTURA DE LA PECTINA

La pectina forma un coloide reversible, de tipo liófilo; sus soluciones desvían a la derecha la luz polarizada. La pectina contiene en su estructura numerosas impurezas como celulosa, pentosanas (arabano), galactosanas y otros compuestos, pero puede purificarse mediante repetidas precipitaciones y redisoluciones.

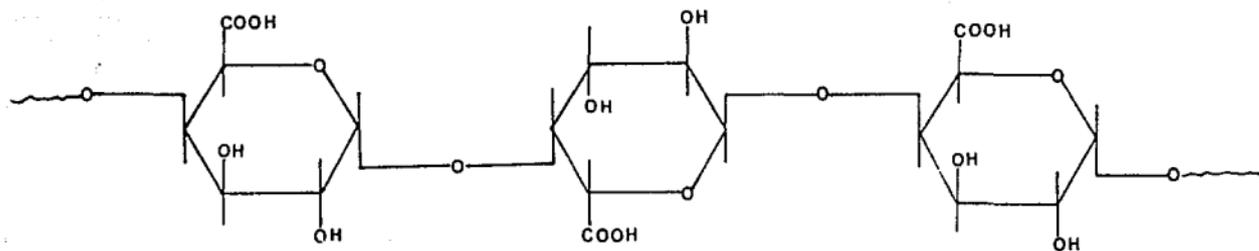
La pectina se considera como una larga cadena de moléculas de ácido galacturónico (Figura 4) con grupo carboxilo parcial ó totalmente esterificados por alcohol metílico y pueden estar parcial ó completamente neutralizados por varios cationes.

Las pectinas obtenidas de diversas fuentes varían considerablemente en su capacidad de formar geles en virtud de las distintas longitudes de sus cadenas de ácido poligalacturónico y del diferente grado de esterificación de sus grupos carboxilo con el alcohol metílico.

Hay 4 tipos de sustancias pécticas:

- a) Protopectina, un constituyente de la pared celular en agua.
- b) Pectina, un polímero de ácido galacturónico soluble en agua que tiene muchas uniones metil-ester
- c) Acidos pectínicos, sustancias pécticas coloidales que son también

FIGURA (4)  
ACIDO POLIGALACTURONICO



polímeros de ácido galacturónico, pero estas moléculas contienen pocas uniones metil-éster.

d) Ácidos pécticos, los polímeros de ácido galacturónico solubles en agua y que carecen esencialmente de uniones metil-éster.

Cada una de estas cuatro clases representan un grupo de sustancias íntimamente relacionadas.

La sustancia péctica madre, la protopectina, puede ser convertida a pectina ó a ácidos pectínicos con un tratamiento simple y moderado. Los ácidos pécticos pueden ser producidos a partir de las pectinas tratándolos con álcali diluido, una conversión de  $(RCOOCH_3)_n$  a  $(RCOOH)_n$  donde  $RCOOH$  designa el ácido galacturónico libre y  $RCOOCH_3$  designa el metil-éster de una sola unidad de ácido galacturónico.

Las diversas sustancias pécticas también difieren una de otra en las cantidades de componentes diferentes al ácido galacturónico relacionados con el polímero y en los pesos moleculares.

#### ENZIMAS PECTOLITICAS.

Se han encontrado numerosas enzimas que catalizan las distintas etapas de la degradación de las pectinas:

a) Pectín-esterasa (PE); cataliza la eliminación de los grupos metilo de la molécula péctica (sinónimos: pectasa, pectin-metil-esterasa).

La PE tiene una actividad óptima a pH 7.5 y es una enzima

bastante específica: para atacar una unidad esterificada requiere al menos una unidad de ácido galacturónico libre de grupos metilo, según se observa en la figura (5).

Al disminuir el número de moléculas de esta índole, decrece la actividad de PE.

Se ha demostrado recientemente que la PE está asociada con partículas sólidas de la pared celular.

b) Poligalacturonosa (PG), que cataliza la hidrólisis glucosídica del ácido poligalacturónico (ácido péctico) en unidades individuales de ácido D- galacturónico (sinónimos: pectinasa, pectolasa, poligalacturonidasa).

La actividad óptima de esta enzima se logra a pH 3.5-4.2 y se considera que su posición de ataque se halla en un punto situado entre los dos grupos carboxilo (Figura 6).

La PG es inactiva sobre el polímero totalmente metilado; pero en presencia de PE, que es capaz de desmetilar la pectina, escinde todos los enlaces de la cadena y produce ácido D-galacturónico libre.

Durante algún tiempo se ha sugerido la existencia de otra enzima intermediaria, para la que se reservó el nombre de pectindespolimerasa, capaz de escindir la molécula de pectina en unidades más pequeñas, aunque no hasta ácido galacturónico.

Se ha hallado otra enzima, la polimetilgalacturonidasa, que escinde también el enlace glucosídico, pero en contraste con la PG

FIGURA (5)  
POSICION DE ATAQUE DE PECTINESTERASA

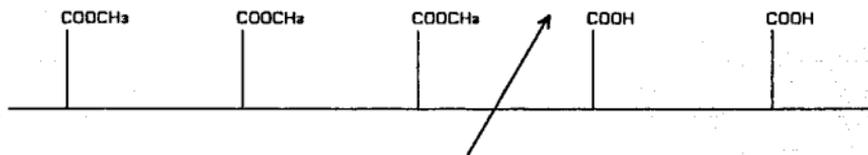
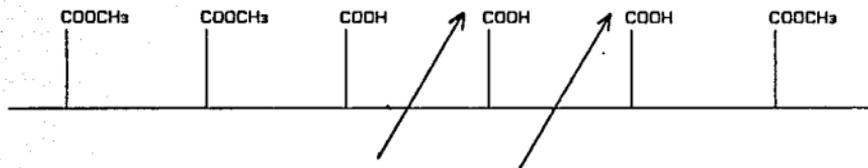


FIGURA (6)  
POSICIONES DE ATAQUE DE POLIGALACTURONASA



puede actuar sobre el polímero totalmente metilado.

## ACIDO FITICO

Los frijoles , como muchas otras semillas, son fuentes ricas en fósforo. Los compuestos de fósforo encontrados en las semillas pueden clasificarse en :fitatos, fósforo inorgánico, fosfolípidos, ácidos nucleicos y fosfoproteínas.

El fitato ó fitina, es una sal compleja de calcio y magnesio con el mio-inositol y se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. El fitato es la forma principal de almacenamiento de fósforo en muchas semillas; del 60 al 90% de todo el fósforo se encuentra como ácido fítico (Lolas y Markakis,1975) (Figura 7).

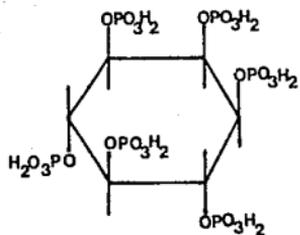
Los frijoles maduros contienen grandes cantidades de fitato (Makower, 1969) del cual 99.6% se encuentra en forma soluble en agua (Lolas y Markakis, 1975). Por otra parte, en los órganos vegetativos de la planta que no son de almacenamiento, el fitato puede encontrarse ausente ó bien en cantidades insignificantes.

El ión fitato forma compuestos complejos con iones metálicos di y trivalente ( $Zn^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Fe^{++}$  y  $Fe^{+++}$ ) y en muchos casos forma compuestos insolubles.

Varios son los papeles fisiológicos que se le atribuyen a la fitina en las semillas:

FIGURA (7)

ACIDO FITICO



- a) Puede ser utilizada como almacén de fósforo (Hall y Hodges, 1966).
- b) Puede utilizarse como almacén de energía (Biswas y Biswas, 1965).
- c) También como iniciadora de la latencia (Sobolev y Radionova, 1966).

