



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES EN LA PECTINA QUE OCURREN DURANTE EL REMOJO DE SEMILLAS DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*)

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUÍMICO DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A :  
VICTOR HUGO BLANCAS MORALES

207445



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

MEXICO, D. F.

2001





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**


PRESIDENTE	PROF. IRMA OFELIA BERNAL LUGO
VOCAL	PROF. AMANDA GALVEZ MARISCAL
SECRETARIO	PROF. JUAN DIEGO ORTIZ PALMA PEREZ
1er SUPLENTE	PROF. ELPIDIO GARCIA RAMIREZ
2º. SUPLENTE	PROF. ISMAEL BUSTOS JAIMES

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

LABORATORIO 104, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

  
DRA IRMA OFELIA BERNAL LUGO  
ASESOR DEL TEMA

  
M EN C ENRIQUE MARTINEZ MANRIQUE  
SUPERVISOR TÉCNICO

  
VICTOR HUGO BLANCAS MORALES  
SUSTENTANTE

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, U N A.M; bajo la asesoría de la Dra Irma O Bernal Lugo y la supervisión técnica del M en C Enrique Martínez-Manrique

Agradezco el apoyo brindado por el proyecto de la DGAPA IN 208998 y por la beca que me otorgo para la realización de está tesis.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco muy en especial al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, U.N.A.M, por haber proporcionado todas las facilidades para la culminación de este proyecto

Agradezco a la M .en C. Maria del Carmen Parra por sus valiosos consejos y la confianza que me brindo

Agradezco a el Dr Agustín López Munguía por la donación de los marcadores moleculares de dextranas para realizar la filtración en gel

Agradezco a la Dra. Patricia Coello por la donación del material para la filtración en gel.

Agradezco a mis compañeros y amigos del Laboratorio 104 por su colaboración y apoyo en la realización de este trabajo.

Agradezco al laboratorio 321 por su apoyo en la realización de este proyecto.

Agradezco a todas las personas involucradas en la culminación de este proyecto

Dedico este proyecto a la labor que se realiza en la UNAM para formar personal calificado enfocado a la generación de ciencia básica y tecnología para resolver las carencias que sufre México y en especial a todos los que dedican su obra para revertir las condiciones de extrema pobreza en que vive la mitad de la población de este país.

Víctor Hugo Blancas Morales

A MI PADRE  
ISAÍAS SILVERIO BLANCAS MORALES

Por ser el titán que le da dirección a esta familia que se mantiene unida y la lleva por el camino de la superación

A MI MADRE  
DELFINA MORALES ZAMITIZ

Por ser el mas claro ejemplo de constancia y dedicación a nuestra familia y a su trabajo.

A MIS HERMANOS  
JOSE ALBERTO Y ANA SILVIA

Por su comprensión y su cariño

## RESUMEN

La semilla de frijol es consumida por la mayor parte de la población mexicana por su bajo costo y fácil preparación además de contribuir en la dieta como una fuente abundante de proteínas y carbohidratos necesarias para el cuerpo humano.

Para su consumo en el medio rural y en algunos casos en la población urbana es sometida a un remojo durante la noche y después a un tratamiento térmico que modifica su textura para que de esta manera adquiera las características de palatabilidad para su degustación.

Estudios realizados indican que las características de textura en productos de origen vegetal dependen de los componentes de la pared celular, entre ellos la lámina media formada principalmente por pectina. Este componente se solubiliza durante la cocción de semillas, lo que permite la separación celular y por tanto la suavización del tejido.

El remojo de la semilla disminuye los tiempos de cocción, lo que sugiere que el remojo puede provocar cambios que faciliten la termo-solubilización de la lámina media los cuales serían los responsables de la disminución del tiempo de cocción.

En este trabajo se estudió el efecto del remojo en las características de la pectina de la pared celular primaria de semillas de frijol, con la finalidad de identificar los cambios que induce el remojo en la pectina.

Para ello se determinó el tiempo de cocción por el método Mattson, el aislamiento de la pectina se llevó a cabo utilizando CDTA, se estimó su composición de ácidos urónicos y azúcares neutros, además de su comportamiento en una resina de intercambio iónico y se finalizó obteniendo el peso molecular de los polisacáridos de la pectina con la técnica de filtración en gel.

Se encontró que la cantidad de pectina extraída fue diferente para cada cultivar. La fracción de pectina precipitada con etanol fue también cultivar dependiente. La composición química extraída de las semillas secas fue diferente de la extraída de semillas remojadas. Esta última fue rica



en xilosa, arabinosa y galactosa. Este resultado se interpretó como que la hidratación de la pared celular facilita la extracción de sus componentes resultando en un ablandamiento estructural de la pared celular.

El remojo de la semilla disminuyó el peso molecular de las pectinas. Aparentemente este cambio fue el resultado de disminuir el tamaño de las regiones de homogalacturonanos.

## JUSTIFICACIÓN

México es el cuarto país productor del frijol en el mundo, después de La India, Brasil y China; aportamos el siete por ciento de la producción mundial, con una leve tendencia al crecimiento (Camara de diputados, 2000a, SAGARPA, 1997a)

El frijol es el segundo cultivo en nuestro país antes del maíz y después del trigo y arroz, en cuanto al espacio sembrado y ha alcanzado los 2.2 millones de hectáreas, que representan el 11.5 por ciento del total de nuestra superficie agrícola (Camara de diputados, 2000a, SAGARPA, 1997b)

Aproximadamente el 65 cinco por ciento de su cultivo se concentra en la región centro-norte y pacífico-norte de la república. Los principales estados productores son Zacatecas, Durango, San Luis Potosí y Chihuahua en siembras de temporal durante el ciclo primavera-verano, aportando el 65 por ciento de la producción nacional de la temporada; y Sinaloa y Nayarit, con siembras de riego principalmente, representan el 74 por ciento correspondiente al periodo otoño-invierno (Camara de diputados, 2000a, SAGARPA, 1997b).