Sin embargo, Williams (1970) reportó que el ácido fítico sirve únicamente como fuente de fósforo y cationes en las semillas que se encuentran germinando. El ácido fítico es también fuente de fosfatos (Mayer, 1956; Belavady y Banerjee, 1953) e inositol (Darbre y Norris, 1957) durante la germinación de las semillas debido al rompimiento del ácido fítico por la fitasa. Esto puede liberar ciertos minerales, los cuales son esenciales para el desarrollo de la planta.

#### FITASA

La fitasa es una fosfomonoesterasa que puede hidrolizar a la fitina dando como resultado ortofosfato inorgánico y una serie de fosfoésteres de mio-inositol de menor número de grupos fosfato. El mio-inositol es el último producto derivado de la hidrólisis continua de los ésteres de menor número de fosfatos. También el mio-inositol es el precursor de todos los residuos de azúcares del pentosilo y uranosilo por lo que contribuye directamente a la síntesis de la pectina y otros polisacáridos asociados con el desarrollo de las paredes celulares. También contribuye con ciertos lípidos (Dalling y Bhalla, 1984).

Esta enzima se encuentra ampliamente distribuida en tejidos de plantas y animales (Cosgrove, 1966), en muchas especies de hongos y en ciertas bacterias. Se ha reportado una gran actividad de la fitasa en trigo (Peers, 1953) y una actividad moderada en cebada (Preece, 1962). Dicha actividad no se encontró en avena (McCance, 1944) y en frijoles mungo (Mandal y Biswas, 1970).

La distribución y cantidad de fitasa no son proporcionales al contenido de ácido fítico y tampoco existe una correlación con las actividades de la glicerofosfatasa y pirofosfatasa en los tejidos de las plantas (Courtois y Perez, 1948; Saio, 1964).

Durante la germinación, las semillas manifiestan una actividad de la fitasa que se acompaña por un incremento en el fósforo inorgánico y un decremento en el contenido de fitato en las semillas (Courtois y Perez, 1948b; Peers, 1953; Mandal *et al.*, 1972; Mayer, 1958). Sin embargo, aparentemente la actividad de la fitasa *in vitro* no refleja el grado de degradación que ocurre *in vivo*. Esta falta de correlación también la han encontrado en el endospermo de semillas de avena en germinación (Dalling y Bhalla, 1984). Sin embargo, en el mismo tejido, los mismos autores han observado una gran correlación entre la degradación de proteínas *in vivo* y la actividad de la peptidohidrolasa *in vitro* así como la degradación del almidón *in vivo* y la actividad de la  $\alpha$ -amilasa *in vitro*. Probablemente, la degradación de la fitina sea modulada *in vivo* por el efecto del fosfato orgánico, producto de la actividad de la fitasa y un inhibidor de la misma.

## ANTECEDENTES INMEDIATOS

La participación de la fitina en el proceso de endurecimiento del frijol ya ha sido estudiada (Gutiérrez Venegas, 1986). Los resultados muestran que a medida que el frijol se endurece, el contenido de fitina del grano también disminuye (Tabla 2). En el mismo estudio Gutiérrez Venegas (1986) propone un modelo que explique el fenómeno del endurecimiento del frijol y especula sobre la participación de la fitina y su implicación: la capacidad de quelación del protoplasto disminuye (menor contenido de fitina) con lo cual la redistribución iónica necesaria para que el grano se suavice durante la cocción, se realiza más lentamente, lo que se refleja en un aumento de los tiempos de cocción requeridos para que se complete el proceso.

TABLA (2)

CUANTIFICACION DE FITINA EN COTILEDON DE FRIJOL DE DIFERENTE GRADO DE DUREZA	
Grado de dureza	mg de fitina/g de cotiledón
control	7.45
7 días de end.	3.51
14 días de end.	2.05
21 días de end.	0.87

Fuente: Gutiérrez Venegas, G. (1986).

### CAPITULO III.- OBJETIVOS

El objetivo general del proyecto es obtener información básica para el entendimiento y solución al problema del endurecimiento de frijol durante su almacenamiento.

El objetivo particular de esta investigación es detectar si existen modificaciones en las actividades de dos enzimas hidrolíticas - poligalacturonasa y fitasa - durante el proceso de endurecimiento del frijol como consecuencia de tratamientos de deterioro artificiales que pretenden imitar el deterioro que sufren los granos sujetos a condiciones de almacenamiento inadecuadas.

Para el desarrollo de este trabajo se plantearon los objetivos específicos siguientes:

a) Obtención del extracto enzimático crudo de frijol así como la determinación de la actividad de poligalacturonasa a diferentes tiempos de deterioro y su relación con el problema de endurecimiento.

b) Obtención del extracto enzimático crudo de frijol y determinación de la actividad de fitasa a diferentes tiempos de deterioro y su relación con el problema de endurecimiento.

#### CAPITULO IV.- HIPOTESIS

De la evidencia bibliográfica presentada anteriormente y retomando los antecedentes experimentales se postula la siguiente hipótesis: dado que la cantidad de fitina disminuye conforme aumenta el tiempo de deterioro del frijol, se propone que esta baja se debe a que la actividad de la enzima fitasa aumenta en relación directa al tiempo de deterioro del frijol. Si esto es así, este rompimiento hidrolítico del fitato dará por resultado la formación de fosfato inorgánico el cual no actuará como agente quelante de iones  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  por lo que no habrá movilización iónica y no se solubilizarán los pectatos.

De manera similar, se propone que la actividad de la poligalacturonasa de frijoles deteriorados se incrementa conforme transcurre el tiempo de endurecimiento; si esto es así, disminuirá la cantidad de sustrato y no existirá el flujo iónico necesario para la solubilización, lo que generará dureza en el grano.

## CAPITULO V.- MATERIALES Y METODOS

### A) MATERIAL BIOLÓGICO.

Granos de frijol *Phaseolus vulgaris* variedad Ojo de Cabra, proporcionados por la Compañía Nacional de Subsistencias Populares (CONASUPO).

### B) REACTIVOS.

1.- Para la obtención del extracto enzimático de poligalacturonasa.

- Solución amortiguadora de fosfatos-K 0.1 M (pH 7.0) con 2-mercaptoetanol 9 mM.
- Polietilenglicol (PEG).
- Bolsas para diálisis.

2.- Para la determinación de la actividad enzimática de poligalacturonasa.

- Ácido poligalacturónico 0.5% (p/v) con NaCl 0.3M.
- Solución amortiguadora de acetatos-Na 50 mM (pH 5.0).

3.- Para la cuantificación de azúcares reductores. - Acido dinitrosalicílico (DNS) (Reactivo de Summer y Sisler modificado):

DNS	1.0%
Fenol	0.2%
Sulfito de sodio	0.05%
Hidróxido de sodio	1.0%
Sal de Rochelle	40.0% (tartrato de sodio y potasio).

4- Para la obtención del extracto enzimático de fitasa.

- $\text{CaCl}_2$  2%
- Polietilenglicol.
- Bolsas para diálisis.

5- Para la determinación de la actividad enzimática de fitasa.

- Buffer de acetatos 0.6 M pH 5.3
- Fitato de sodio 8 mM previamente ajustado a pH 5.3 con HCl 1 N.
- TCA 50%

6- Para la determinación de proteínas totales.

Soluciones:

- a) Desoxicolato de sodio 0.15% (DOC).
- b) TCA 72%.
- c) Cobre-tartrato-carbonato (CTC).

En una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 10% se añade:

- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.1%
- Tartrato de sodio y potasio	0.2%

(Estable a temperatura ambiente por 2 meses).