Pero esta leguminosa que es básica en la dieta del pueblo mexicano y la principal fuente de ingreso para los campesinos de la zona semidesértica del país, actualmente sufre escaso manejo post-cosecha tal como precarias técnicas de cosecha, aunadas a una ausencia de infraestructura y de equipo para la limpieza y cribado, que contribuyen importantemente al deterioro de la calidad y del precio del frijol. La presencia de tierra, de material vegetal y de piedras, y la presencia de granos dañados por plagas o quebrados son características que la industria empacadora y de proceso (enlatado) toman muy en cuenta para rechazar el producto y ofrecer precios desfavorables para el productor (SAGARPA, 1997b).

A esta situación hay que añadir el Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN), que ha resultado a siete años de su puesta en marcha gravemente lesivo para el sector agropecuario y forestal mexicano. La situación se agrava con el ingreso de frijol extranjero (proveniente de Nicaragua, Estados Unidos y Canadá) al país, esto ocurre de manera tan irregular, que no es posible conciliar un dato preciso sobre la importación autorizada y la real además de la avalancha de frijol que entra de contrabando (Camara de diputados, 2000b, Camara de diputados, 2000c).

Esto obstaculiza la comercialización del frijol mexicano y propicia la acumulación de inventarios en donde el frijol sufre largos periodos de almacenamiento (mínimo 6 meses), para poder ubicarlo en el mercado; cabe mencionar que estas condiciones de almacenamiento son precarias por una ausencia de infraestructura adecuada para mantener su calidad culinaria y nutrimental. Provocando que el 30% de la cosecha se pierda por el endurecimiento de la semilla y además tenga largos tiempos de cocción que involucran un mayor consumo de energéticos y un mayor gasto económico, además de que una cocción prolongada provoca la degradación de nutrimentos importantes que aporta su consumo (SAGARPA, 1997b).

El estudio del método tradicional de preparación de distintas variedades de frijol fresco y en particular las modificaciones que ocurren en la pectina durante el remojo nos permitirá tener un punto de comparación contra semillas de frijol endurecido y de esta manera generar el conocimiento necesario para el esclarecimiento del fenómeno de endurecimiento de frijol que afecta su calidad culinaria y es de gran importancia en la dieta de la población rural.

Otro estudio que se realiza para aliviar la situación del frijol en México es para mejorar la producción y la gama de cultivos en tierras marginales y frágiles, "que, mayoritariamente, son trabajadas por agricultores con escasos recursos". La UNAM está desarrollando biotecnología de plantas con resistencia a la sequía. Para el estudio de este problema biológico eligieron tres plantas como modelos experimentales: *Phaseolus vulgaris* (frijol común), *Arabidopsis thaliana* y la planta africana *Craterostigma plantagineum* que puede resistir la sequía meses o aún años, reasumiendo su forma normal y actividades fisiológicas al cabo de 2 a 6 horas después de estar en contacto con el agua (Jalil Saab, 2001).

## INTRODUCCIÓN

Uno de los principales alimentos en América Latina es sin duda el frijol (*Phaseolus vulgaris*). En México se consume por todos los estratos sociales. Esta Leguminosa provee cerca del 30% de la proteína de la dieta de poblaciones rurales (Tandon *et al.*, 1957 publicado en Jones y Boulter, 1983) También constituye una fuente importante de carbohidratos complejos, fibra y algunos minerales como el hierro (Bourges, 1987b). Sus proteínas presentan un alto contenido de lisina, sin embargo tienen pocos aminoácidos azufrados, por lo que se complementa cuando se consume con cereales (arroz, maíz, cebada y ajonjolí) (Bourges, 1987a); De esta forma el frijol aporta la lisina y los cereales aportan los aminoácidos azufrados como son la metionina y la cisteína (Bourges, 1987a)

No obstante todas las ventajas que presentan, las leguminosas contienen factores tóxicos y antinutricionales que limitan su aprovechamiento, entre estos se encuentran los inhibidores de tripsina, fitohemaglutininas, factores bociogénicos, glucósidos cianogénicos, factores de flatulencia, etc. (Bourges, 1987b).

Para su consumo en el medio rural y en algunos casos en la población urbana el frijol es sometido a un remojo de 12 a 18 horas y posteriormente a un tratamiento térmico. la cocción Durante el remojo ocurren cambios fisicoquímicos como la hidratación de la semilla y la solubilización de compuestos hidrosolubles. Así durante la cocción ocurren cambios estructurales y fisicoquímicos como la gelatinización del almidón, la desnaturalización de las proteínas y la solubilización y despolimerización de las pectinas (Liu, 1995, MacDougall *et al.*, 1996). Estos cambios se reflejan en la suavización de la semilla, la pérdida de toxicidad, la adquisición de sabor agradable y un aumento en su digestibilidad (Tovar, 1997) Lo anterior sugiere que cualquier factor que modifique la facilidad de estas biomoléculas para realizar su transición térmica afectará en forma importante el proceso de cocción

Estudios realizados indican que las características de textura en productos de origen vegetal dependen de los componentes de la pared celular, entre ellos la lámina media formada principalmente por pectina (Deman *et al.* 1976) Este componente se solubiliza durante la cocción

de semillas, lo que permite la separación celular y por tanto la suavización del tejido (Bernal y col., 1997)

El remojo de la semilla previo a la cocción disminuye los tiempos de cocción, lo que sugiere que el remojo puede provocar cambios que faciliten la termosuavización de la pectina de la lámina media (Tovar, 1997). Con la finalidad de identificar si el remojo provoca modificaciones en las pectinas de las semillas de frijol, se estudiaron las pectinas aisladas de semillas secas y remojadas conforme a la composición de azúcares neutros, peso molecular, y distribución en una columna de intercambio iónico.