- d) SDS (dodecil sulfato de sodio) 10%
- e) NaOH 0.8%
- f) Reactivo de Folin-Cicalteau.

- Reactivo A.- Mezclar partes iguales de los stocks de CTC, NaOH, SDS y H<sub>2</sub>O.

Reactivo B.- Un volumen de reactivo de Folin-Cicalteau se mezcla con 5 volúmenes de H<sub>2</sub>O destilada.

7- Solución estándar de albúmina sérica bovina 100 µg/ml.

B- Para la determinación de o-fosfato.

- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 133.3 µg/ml (solución stock).

- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 N

- Solución stock de molibdato de amonio 10%

(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O. Pesar 50 g del reactivo y aforar con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 N a 500 ml.

- FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

- Molibdato ferroso de sulfato de amonio (prepararlo antes de cada determinación):

10 ml de molibdato de amonio stock

5 g de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

Aforar a 100 ml.

## C) METODOS.

### DETERIORO DE LOS GRANOS DE FRIJOL

Los granos de frijol se seleccionaron de entre los que no presentaban daños físicos aparentes, con un tamaño y coloración semejantes.

Se emplearon lotes de 5 g para cada tiempo de deterioro; éstos fueron pesados previamente y después desinfectados con solución 0.007 M de NaClO durante treinta segundos para posteriormente ser lavados abundantemente con agua destilada estéril.

Cada lote para los diferentes tiempos de deterioro se colocó en cajas petri; éstas se introdujeron en una cámara de deterioro (charola de plástico) conteniendo una solución saturada de NaCl (comercial) para mantener una atmósfera de 75% de humedad relativa. La cámara se colocó en una estufa a 41°C. Las muestras se almacenaron durante 7, 14 y 21 días. A los tiempos indicados se retiraron los lotes de la estufa y se procedió a la obtención de los extractos enzimáticos tanto para poligalacturonasa como para fitasa.

### OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO DE POLIGALACTURONASA

Cada lote de frijoles fué molido hasta obtener un polvo muy fino, utilizando un pequeño molino, y posteriormente homogenizado con un agitador mecánico en buffer de fosfatos-K 0.1 M (pH 7.0) conteniendo

2-mercaptoetanol 9 mM durante 5 minutos a 0°C. Todos los pasos subsecuentes se llevaron a cabo entre 2 y 4°C. El homogenado se centrifugó a 3500 rpm en una centrifuga Damon, modelo IEC HN-SH, por 10 minutos y el sobrenadante se colectó. La pastilla se resuspendió en buffer de fosfatos 0.1 M y se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se juntó con el anterior y se centrifugó a 8000g por 30 minutos. La pastilla se desechó y el extracto se concentró con PEG. Una vez obtenido el concentrado éste se dializó por 20 horas contra agua. El dializado se centrifugó por 15 minutos a 4500 rpm. El sobrenadante era el extracto crudo enzimático.

#### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE POLIGALACTURONASA (PG)

La actividad de PG se determinó por el incremento en el número de azúcares reductores. La mezcla de reacción contenía 0.3 ml de extracto enzimático y 1 ml de ácido poligalacturónico 0.5% (p/v) con NaCl 0.3 M y 0.7 ml de buffer de acetatos-Na 50 mM (pH 5.0). Después de 8 horas de incubación a 35°C, la reacción se detuvo por calentamiento durante 3 minutos. Una vez inactivada la enzima, la mezcla se guardó en refrigeración por 2 horas. Posteriormente, se determinaron los azúcares reductores utilizando el método del ácido dinitrosalicílico (DNS). Una unidad de poligalacturonasa se definió como la cantidad que forma 1  $\mu$ mol de grupos reductores por hora a pH 5.0 y 35°C.

DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES POR EL METODO DEL  
ACIDO DINITROSALICILICO (DNS) (Miller, 1959).

Esta determinación consistió en colocar 0.5 ml del extracto enzimático inactivado y 1 ml del reactivo de ácido dinitrosalicílico. La mezcla se calentó por 15 minutos en baño de agua hirviendo; pasado este tiempo se agregó 1 ml de sal de Rochelle. Se enfriaron las muestras al chorro del agua hasta temperatura ambiente y se dejaron reposar por espacio de 40 minutos. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a 575 nm. Se preparó una curva patrón de glucosa utilizando un stock de 1 mg/ml.

OBTENCION DEL EXTRACTO CRUDO ENZIMATICO PARA DETERMINACION DE FITASA

Cada lote de 2 g de frijoles tanto control como deteriorado fue molido hasta obtener un polvo fino utilizando un pequeño molino. Posteriormente se llevó a cabo la extracción con  $\text{CaCl}_2$  5:1 ( $\text{CaCl}_2$ -frijol) con un agitador mecánico durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, el homogenado se centrifugó a 20,000 g por 30 minutos a 2°C; se recuperó el sobrenadante cuyo pH debía ser 5.0. Este extracto se concentró con 4 g de PEG durante 3 horas. Una vez concentrado se dializó contra 4 l de agua por toda la noche. El dializado se centrifugó a 3000 rpm en una centrífuga Damon, modelo IEC HN-SH por 20 minutos. El sobrenadante se utilizó como fuente de enzima.

## DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE FITASA

La actividad de fitasa se determinó por el incremento de fosfato en las muestras.

Se colocaron en tubos de ensayo las siguientes cantidades de reactivos:

0.4 ml de buffer de acetatos 0.6 M pH 5.3

0.30 ml de fitato de sodio 8 mM pH 5.3

0.4 ml de extracto crudo enzimático

1.3 ml de H<sub>2</sub>O.

Esta mezcla se incubó a 40°C por 3 horas. Transcurrido el tiempo, se inactivó la enzima con TCA 50% ; se centrifugó la muestra a 3000 rpm en una centrifuga Damon, modelo IEC HN-SH ,por 15 minutos y al sobrenadante se le determinaron proteínas totales. Inmediatamente a las muestras se les determinó fosfato para cuantificar la actividad enzimática de fitasa. Una unidad de fitasa se definió como la cantidad que forma 1  $\mu$ mol de P inorgánico por hora a pH 5.3 y 40°C.

## DETERMINACION DE PROTEINAS TOTALES

La técnica utilizada fue el método de Lowry modificado (Peterson, 1977). Primeramente se realizó una curva patrón utilizando albúmina sérica bovina (BSA). Para la construcción de dicha curva se prepararon

soluciones estándares de BSA a partir de una solución stock de BSA de una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  utilizando para diluir agua destilada. El rango de concentraciones de esta curva fué de cero  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Las muestras problema (1 $\mu\text{l}$ ) fueron llevadas a un volumen final de 400 ml con agua destilada y fueron procesadas del mismo modo que los estándares de la curva patrón. A partir de este momento a cada una de las muestras y estándares se les agregó DOC (0.15%, 0.1 ml) y se mezclaron. Se mantuvieron en reposo 10 minutos a temperatura ambiente, después de este tiempo se les agregó ácido tricloroacético (72%, 0.1 ml) frío y se incubaron por 15 minutos en hielo. Se centrifugaron a 3000 rpm en una centrífuga Damon, modelo IEC HN-SH por 15 minutos y el sobrenadante se desechó. A cada uno de los precipitados se les añadió 1 ml de agua destilada y 1 ml de reactivo A; se mezclaron y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó el reactivo B (0.5 ml); se agitaron las muestras y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente, período en el cual se desarrolló el color.

Se leyó la densidad óptica de las muestras a 750 nm. Finalmente se elaboró la gráfica de la curva patrón, colocando en las abscisas la concentración de proteínas ( $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) y en las ordenadas la densidad óptica a 750 nm. La concentración de proteína total de los extractos proteicos problema fué determinada interpolando densidades ópticas determinadas a las muestras problema en la curva patrón.