# I. ANTECEDENTES

## 1.1 Frijol

### 1.1.1 Origen y generalidades

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) fue domesticado en Latino América en donde se han encontrado evidencias de su existencia hace mas de 7,000 años, en dos centros de origen a) En el Valle de Tehuacán. Puebla y b) En el Callejón de Huayales, Perú “en los Andes” (Díaz de León. 1989; Graham *et al*, 1997; Mendoza. 1992). El numero de especies existentes en México fluctúan alrededor de 50 y entre ellas se encuentran las cuatro especies que ha domesticado el hombre *Phaseolus vulgaris* L, *P. coccineus* L, *P. lunatus* L, y *P. acutifolius* Gray (Vaquero, 1986).

La familia Leguminoseae es una de las tres familias más grandes. con 600 géneros y 12,000 especies. En esta familia están representadas todas las principales formas de crecimiento: hierbas, tanto anuales como perennes, arbustos, enredaderas y árboles, que se encuentran distribuidas por todo el mundo, en climas tropicales y templados; sus raíces tienen nudosidades que encierran bacterias del género *Rhizobium*, con las cuales viven en simbiosis. lo que les faculta para fertilizar el suelo con compuestos nitrogenados, por lo cual se practica el cultivo mixto, como maíz-frijol y caña de azúcar-frijol (Cruz, 1996; Graham *et al*, 1997; Mendoza, 1992; Vaquero, 1986).

### 1.1.2 Estructura física del grano

El frijol. llamado también judía, alubia, habichuela, poroto, etc, es el fruto de la planta contenido en una vaina o legumbre (ejote) colgante, recta o arqueada comprimida, gibosa o mucronada, que se abre en dos valvas. para dar lugar a las semillas que son de forma variable. generalmente reniforme, mas o menos comprimidas y algunas veces redondeadas o esféricas. Según éstas se distinguen numerosas variedades de frijol como amarillo, blanco, bayo, negro, etc.. entre las cuales se forman incontables híbridos (Bourges, 1987a. Mendoza, 1992)

La semilla que se desarrolla a partir de un óvulo. en la madurez consta de las siguientes partes: el embrión y la cubierta externa o testa que protege a los cotiledones que a su vez, protegen al eje embrionario (ver Figura 1). Externamente presenta el hilio, el micropilo y el rafe; el hilio es una gran cicatriz ovalada que aparece en el lugar donde la semilla estaba unida al funículo (cordoncillo del óvulo que contiene tejido vascular). el micropilo es una pequeña abertura de la

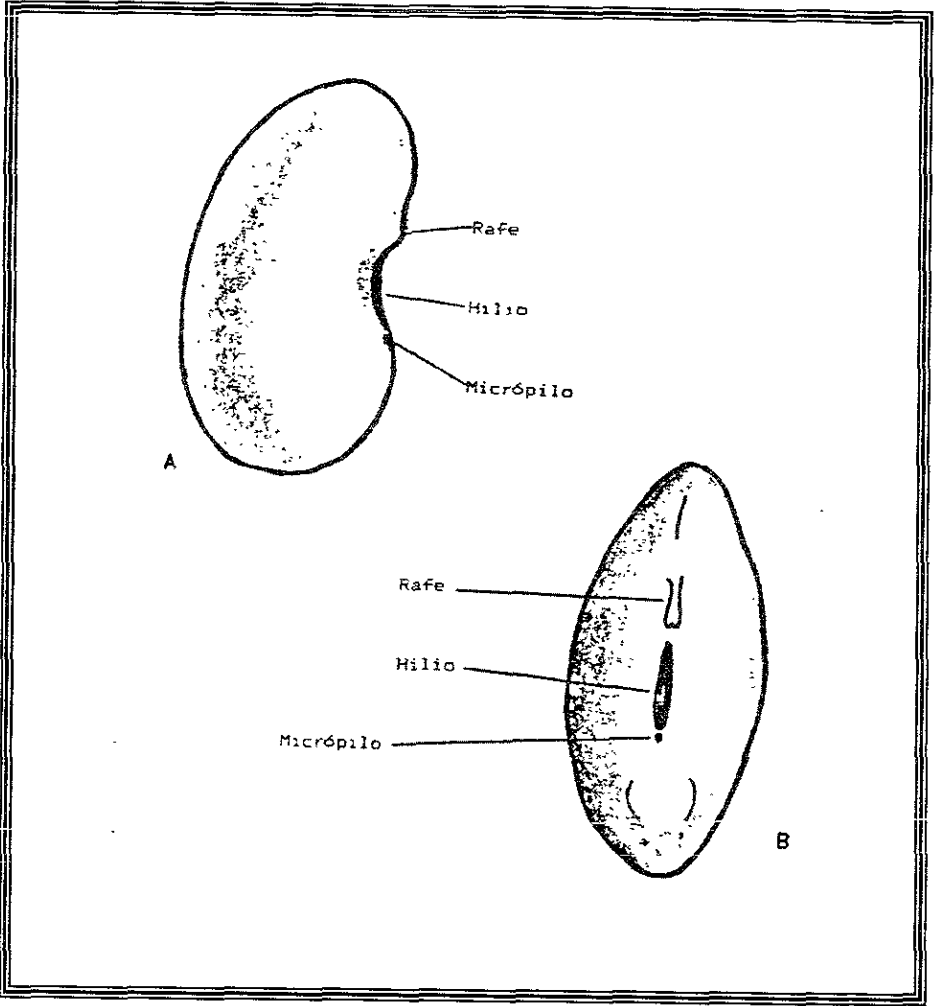


Figura 1. Semilla de Frijol, A) Vista lateral externa, B) Vista frontal externa. Tomada de Liu (1995).

cubierta de la semilla que se localiza a un lado del hilio y que correspondía en el óvulo al orificio a través del cual entraba el tubo polínico, el rafe es un borde situado a un lado del hilio y opuesto al micropilo y al funículo (Figura 1) (Liu, 1995, Mendoza, 1992).