METODO PARA LA DETERMINACION DE FOSFORO INORGANICO (O-FOSFATO) SEGUN  
EL METODO DE TAUSSKY Y SHORR (1953).

Se tomó una muestra (1.5 ml) del sobrenadante de la mezcla de reacción de fitasa inactivada con TCA 50% y centrifugada y se le agregó 1 ml de molibdato ferroso de sulfato de amonio. Se leyó en un espectrofotómetro después de 1 minuto ó dentro de las 2 horas siguientes a 730 nm. Se preparó una curva patrón (entre 10 y 50  $\mu\text{gP/ml}$ ) de  $\alpha$ -fosfato utilizando un stock de 133.3  $\mu\text{g P/ml}$ . La concentración de fosfato inorgánico en el extracto crudo enzimático se determinó interpolando las densidades ópticas determinadas a las muestras en la curva patrón.

## CAPITULO VI.- RESULTADOS

Se sometieron granos de frijol (Ojo de Cabra) en condiciones de deterioro (41°C y 75% de humedad relativa) durante 7, 14 y 21 días.

Una vez deteriorados los granos, éstos fueron sometidos a procedimientos de homogenización para obtener los extractos enzimáticos de poligalacturonasa y fitasa y posteriormente, mediante métodos adecuados para cada una de las enzimas, cuantificar las variaciones de sus actividades durante los diferentes tiempos de endurecimiento con respecto a los granos control.

Los métodos empleados para cuantificar actividades enzimáticas fueron:

- a) Para poligalacturonasa.- DNS (ácido dinitrosalicílico); se detectaron azúcares reductores. (Miller, 1959).
- b) Para fitasa.- Método de Taussky y Shorr (1953); se determinó fósforo inorgánico.

### A) OBTENCION DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Para determinar alguna(s) posible(s) causa(s) que conduce(n) al endurecimiento del frijol se requiere contar con material biológico homogéneo en cuanto a carga genética e historial agronómico y que además presente diferente grado de dureza, lo que permitirá en forma clara establecer una relación causa-efecto. Esto es, entre más duro

sea el frijol, se encontrará más afectado el evento bioquímico responsable del fenómeno.

Una forma de obtener el frijol con las características antes mencionadas, es almacenando el grano de una misma variedad proveniente de un mismo lote, en condiciones de envejecimiento acelerado (alta humedad relativa y alta temperatura). Esta metodología se utilizó en el desarrollo del presente trabajo como estrategia para obtener frijol con diferentes grados de dureza. Con respecto a la carga genética y el historial agronómico, dada la dificultad para obtener dichas condiciones, se trató que el frijol fuese homogéneo en cuanto a su apariencia física.

#### B) OBTENCION DEL EXTRACTO Y DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE POLIGALACTURONASA

Se inició la experimentación para la detección de la actividad de poligalacturonasa (PG) realizando la siguiente técnica:

El lavado de los granos de frijol, su homogenización hasta la obtención del extracto crudo se realizaron tal y como se describe en "MATERIALES Y METODOS". A partir de este extracto (5 g de frijol) se prosiguió con la reacción entre éste y su sustrato. Las cantidades, concentraciones, tiempo y temperatura de incubación inicialmente se realizaron según la técnica de Konno *et al.* (1984) la cual fué modificándose en cuanto a las cantidades de reactivos.

Posteriormente se continuó con la determinación de azúcares reductores (DNS), mencionada en la sección "MATERIALES Y METODOS" (Miller, 1959). Para llevar a cabo esta determinación se preparó una curva patrón de glucosa; ésta se eligió ya que su molécula funciona de manera similar a la del ácido galacturónico para manifestarse como azúcar reductor (Figura B).

Al llevar a cabo los procedimientos tal y como se describen en la técnica de Konno (1984) (enzima, 0.2% p/v de sustrato en 1 ml de buffer de acetato de sodio 50 mM, pH 5.0, durante una hora a 37°C) y después de varias repeticiones del experimento, la actividad era nula por lo que fue necesario implementar algunas modificaciones a la técnica original, éstas fueron:

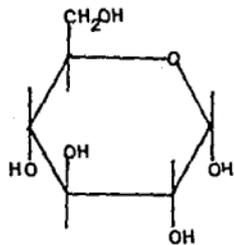
- aumentar la cantidad de extracto enzimático (1 ml)
- aumentar la concentración de sustrato (1 ml 0.5%)
- probar diferentes tiempos de incubación (30, 60, 90 y 120 minutos).

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla (3).

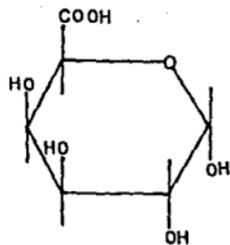
Como puede observarse, las densidades ópticas son relativamente bajas, por lo que se sugirió hacer una nueva modificación para ver si de esta manera se lograba aumentar la eficiencia del método. Se sugirió entonces concentrar los extractos crudos con PEG: las muestras, que siempre debían tener un volumen conocido y constante, se colocaron en bolsas para diálisis; éstas se colocaron en papel aluminio y se les adicionó a su alrededor una cantidad constante (4 g) de PEG y se dejaron concentrar por tres horas, transcurridas las

FIGURA (8)

$\alpha$ -D (+)-GLUCOSA



ACIDO-D - GALACTURONICO



cuales se obtuvieron volúmenes constantes.

Las modificaciones para el ensayo de PG con respecto al extracto y sustrato fueron las siguientes:

- 0.3 ml de extracto enzimático
- 1.7 ml de sustrato (en buffer).

Una vez llevada a cabo la reacción para cada uno de los tiempos de incubación de frijol control, se procedió a medir la actividad enzimática; al obtener resultados, éstos parecían no haber mejorado (Tabla 4), por lo que hubo necesidad de hacer otra modificación a la técnica.

La nueva modificación que se hizo para el siguiente experimento fué que después de concentrar las muestras con PEG éstas se dializaron contra agua destilada (deionizada) durante toda la noche (18 horas).

Esta diálisis se propuso para eliminar compuestos, como por ejemplo inhibidores de la enzima, que pudiesen entorpecer la actividad enzimática ó bien al momento de realizar las lecturas en el espectrofotómetro (porque inicialmente el blanco resultó con mayor densidad óptica que las muestras).

Una nueva dificultad que tuvo que enfrentarse fué el hecho de que una vez dializadas las muestras éstas presentaban un aspecto totalmente turbio, semejando a la leche. En un principio las muestras se manejaron tal y como se obtenían de la diálisis pero se obtenían muestras que eran sumamente turbias para poder ser leídas en el espectrofotómetro; por ello, las muestras dializadas se centrifugaron,

TABLA (3)

DETERMINACION DEL TIEMPO OPTIMO DE INCUBACION PARA FOLIGALACTURONASA

Tiempo de incubación	Densidad óptica 575 nm
30 minutos	0.042
60 minutos	0.035
90 minutos	0.031
120 minutos	0.035

TABLA (4)

DETERMINACION DEL TIEMPO OPTIMO DE INCUBACION PARA POLIGALACTURONASA (MODIFICACION).

Tiempo de incubación	Densidad óptica 575 nm
30 minutos	0.046
60 minutos	0.039
90 minutos	0.035
120 minutos	0.040

en una centrifuga refrigerada (MSL) a 3000 rpm por 15 minutos. Se tomaron los sobrenadantes como fuente de enzima y el precipitado se descartó. Cabe señalar que se tomó la precaución de experimentar con los precipitados para ver si en éstos se detectaba actividad enzimática; no se observó ninguna actividad.