Al retirar la testa de un frijol remojado, lo que queda al descubierto es el embrión, constituido por el eje embrionario, el cual está formado por el hipocótilo o talluelo que tiene en un extremo un primordio radical llamado radícula y en el otro los cotiledones y un ápice con las primeras hojas denominado plúmula (Figura 2) (Mendoza, 1992, Liu, 1995).

El eje embrionario consta del epicotilo que es la parte terminal de la plántula. La parte inmediata al eje es el hipocotilo, que se prolonga hacia la radícula convirtiéndose en la raíz primaria de la planta (Díaz de León, 1989).

### *1.1.3 Textura de la semilla de frijol*

La textura del frijol y de los alimentos en general, es resultado de su microestructura, la cual depende de las fuerzas físicas existentes entre los componentes químicos celulares (Stanley, 1986, Liu, 1995).

Durante el procesamiento requerido para su consumo la microestructura se modifica de forma tal que el producto vegetal se suaviza. En el caso del frijol su procesamiento involucra dos etapas la primera es el proceso de absorción de agua ocurrido durante el remojo de la misma, de tal manera que existe cierta correlación entre la capacidad de hidratación y la dureza de la semilla y la segunda el proceso de cocción de la semilla, durante dicho proceso el frijol se suaviza, desarrolla un sabor y aroma agradables y pierde toxicidad (ya que el tratamiento térmico es suficiente para inactivar los inhibidores de tripsina, fitohemaglutininas, factores biogénicos, glucósidos cianogénicos, factores de flatulencia, etc.), volviéndose digerible (Bourges, 1987b; Mendoza, 1992).

La modificación de la microestructura del frijol se realiza en dos etapas, en el remojo y en la cocción (Bernal *et al*, 1997; Anzaldúa-Morales *et al*, 1996; Clemente *et al* 1998; Díaz, 1989).



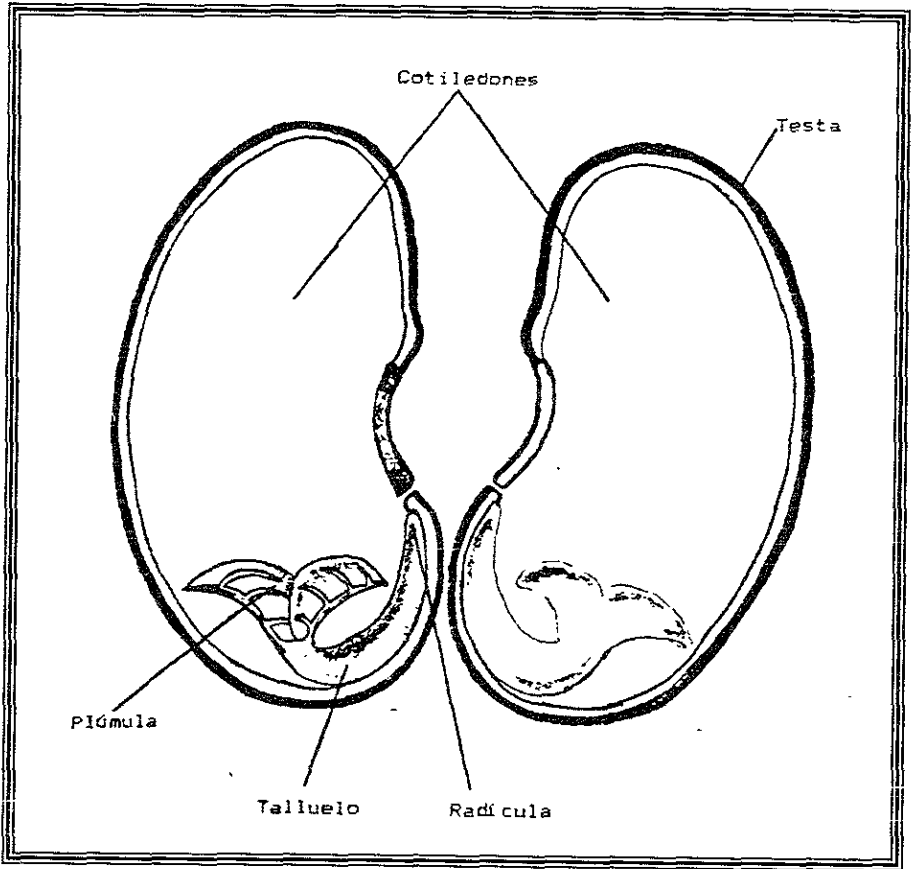


Figura 2. Semilla de frijol abierta, mostrando al embrión. Tomada de Mendoza (1992)

### 1.3.1 El proceso de remojo

Los cambios durante el remojo son dependientes de la absorción de agua (Sefa-Dedeh y Stanley, 1979), que se realiza en dos pasos.. Primero la penetración del agua a través de la testa, y enseguida la penetración y difusión uniforme del agua en los cotiledones; de esta forma, la testa es la primera barrera que enfrenta el agua antes de penetrar hacia el interior de la semilla (Sefa-Dedeh y Stanley, 1979)

Con respecto a la penetración del agua a través de la testa, Sefa-Dedeh y Stanley (1979) reportan que los cambios de textura asociados con el remojo y la absorción de agua en leguminosas son influenciados por características anatómicas como estructura y grosor de la testa, tamaño del hilio y naturaleza y tamaño del micropilo. Anzaldúa *et al* (1996) y Rizvi and Tong (1997) proponen que la cinética de ablandamiento durante el remojo sigue un mecanismo cinético de primer orden, donde todas las variedades estudiadas mostraron una fase rápida de ablandamiento y una siguiente fase en la que hay pequeños cambios en la dureza de las semillas (Sefa-Dedeh y Stanley, 1979)

Durante el proceso de remojo de la semilla a temperatura ambiente, se dan los siguientes eventos: los granos de almidón se hidratan y aumentan su volumen, (Sefa-Dedeh y Stanley, 1979), entonces la adhesión intercelular de la semilla disminuye a causa de la hidratación de los polisacáridos de la pared celular, lo que da como resultado la disminución en la dureza de la semilla.

### 1.3.2 El proceso de cocción

El proceso de cocción es tradicional en la preparación de frijoles para su consumo. Durante el proceso de cocción, ocurren cambios estructurales y químicos en la semilla de frijol. En este tratamiento térmico, el calor aplicado induce en la semilla los cambios estructurales que conducen a su ablandamiento, dichos cambios son, la gelatinización de los gránulos de almidón, que se realiza paulatinamente conforme se incrementa la temperatura hasta llegar aproximadamente a los 65°C, remoción parcial de los polifenoles, y la fractura y termo-solubilización de la lámina media, todo esto conduce a daños mecánicos como puede ser el estallido celular, y finalmente, a la pérdida de la rigidez o dureza (Bernal *et al*, 1997, Jones and Boulter, 1983, Ng *et al*, 1997, Sefa-Dedeh y Stanley, 1979, Waldron *et al*, 1997).

La suavización de la semilla por lo tanto, depende principalmente de cambios físicos de sus constituyentes celulares, como son los almidones, las proteínas, los lípidos, los polifenoles y desde el punto de vista estructural, la pared celular y su lamina media (Bernal *et al.* 1997, Mendoza, 1992, Waldron *et al.*, 1997).

Por otra parte, el efecto del calor durante el proceso de cocción, inicialmente altera las propiedades físicas de la semilla, como pérdida de firmeza y ruptura de la membrana celular, ambos asociados a la pérdida de presión de turgor, además del ablandamiento adicional por un incremento en la separación celular (Waldron *et al.*, 1997).

Posteriormente se catalizan algunas reacciones que influyen la textura, tal como la termosolubilización de la pectina favorecida por la reacción química de  $\beta$ -eliminación (Bernal *et al.*, 1997; Howard *et al.*, 1997; Fuchigami *et al.*, 1995a; Stolle-Smith *et al.*, 2000, Waldron *et al.*, 1997).

En resumen, el proceso de cocción esta relacionado a cambios en la microestructura de la semilla que se provocan inicialmente por la presencia del agua durante el periodo de remojo y posteriormente por el efecto del calor usado durante la etapa de cocción (Sefa-Dedeh and Stanley, 1979).

Las diferencias en tiempos de cocción que se observan al compararse distintas variedades de frijol recién cosechado son debidas a factores inherentes a la semilla, los cuales son influenciados directamente por aspectos genéticos y ambientales (Bourges, 1987a).

#### 1.1.4 La pared celular

La pared celular determina una gran extensión de atributos de calidad de frutas y vegetales y sus características de procesamiento (Doco *et al.*, 1997, Hoagland *et al.*, 1997), por lo que a continuación se resume la estructura de la pared celular.

La pared celular es una estructura de las células vegetales cuya función principal es proporcionar rigidez, la forma y el tamaño de las células vegetales (Thompson and Fry, 2000, McDougall *et al.* 1996). Las células de las plantas superiores tienen una pared celular rígida y ella

interacciona con cada una de las otras a través de sus paredes celulares. De esta manera el desarrollo y morfogénesis de las plantas superiores las cuales son organismos multicelulares están restringidos a las propiedades de las paredes celulares (Thompson and Fry, 2000)

Muchos de los polisacáridos presentes en las plantas se encuentran en las paredes celulares, y todas ellas tienen pared celular primaria y lámina media y algunas desarrollan pared celular secundaria como una extensión de la pared celular primaria, esto es común en los tejidos en desarrollo (Carpita and Gibeaut, 1993, McDougall *et al*, 1996)

La composición de la pared celular primaria y las interacciones intermoleculares entre los componentes de la pared celular están en constante cambio (MacDougall *et al*, 1996), por lo que se considera un sistema dinámico (Carpita and Gibeaut, 1993) resultado del crecimiento, desarrollo y la variedad de los tejidos vegetales (McDougall *et al*, 1996).

En el nivel más sencillo la pared celular primaria tiene cuatro componentes principales. Estos son celulosa, polisacáridos no celulósicos (matriz amorfa: dividida en pectina y hemicelulosas), proteínas (como la extensina) y polifenoles. Ciertas generalizaciones pueden ser hechas en el tipo de polímeros encontrados en cereales comparando con vegetales, las cuales podemos observar en la tabla 1 (Carpita and Gibeaut, 1993; McDougall *et al*, 1996).

Tabla 1. Comparación de la composición de la pared celular primaria de cereales y vegetales

Polímero	% de composición (p/p peso seco)	
	Cereal	Vegetal
Celulosa	30	30
Pectina	5	35
Arabinoxilanos	30	5
Mezcla unida a glucanos	30	ND
Xiloglucanos	4	25
Extensina	0.5	5

ND: No Determinado

Fuente McDougall *et al*, 1996

Carpita and Gibeaut (1993) proponen un modelo de pared celular para dicotiledones que está basado en los principales componentes (celulosa, xiloglucanos, ramnogalacturonanos, arabinogalactanos y extensina) y las interacciones predominantes en el medio dinámico (enlaces covalentes, puentes de hidrógeno e interacciones iónicas (Figura 3). Este modelo de la pared celular primaria de dicotiledóneas propone dos envolturas pero de distintas redes de polímeros: una red de celulosa-xiloglucanos interaccionando por puentes de hidrógeno y una red de polisacáridos pecticos sostenidos por enlaces de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), (Thompson and Fry, 2000).

Los xiloglucanos son una hemicelulosa neutra y su estructura esta basada en un esqueleto de  $\beta$ -(1-4)-D-glucano cualitativamente idéntico a la celulosa, pero están ramificados cerca del 75% de los residuos de glucosa que acarrean  $\alpha$ -(1-6) D-xilosa, de los cuales aproximadamente el 35% están sustituidos con residuos de galactosa (Thompson and Fry, 2000). Los xiloglucanos a veces constituyen cerca del 20 al 25% del peso seco de la pared celular primaria en dicotiledóneas y ha sido el componente principal de la arquitectura del modelo de la pared celular primaria (Carpita and Gibeaut, 1993).