Los resultados obtenidos a los 30, 60 90 y 120 minutos de incubación a 37°C, a pesar de todas las modificaciones hechas a la técnica original, continuaron siendo los mismos. Por lo anterior, se decidió prolongar los tiempos de incubación bajo las mismas condiciones de experimentación: 3, 4, 8 y 24 horas y sobre la misma experimentación se fueron adicionando modificaciones. Por ejemplo, inmediatamente después de detener la reacción entre la enzima y su sustrato por inactivación mediante calor, las muestras se refrigeraron (30 minutos) para así propiciar la precipitación de las proteínas. Se continuó con una centrifugación a 3500 rpm en una centrifuga Damon, modelo IEC HN-SH, por 15 minutos para obtener soluciones completamente transparentes y listas para proceder a la cuantificación de azúcares reductores.

Tras una serie de 3 experimentaciones realizadas hasta este momento se eligieron las condiciones de incubación 37°C y 8 horas (Tabla 5).

Como puede observarse en la tabla (5) y comparando con los resultados anteriores, se manifiesta el hecho de que al haber prolongado el tiempo de incubación favoreció los resultados para que de este experimento se dedujera el tiempo de incubación (8 horas). D

TABLA (5)  
DETERMINACION DEL TIEMPO OPTIMO DE INCUBACION DE POLIGALACTURONASA  
(CON TODAS LAS MODIFICACIONES IMPLEMENTADAS)

Tiempo de incubación	Densidad óptica 575 nm
3 horas	0.094
4 horas	0.104
8 horas	0.217
24 horas	0.121

estos resultados también se aprecia que a las 24 horas de incubación en frijol control, la actividad enzimática descendió.

Por otra parte, se estandarizó el tiempo que debían reposar las muestras una vez realizada la reacción colorimétrica del DNS, ya que se habían observado fluctuaciones en los resultados. El tiempo para la lectura de azúcares reductores sería de 40 minutos de reposo (Tabla 6).

A partir de todas las experiencias anteriormente descritas fué como se estableció la técnica para obtener los resultados del presente trabajo.

En la figura (10) se esquematiza la técnica llevada a cabo en cada uno de los experimentos llevados a cabo en los diferentes tiempos de endurecimiento.

Finalmente se presenta la Tabla (8) en donde se observan los resultados en frijol endurecido por 7, 14 y 21 días. Los resultados mostrados son el promedio de por lo menos 4 repeticiones para cada experimento.

#### C) OBTENCIÓN DEL EXTRACTO Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE FITASA

Se inició la experimentación para la detección de la actividad de fitasa basándose en la técnica de Lolás y Markakis (1977) pero la cual fué modificándose según las necesidades de la investigación.

El lavado y homogenización de los granos se efectuó tal y como se

**TABLA (6)**  
**DETERMINACION DEL TIEMPO DE REPOSO DE LAS MUESTRAS PARA CUANTIFICACION**  
**DE AZUCARES REDUCTORES.**

µg glucosa/ml	Densidad óptica 575 nm		
	40	60	120 (minutos)
10	0.037	0.013	-----
20	0.120	0.094	0.011
30	0.140	0.132	0.024
50	0.394	0.338	0.078

TABLA (7)  
DENSIDAD OPTICA DE LA CURVA PATRON DE GLUCOSA

Glucosa $\mu\text{g/ml}$	Densidad óptica 575 nm
50	$0.120 \pm 0.046$
75	$0.239 \pm 0.033$
100	$0.375 \pm 0.018$
150	$0.620 \pm 0.043$
200	$0.878 \pm 0.071$

FIGURA (9)

### CURVA PATRON DE GLUCOSA

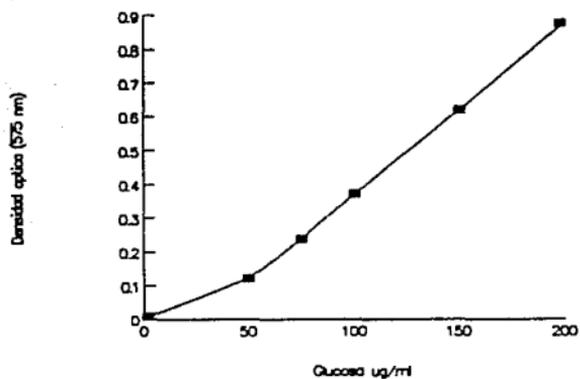


FIGURA (10)

OBTENCION DEL EXTRACTO DE POLIGALACTURONASA Y MEDICION DE SU ACTIVIDAD

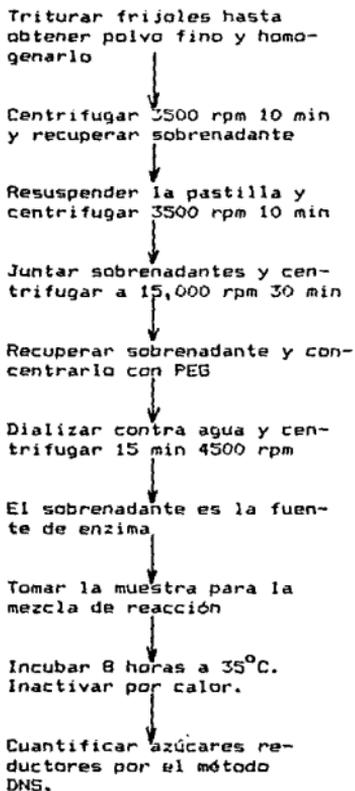


Diagrama que esquematiza la metodología empleada para PG

TABLA (8)

RESULTADOS OBTENIDOS DE PG EN FRIJOL OJO DE CABRA A DIFERENTES TIEMPOS  
DE ENDURECIMIENTO

	$\mu\text{g}$ glucosa	U I
Frijol control	103.75	0.0720
7 días endurec.	100.00	0.0694
14 días endur.	92.50	0.0642
21 días endur.	62.50	0.0434

describe en "MATERIALES Y METODOS" (a partir de 5 g).

La obtención del extracto crudo para su utilización como fuente de enzima fué variándose según los resultados que se obtuvieron al cuantificar la actividad enzimática.

Inicialmente, después de centrifugar el homogenado ajustado a pH 5.0 fué la fuente de enzima para realizar el ensayo de fitasa. La mezcla de reacción contenía: 0.4 ml de buffer de acetatos 0.6 M pH 5.3; 0.3 ml de fitato de sodio 8 mM pH 5.3; 0.4 ml de extracto crudo enzimático; 1,3 ml de agua destilada.

Utilizando la mezcla de reacción anterior, se combinaron las siguientes variables para determinar las condiciones del ensayo:

- tiempo de incubación (30, 60, 90, 120, 180, 240 y 360 minutos)
- temperatura de incubación (37, 40 y 50°C).

Una vez concluidos los tiempos de incubación, las muestras se inactivaron con TCA 50%, se centrifugaron a 3500 rpm por 15 minutos y a los sobrenadantes se les determinó fosfato según el método de Taussky y Shorr (1953) mencionado en la sección correspondiente.

De una serie de experimentos realizados en frijol control, se determinó que las condiciones óptimas de trabajo eran 40°C durante 3 horas de incubación; en estos experimentos se detectó mayor actividad enzimática a las 3 horas de incubación comparada con las otras temperaturas (37 y 50°C). A las 4 horas de incubación no hubo una gran diferencia en la actividad enzimática con respecto a 3 horas. A las 6

horas se observó un decremento en la actividad.

Una vez establecidas las condiciones de trabajo con el frijol control se procedió a realizar la experimentación con frijol endurecido por 7, 14 y 21 días. La técnica se realizó para cada tiempo de endurecimiento por varias veces y, aunque para el frijol control se obtuvo en todos los casos valores semejantes a los anteriormente obtenidos, en los demás tiempos de endurecimiento estos valores mostraron grandes fluctuaciones por lo que se procedió a modificar la metodología con el fin de afinarla y así obtener resultados que tuviesen confiabilidad y repetitividad. Se pensó que la falta de reproducibilidad de los resultados podría deberse a que existían iones, inhibidores de la enzima u otras sustancias que interferían tanto en el ensayo de fitasa como en la cuantificación de fosfato. Para tratar de eliminar posibles fuentes que interfirieran en el ensayo de fitasa se procedió a hacer varias modificaciones:

- Concentrar las muestras (después de ser centrifugadas con una cantidad constante de PEG (4 g) durante un tiempo determinado (3 horas).

- Dializar las muestras contra agua.

Una vez obtenido los extractos de la centrifugación (sobrenadante de 6 ml) éstos se concentraron utilizando una cantidad constante de PEG y por un tiempo determinado hasta obtener aproximadamente la sexta parte de su volumen original (1-1.5 ml). Posteriormente a las muestras se les determinaron proteínas totales y finalmente se dializaron para

continuar con la metodología establecida. Todos los pasos anteriores fueron ensayados para el control y los diferentes tiempos de endurecimiento.

Al experimentar con frijol control y cuantificarle proteínas totales se determinó que la dilución correcta para poder leer las muestras era de 1:400. Conociendo la dilución correcta para la determinación de proteínas en frijol control y sabiendo la cantidad presente de éstas, el equivalente de ellas se tomó en las muestras de frijoles endurecidos por diferentes tiempos para el ensayo de fitasa. La curva patrón para proteínas se elaboró con albúmina sérica bovina partiendo de una solución stock de 100  $\mu\text{g/ml}$  (Tabla 10 y Figura 12). Finalmente las muestras se dializaron contra agua durante toda la noche.

Conociendo el contenido de proteínas en cada muestra y colocando en cada una de ellas las cantidades equivalentes de proteínas para el ensayo de fitasa, se obtuvieron resultados que tuvieron confiabilidad y repetitividad ; éstos se muestran en la tabla (11).

El resultado mostraba que había un importante descenso en la actividad de fitasa a los 7 días de endurecimiento. Para saber si existía un decremento gradual, se midió la actividad enzimática a las 24, 72 y 120 horas de endurecimiento.

En la misma tabla se obtiene un panorama general del comportamiento de fitasa a lo largo de 21 días de deterioro artificial. Se observa que con respecto al frijol control hay un notable incremento en la actividad a las 24 y 72 horas de

TABLA (9)  
CURVA PATRON DE O-FOSFATO

$\mu\text{g P/ml}$	Densidad óptica 730 nm
10	$0.263 \pm 0.020$
20	$0.483 \pm 0.024$
30	$0.689 \pm 0.030$
40	$0.865 \pm 0.035$
50	$1.010 \pm 0.055$

TABLA (10)  
CURVA PATRON DE ALBUMINA SERICA BOVINA

$\mu\text{g albúmina/ml}$	Densidad óptica 750 nm
25	0.429
50	0.735
75	0.950

FIGURA (11)

### CURVA PATRON DE O-FOSFATO

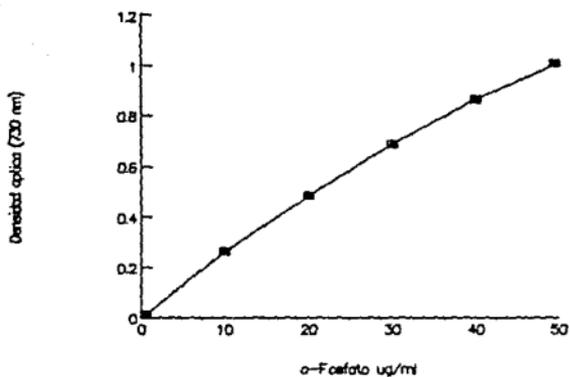


FIGURA (12)

CURVA PATRON DE ALBUMINA SERICA BOVINA

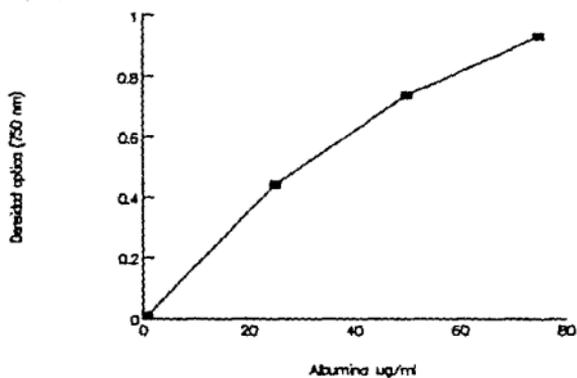


TABLA (11)

RESULTADOS OBTENIDOS DE FITASA EN FRIJOL OJO DE CABRA A DIFERENTES TIEMPOS DE ENDURECIMIENTO		
	$\mu\text{g}$ fosfato	U. I.
Frijol control	2.5	0.026
24 horas endur.	8.0	0.086
72 horas endur.	6.75	0.072
5 días endur.	2.0	0.021
7 días endur.	1.0	0.010
14 días endur.	0.75	$8.064 \times 10^{-3}$
21 días endur.	0.50	$5.376 \times 10^{-3}$

endurecimiento, en este último caso hay un leve descenso en la actividad. Y es a partir del quinto día de endurecimiento cuando se aprecia una fuerte caída de la actividad la cual es aún menor a la del control. Al séptimo día de endurecimiento, la actividad se reduce en un 50%; al día 14 de endurecimiento la actividad decrece y este hecho se acentúa a los 21 días en donde se puede detectar sólo una quinta parte de la actividad del control.

Finalmente se esquematiza la metodología empleada para la obtención del extracto enzimático y la cuantificación de la actividad de fitasa en frijol variedad Ojo de Cabra.

FIGURA (13)

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO PARA FITASA Y LA MEDICIÓN DE SU ACTIVIDAD.

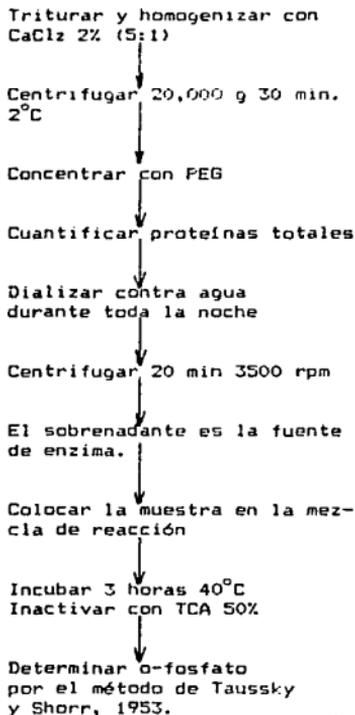


Diagrama que esquematiza la metodología empleada para Fitasa

## CAPITULO VII.- DISCUSION

En la actualidad no existen trabajos que aporten datos referentes a la modificación de las actividades de algunas enzimas que pudiesen estar implicadas en el proceso de endurecimiento del frijol.

El presente trabajo no tiene como finalidad encontrar la metodología para purificar y caracterizar a la fitasa y a la poligalacturonasa de frijol, sino únicamente, a través de técnicas simples, obtener extractos crudos que nos den indicios de la relación entre la actividad enzimática y el endurecimiento.

En la sección correspondiente se planteó la hipótesis en la que se propone un aumento en las actividades de fitasa y poligalacturonasa en relación directa al tiempo de deterioro. El aumento de fitasa ocasiona un rompimiento del fitato para liberar fosfato inorgánico el cual no actuará como captor de iones divalentes. El resultado de esto será la falta de intercambio iónico entre fitatos y pectatos lo que generará dureza en el grano.