La lámina media forma una capa amorfa intercelular entre las paredes primarias de células adyacentes; es la estructura que mantiene juntas y rígidas a las células individuales, está compuesta en su mayor parte de pectina y sus funciones son: determinar la porosidad de la pared celular, proveer de una superficie de carga que modula el pH y el balance iónico, y servir como receptor de moléculas que emiten señales para desarrollar respuesta a organismos simbióticos, patógenos e insectos (Carpita and Gibeaut, 1993; McDougall *et al*, 1996). Entre los componentes de la pared celular, la pectina se encuentra en la lámina media de las células vegetales y está involucrada en interacciones intercelulares. La pectina es conocida por estar relacionada en el proceso de ablandamiento y deformación del tejido que envuelve el rompimiento de la pared celular, tal como la pérdida de la pared celular, autólisis de la pared celular y la deformación y maduración de la pared celular (Thompson and Fry, 2000).

La celulosa de la pared celular le confiere rigidez y resistencia ante la ruptura, mientras que las sustancias pecticas y las hemicelulosas le proporcionan plasticidad (Carpita and Gibeaut, 1993).

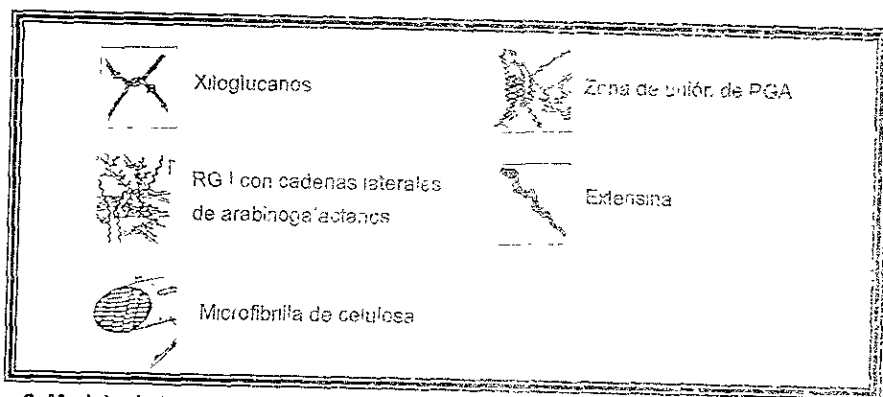
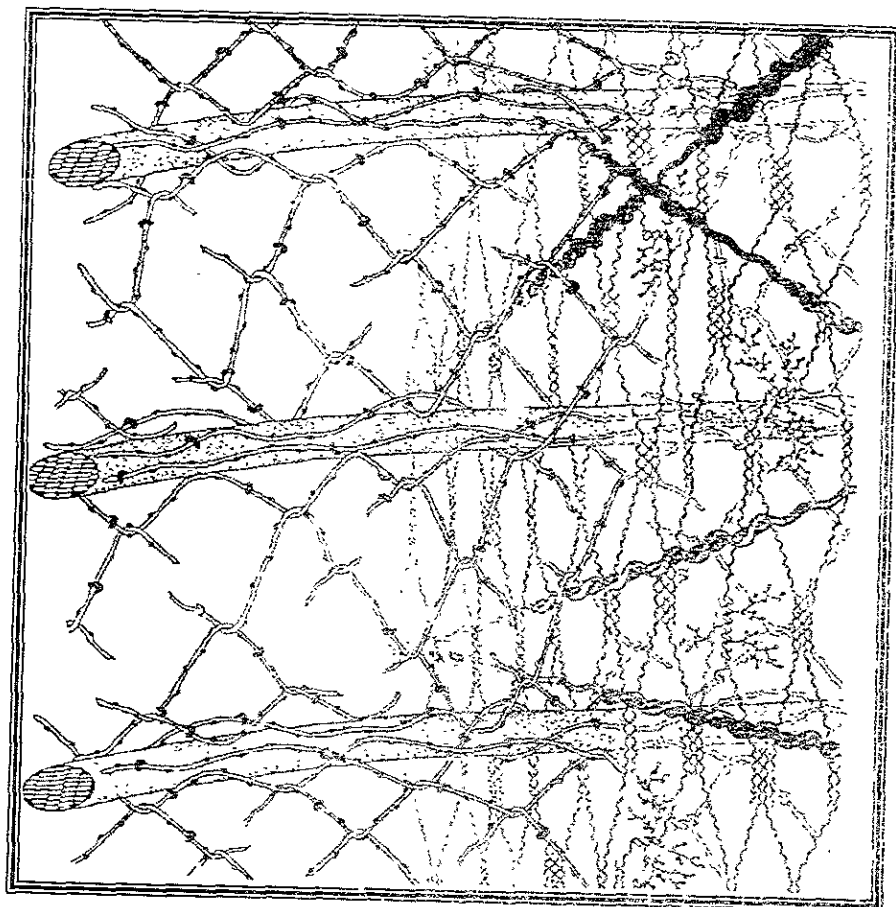
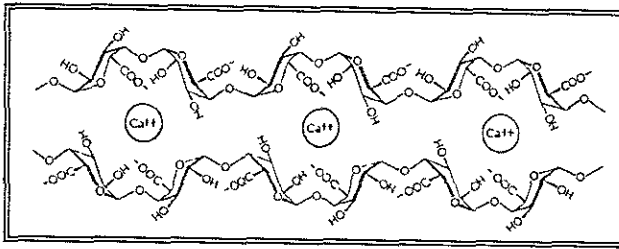


Figura 3. Modelo de la Pared Celular Primaria. Tipo I. Para Dicotiledóneas. propuesto por Carpita and Gipeaut (1993). RG I: Ramnogalacturonano I, PGA: Poligalacturónanos

Por su parte, la lámina media siendo la porción exterior de las células tiene un papel primario en la adhesión intercelular y las pectinas al constituir gran parte de la pared celular y de la lámina media contribuyen a la fuerza mecánica de la pared y a la adhesión entre las células (Carpita and Gibeaut, 1993). La capacidad de pegado de las sustancias pecticas depende principalmente de las regiones de ácido poligalacturónico, las cuales forman estructuras de caja de huevo con iones calcio (Figura 4). Las regiones de azúcares neutros han pasado a ser de menor importancia (Thompson and Fry, 2000).