Retomando esta hipótesis y considerando los resultados obtenidos en este trabajo se plantean las siguientes ideas.

Al observar los resultados referentes a fitasa presentados en la tabla (11) ,éstos muestran que al inicio del endurecimiento del frijol (24 horas) la fitasa se activa en gran medida tal y como se plantea en

la hipótesis. Sin embargo, a partir del quinto día de endurecimiento hay una caída notable en la actividad y ésta no vuelve a recuperarse a lo largo de los 21 días de endurecimiento; esto puede explicarse con uno ó la suma de los siguientes factores:

1° La enzima pierde gradualmente su actividad porque las condiciones de deterioro favorecen para que se altere la naturaleza de los componentes que intervienen en la fisiología y en la bioquímica del grano, sobre todo aquéllos componentes relacionados directamente con la estructura misma del cotiledón y en particular de la fitasa.

2° Considerando el principio que indica que la velocidad de una reacción es proporcional a la concentración de las moléculas reaccionantes, puede explicarse el por qué de la gran actividad en las primeras 24 horas y la baja progresiva a partir del 5° día de endurecimiento. Al disminuir el sustrato paulatinamente, y no habiendo forma en que éste se regenere, la actividad enzimática disminuye en la misma proporción.

3° Puede atribuirse la baja en la actividad de fitasa debido a la presencia de alguna(s) fosfatasa(s) inespecífica(s) que supliera(n) la actividad de fitasa.

4° La enzima puede perder su actividad como resultado del deterioro del grano.

5° La enzima es hidrolizada y posteriormente es nuevamente sintetizada.

Estos resultados son interesantes dado el comportamiento de la fitasa; nos hacen pensar que el endurecimiento provoca una gran activación solamente durante las primeras 24 horas; posteriormente, la actividad va decreciendo conforme transcurre el tiempo. Por el momento sólo puede decirse que la relación entre la actividad de fitasa y el endurecimiento es una relación inversamente proporcional.

Este esquema de comportamiento de la fitasa obliga a replantear nuevas hipótesis al respecto.

Retomando tanto los resultados obtenidos así como las posibles explicaciones del comportamiento de la fitasa, puede afirmarse que esta enzima sí se encuentra relacionada con el endurecimiento del grano; si no es una consecuencia directa de éste, al menos sí es afectada por el deterioro del grano.

Con respecto a la poligalacturonasa y de acuerdo a los resultados obtenidos (tabla B), al parecer éstos no concuerdan con la hipótesis planteada. Al comparar la actividad enzimática del frijol control con respecto a la del 7° día de endurecimiento, se detecta una pequeñísima disminución (menor del 4%); hacia el día 14 de endurecimiento hay otro pequeño descenso del 11% (con respecto al control) para el día 21 de endurecimiento aún puede cuantificarse su actividad enzimática en un poco más del 60%.

Este comportamiento presentado por la poligalacturonasa bajo las

condiciones de trabajo del laboratorio, nos están indicando muy probablemente que:

1° La actividad de la poligalacturonasa no es afectada por el deterioro de una manera considerable por lo que puede especularse que no es una de las causas principales para que el frijol se endurezca.

2° La actividad de la poligalacturonasa es lenta porque la reacción entre los fitatos y las sales de poligalacturonato está inhibido por la presencia de los iones  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$ . El endurecimiento favorece la actividad de fitasa en las primeras 72 horas; pasado este tiempo, el fitato habrá sido consumido por la fitasa y el restante habrá ya reaccionado por lo que ya no habrá sustrato disponible para la quelación de los iones divalentes. Esto generará la inmovilización iónica y por tanto la lámina media se tornará cada vez más dura.

Para el caso de la poligalacturonasa no se cuantificó la actividad enzimática entre el control y el día 7 de endurecimiento porque, como puede observarse en la tabla (8), la diferencia entre ambos tiempos se considera despreciable y esto sugiere que no hay un cambio notable en la actividad en este lapso.

En base a lo anteriormente expuesto, el fenómeno del endurecimiento puede explicarse con el siguiente modelo: durante el endurecimiento el contenido de fitina disminuye dado que se activa la fitasa en las primeras horas y por tanto, la movilización iónica es

muy lenta si no es que nula; por no existir un captor de iones (la fitina) la poligalacturonasa no se activa por la presencia de los iones  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  lo cual repercutirá en que no se separen las células del cotiledón del frijol y haya endurecimiento progresivo.

## CAPITULO VIII.- CONCLUSIONES

1) Parece que no existe una relación entre poligalacturonasa y su sustrato como causa del endurecimiento del grano de frijol.

2) La subida notable de fitasa en las primeras horas del endurecimiento parece estar relacionada con la notable caída de fitina durante el mismo tiempo, lo cual podría constituir una causa del endurecimiento del grano.

## CAPITULO IX.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aykroyd, W. R. Las leguminosas en la nutrición humana. FAO: estudios sobre nutrición. No. 19. Roma (1964): 152.
- 2.- Belavady, B., S. Banerjee (1953). Studies on the effect of germination on the phosphorus values of some common Indian pulses. Food Res. 18: 223.
- 3.- Biswas, S., B.B. Biswas (1965). Enzymatic synthesis of guanosine tryphosphate. Biochem. Biophys. Acta. 108: 710.
- 4.- Bourdillon, J. (1951). A Crystalline bean seed protein in combination with phytic acid. J. Biol. Chem. 189: 65.
- 5.- Bourges, H. Nutritional status of the Mexican population. In: Nutrition in the 1980's: constraints on our knowledge. Alan R. Liss. Inc. N.Y. (1981):249-269..
- 6.- Braverman, J.B.S. Introducción a la bioquímica de los alimentos. Ediciones Omega. 3a. ed. Barcelona (1980):111-117.
- 7.- Bressani, R., M. Flores y L. G. Elías (1973). Acceptability and value of food legumes in human diet. In: Potential of field beans and other food legumes in Latin America. Cali, Colombia. Series Seminars. No. 2E: 161-187.
- 8.- Bressani, R. (1982). El significado alimentario y nutricional del endurecimiento del frijol. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 32 (2):308-325.
- 9.- Bretzlöff, C. W. (1968). Some aspects of cooked potato texture and appearance:1. Translucency Amer. Potato J. 45:17.
- 10.- Burr, H. K., S. Kon and H. J. Morris (1968). Cooking rates of dry beans as influenced by moisture content and temperature and time storage. Food Technol. 22: 336-338.
- 11.- Cosgrove, D. J. (1966). The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates. Rev. Pure and Appl. Chem. 16: 209.
- 12.- Crean, D. E. C. and D. R. Halsman (1963). Interaction between phytic acid and divalent cations during the cooking of dried peas. J. Sci. Food Agr. 14: 824-833.
- 13.- Curtois, J. et C. Perez (1948a). Recherches sur la phytase. 8. Teneur en inositolphosphates et activité phytasique de diverses graines. Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris) 30: 195.

- 14.- Curtois, J. et C. Perez (1948b). Recherches sur la phytase. 11. Essais en vue d'obtenir des matières premières dont l'activité phytasique initiale a été artificiellement accrue. Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris) 30: 631.
- 15.- Dalling, M. J. and P. L. Bhalla. Mobilization of nitrogen and phosphorus from endosperm. In: Seed Physiology. Vol. 2. Germination and reserve mobilization. David. R. Murray Ed. Australia (1984): 161-199.
- 16.- Darbre, A. and B. W. Norris (1957). Determination of free combined inositol in the ungerminated and the young plant. Biochem. J. 66: 404.
- 17.- Doesburg, J. J. (1963). Pectic substances in fresh and preserved fruits and vegetables. Wageningen, The Netherlands. Institute for Research on Storage and Processing of Horticultural Produce (I.B.V.T. Communication No. 25).
- 18.- Elías, L. G. (1982). Conocimientos actuales sobre el proceso de endurecimiento del frijol. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 32 (2): 233-257.
- 19.- Gloyer, W. D. (1921). Sclerema and hardshell, two types of hardness of the bean. Proc. Am. Assoc. Official Seed Analysts. 13: 60.
- 20.- Gutiérrez Venegas, G. (1986). Aspectos bioquímicos del endurecimiento del frijol. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- 21.- Hahn, D. M., F. T. Jonnes, I. Akhavan and L. B. Rockland (1977). Light and scanning electron microscope studies on dry beans: intercellular gelatinization of starch in cotyledons of large lima beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Food Sci. 42: 1208-1212.
- 22.- Haisman, D. R. Factors controlling the texture of peas. In: Proceedings. First International Congress on Food Science and Technology. London, England (1962). Vol. 1: 711-718.
- 23.- Hall, J. R. and T. K. Hodges (1966). Phosphorus metabolism of germinating oat seeds. Plant Physiol. 41: 1459-1464.
- 24.- Hamad, N. and J. J. Powers (1965). Imbibition and pectic content of canned dry lima beans. Food Technol. 19: 216-220.
- 25.- Hellendoorn, E. W. (1979). Beneficial physiological activity of leguminous seeds. Qual. Plant Pl. F. Ds hum. Nutr. XXIX, 1-2: 227-244.
- 26.- Hernández, M., A. Chávez, H. Bourges. Valor nutritivo de los alimentos mexicanos. Instituto Nacional de la Nutrición. 10a. ed. México (1987):22.

- 27.- Hughes, J.C., A. Grant and R. M. Faulks (1975). Texture of cooked potatoes: the effect of ions and pH on the compressive strenght of cooked potatoes. *J. Sci. Food Agr.* 26: 739.
- 28.- Jackson, G. M. and E. Varriano-Marston (1981). Hard-to-cook phenomenon in beans: effects of accelerated storage on water absorption and cooking time. *J. Food Sci.* 46: 799-803.
- 29.- Kaplan, L. Archaeological *Phaseolus* from Tehuacán. In: The prehistory of the Tehuacán Valley. Douglas E. Byers ed. Volume 1. Environment and subsistence. University of Texas Press. (1967): 201-211.
- 30.- Kon, S. (1980). Effect of soaking temperature on cooking and nutritional quality of beans. *J. Food Sci.* 44: 1329-1340.
- 31.- Konno, H., T. Yamaya, Y. Yamasaki and H. Matsumoto (1984). Pectic polysaccharide breakdown of cell walls in cucumber roots grown with calcium starvation. *Plant Physiol.* 76 (3): 633-634.
- 32.- Linehan, D. J. and J. C. Hughes (1969). Texture of cooked potato. 3. Intercellular adhesion of chemically treated tuber sections. *J. Sci. Food Agr.* 20: 119.
- 33.- Lolas, G. and P. Markakis (1975). Phytic acid and other phosphorus compounds of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agr. Food Chem.* 23: 13-15.
- 34.- Lolas, G. and P. Markakis (1977). The phytase of navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Sci.* 42 (4): 1094-1097.
- 35.- Makower, R. U. (1969). Changes in phytic acid and acid-soluble phosphorus in maturing Pinto beans. *J. Sci. Food Agr.* 20: 82.
- 36.- Mandal, N. C. and B. B. Biswas (1970). Metabolism of inositol phosphates. 1. Phytase synthesis during germination in cotyledons of mung beans (*Phaseolus aureus*). *Plant Physiol.* 45: 4-7.
- 37.- Mandal, N. C., S. Burman and B. B. Biswas (1972). Isolation, purification and characterization of phytase from germinating mung beans. *Phytochemistry.* 11: 495.
- 38.- Mattson, S. (1946). The cookability of yellow peas. *Acta Agr. Suec.* 2: 185-231.
- 39.- Mattson, S., E. Akeberg, E. Ericksson, E. Koutter-Anderson and K. Vahtras (1950). Factors determining the composition and cookability of peas. *Acta Agr. Scand.* 1: 40-61.
- 40.- Mayer, A. M. (1958). The breakdown of phytin and phytase activity in germinating lettuce seeds. *Enzymologia.* 19: 1.

- 41.- McCance, R. A. and E. M. Widdowson (1944). Activity of the phytase in different cereals and its resistance to dry heat. *Nature* (London). 153: 650.
- 42.- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31 (3): 426-428.
- 43.- Molina, M. R., M. A. Baten, R. Gómez-B, K. W. King and R. Bressani (1976). 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.
- 44.- Moscoso, W. (1981). Relationships between the hard-to-cook phenomenon in red kidney beans, and water absorption, puncture force, pectin, phytic acid and minerals. *Dissertation Abstracts Int.* 41: 4443.
- 45.- Muller, F. (1967). Cooking quality of pulses. *J. Sci. Food Agr.* 18: 192.
- 46.- Peers, F. G. (1953). The phytase of wheat. *Biochem. J.* 53: 102.
- 47.- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochem.* 83: 346-356.
- 48.- Preece, I. A. and H. J. Gray (1962). Studies on phytin. 2. Preliminary study of some barley phosphatases. *J. Inst. Brew.* 68: 66.
- 49.- Quenzer, N. M., V. L. Huffman and G. E. Burns. (1978). Some factors affecting pinto beans quality. *J. Food Sci.* 43: 1059-1061.
- 50.- Rockland, L. B. and E. A. Metzler (1967). Quick-cooking lima and other dry beans. *Food Technol.* 21 344-348.
- 51.- Rockland, L. B. and F. T. Jones (1974). Scanning electron microscope studies on dry beans: effects of cooking on the cellular structures of cotyledons in dehydrated large lima beans. *J. Food Sci.* 39: 342-346.
- 52.- Saio, K. (1964). The change in inositol phosphates during the ripening of rice grains. *Plant and Cell Physiol.* 5: 393.
- 53.- Secretaría de Agricultura y Recursos Humanos. Dirección General de Economía Agrícola. Avances de siembra y cosecha 1985-1986. México (1986).
- 54.- Scrimshaw, N. S. y V. R. Young (1976). Las necesidades de la nutrición humana. En: *Energía y consumo de sustancias fundamentales. Investigación y Ciencia.* 2: 31-45.
- 55.- Sefa-Dedeh, S., D. W. Stanley and P. W. Voisey (1979). Effect of storage time and conditions on the hard-to-cook defect in cowpeas (*Vigna unguiculata*). *J. Food Sci.* 44: 790-796.

56.- Smithies, R. H. Effect of chemical constitution on texture of peas. In: Proceedings of the Society of Chemistry and Industries. London. The Society (1960): 111.

57.- Snyder, E. B. (1936). Some factors affecting the cooking quality of the pea and Great Northern types of dry beans. Univ. Nebraska Agr. Exper. Station Research Bulletin: 85.

58.- Sobolev, A. M. and M. A. Radionova (1966). Phytin synthesis by aleurone grain in ripening sunflower seeds. Soviet Plant Physiol. 13: 95B.

59.- Sousa, S. M. y S. A. Delgado. Herramientas y consideraciones para la revisión del género *Phaseolus* en México. En: Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México. E. Mark Engleman ed. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México (1979): 58-82.

60.- Takayama, K. K., P. Muneta and A. C. Wiese (1965). Lipid composition of dry beans and its correlation with cooking time. J. Agr. Food Chem. 3: 269-271.

61.- Taussky, H., E. Shorr (1953). A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. J. Biol. Chem. 202: 675-685.

62.- Williams, S. G. (1970). The role of phytic acid in the wheat grain. Plant Physiol. 45: 376-381.