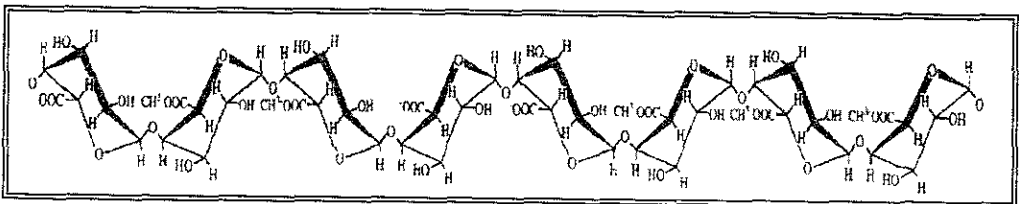


**Figura 4. Estructura conocida como caja de huevo.**

Se ha considerado que la adhesión intercelular es controlada por las sustancias pecticas de la lámina media, por lo que al estudiar las causas que determinan la textura de algún alimento durante su procesamiento es importante analizar la cantidad y tipo de pectinas que forman la lámina media (Mendoza, 1992, Ng *et al*, 1997).

### 1.1.5 La lámina media: Matriz de pectinas

La lámina media de las células vegetales esta compuesta en su mayoría por pectinas: son unas sustancias viscosas y coloidales, con base en la composición de su cadena principal se han clasificado en seis tipos de estructuras.



**Figura 5. Cadena de ácidos galacturónicos**

La cadena principal de las pectinas puede ser un polímero de ácido galacturónico (como el que se muestra en la figura 5), por lo que también se les conoce como ácidos poliurónicos y por la abundancia relativa de los residuos de ramnosa, arabinosa y galactosa en algunas regiones de esta cadena se identifican tres estructuras químicas denominadas: ramnogalacturonanos tipo I, su cadena principal es de  $\alpha$ -1,4 D-ácido galacturónico con uniones  $\alpha$ -1,2 L-ramnosa, el grado de polimerización es cercano a 2000 residuos, es el polisacárido mas abundante en la lámina media y pared primaria de dicotiledóneas ramnogalacturonanos tipo II, su estructura es compleja, es de alto grado de polimerización, es el componente menor de la pared primaria de dicotiledóneas y homogalacturonanos, su cadena principal es de  $\alpha$ -1,4 D-ácido galacturónico que puede tener un bajo grado de metil-esterificación llamado “ácidos pécticos” y las parcialmente metiladas se conocen como “ácidos pectínicos”, son abundantes en la pared primaria de frutas (Carpita y Gibeaut, 1993; García y Peña-Valdivia, 1995; McDougall, 1996).

También pueden estar presentes otras tres estructuras: arabinanas, galactanas y arabinogalactanas, caracterizadas por la abundancia de algún tipo de monosacárido. Además de que los últimos tres polímeros son menos abundantes en la pared celular, pueden estar ramificados y son neutros en contraste con los constituidos por D-ácido galacturónico. (Carpita y Gibeaut, 1993; García y Peña-Valdivia, 1995; McDougall, 1996).

Las arabinanas son polímeros ramificados su cadena lineal está constituida por residuos de L-arabinosa con uniones  $\alpha$ -1,5 y cadenas laterales constituidas por un solo residuo de L-arabinosa en posición  $\alpha$ -1,3. Por otro lado, las galactanas (u homogalactanas) son largas cadenas no ramificadas, de residuos de galactosa con uniones  $\beta$ -1,4 y en algunas paredes celulares, como las de *Acer pseudoplatanus*, las arabinanas y galactanas están tan cercanamente asociadas que han sido descritas como arabinogalactanas. Se han aislado dos tipos de arabinogalactanas de la pared primaria, las de tipo I están compuestas de  $\beta$ -1,4 D-galactosil sustituidas en el carbono número 3 con residuos de D-arabinosil y D-galactosil . Las de tipo II están muy ramificadas y contienen residuos  $\beta$ -3,6 de D-galactosil, D-arabinosil, y D-glucosilurónico (Carpita y Gibeaut, 1993; García y Peña-Valdivia, 1995; McDougall, 1996).



Cuando los ramnoglacturonanos I se encuentran sustituidos con arabinanas, galactanas y arabinogalactanas no pueden interactuar con iones calcio (Mc Dougall *et al*, 1996).

### 1.1.5 1 Propiedades de las pectinas

Las pectinas contribuyen a la adhesión entre las células del parénquima de los vegetales y confieren fuerza mecánica a los tejidos de tal forma que el ablandamiento de los vegetales durante la cocción se afecta considerablemente por las propiedades de las pectinas (Bernal *et al*, 1997, McDougall *et al*, 1993, Mendoza, 1992, Moskowitz, 1987).

Lo que confiere a las distintas pectinas sus propiedades es su composición, su grado de metilación, su peso molecular, y el número de entrecruzamientos con otros polímeros, así como la proporción de cada uno de los diferentes tipos de pectinas y otros polisacáridos que forman parte de la lámina media (Carpita and Gibeau, 1993). El peso molecular, tipo de pectina, grado de esterificación y largo de la cadena de la pectina determina el grosor y la consistencia de los productos alimenticios (Moskowitz, 1987, Sharma *et al*, 1998).

Las pectinas son polisacáridos con algunos grupos carboxilo en forma de metil ester. Las pectinas están subdivididas de acuerdo a su grado de esterificación (GE) el cual afecta sus propiedades funcionales. Las pectinas de alto metoxilo tienen un GE > 50%, mientras que las pectinas de bajo metoxilo tienen GE < 50%. Las pectinas tienen una distribución localizada de azúcares neutros covalentemente unidos formando regiones ramificadas y uniformes (Sharma *et al*, 1998, Thompson and Fry, 2000).

Una de las propiedades más notables de los compuestos pécticos es su capacidad para formar geles a bajas concentraciones por lo cual son utilizadas comercialmente como agentes gelificantes. (Díaz de León, 1989, Mendoza, 1992). Así la pectina de alto metoxilo forma geles a bajo pH (3.0) y a una baja actividad acuosa generalmente obtenida con una alta concentración de sacarosa (>60%), la estructura está estabilizada por puentes de hidrógeno y interacciones hidrofóbicas (Sharma *et al*, 1998). Mientras que la pectina de bajo metoxilo requiere un catión multivalente para formar la red del gel (Sharma *et al*, 1998).

Entre los polisacáridos que constituyen a la pared celular, las pectinas son las más susceptibles a la degradación inducida por el calor, por lo que se ha propuesto que la termosensibilidad que presentan las pectinas esta relacionada con la solubilización de la lámina media (Bernal *et al.*, 1997). Una correlación entre la composición de pectina en la pared celular y al ablandamiento de vegetales cocidos fue reportada por Fuchigami *et al.* (1995). También se encontró que los vegetales fácilmente ablandados por la maceración térmica contenían una mayor cantidad de pectina de alto metoxilo que de bajo metóxilo (Fuchigami *et al.*, 1995).

## II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### Objetivo General

- Conocer las modificaciones que ocurren en la pectina durante el remojo de semillas de frijol fresco

### Objetivos Específicos

- a) Determinar el tiempo de cocción de tres variedades de frijol fresco, utilizando semillas de frijol con y sin remojo.
- b) Conocer el contenido y composición de la pectina de tres variedades de frijol fresco con y sin remojo e identificar las diferencias que estos puedan tener.
- c) Identificar si durante el remojo las cadenas de pectina, cambian su fuerza de unión a una columna de intercambio iónico
- d) Identificar si durante el remojo, el peso molecular de las cadenas de pectina de frijol fresco se modifican.

### Hipótesis

Si una variedad de frijol fresco tiene diferente tiempo de cocción después del remojo, entonces la pectina sufre modificaciones de algún tipo, que favorecen la solubilización de la lámina media durante la cocción.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Selección del material biológico.

Para llevar a cabo el presente estudio se emplearon tres variedades de frijol *Phaseolus vulgaris*. los cuales eran: Flor de Mayo (FM) cosecha 1999, Bayo Mecentral (BM) cosecha 1996, y 2626 cosecha 1996, donados por Carmen Jacinto de CEVAMEX e INIFAP, este último era una línea genética desarrollada en el INIFAP. Los cultivares se seleccionaron basándose en sus diferentes tiempos de cocción.

Los cultivares recién cosechados se mantuvieron en frascos herméticamente cerrados, con un muñón que contenía sílica gel para su conservación y se almacenaron a 5 °C hasta el momento de su análisis.

#### 3.1.1 Determinación de tiempo de cocción

Se utilizó una adaptación del aparato que se conoce como “cocinador Mattson” (Varriano–Marston and Jackson, 1981), el cual consiste de un soporte con 25 pocillos donde se colocaron 25 frijoles y luego una varilla se colocó encima de cada frijol mas una masa de 200g y se introdujo en una olla de peltre con agua hirviendo, se tapó la olla con un capuchón de plástico y se mantuvo en ebullición durante 300 minutos, anotando el tiempo en el que cada varilla perforó una a una las semillas de

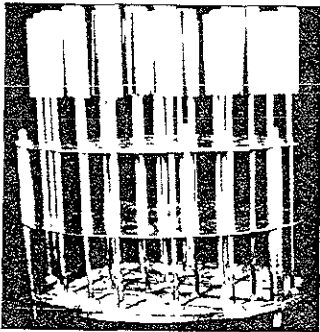


Figura 6. “Cocinador Mattson”

frijol, hasta que transcurrieron los minutos mencionados o antes si todas la semillas son perforadas. El tiempo de cocción ( $TC_{50}$ ) se determinó cuando el 50% del lote se coció. Las pruebas de cocción se realizaron por triplicado.

### 3.2 Extracción de pectina con *Ciclohexano-trans-1,2-Diamino-N,N,N',N'-tetracetato ácido (CDTA)*

Se colocaron 2.5 gramos de cotiledón descascarillado en un mortero y se le adicionaron 15 ml de nitrógeno líquido, una vez que el tejido se congeló, se pulverizó con el pistilo hasta obtener una harina fina. Se adicionaron 4 volúmenes de metanol (J. T. Baker) al 80%. La suspensión se transfirió a un matraz con tapón, donde se hirvió durante una hora con agitación magnética. Se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos y se eliminó el metanol por decantación.

La pastilla se colocó en un matraz con tapón de rosca, se le adicionaron 10 ml de CDTA (Sigma-Chemical) 50 mM, pH 8 y se dejó en agitación por dos horas, luego se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, luego se midió el volumen del sobrenadante y se guardó. La pastilla se sometió a una extracción similar pero dejando toda la noche y dos extracciones mas por dos horas cada una.

Se juntaron todas las fracciones, se centrifugaron a 55,000 rpm por 30 minutos a una temperatura de 4<sup>0</sup>C, entonces se eliminó la pastilla y el sobrenadante se ajustó a pH 6.5 (J.T. Baker) 0.5%. La pectina se precipitó con etanol industrial al 85%. Se dejó en reposo una hora en agua con hielo y se centrifugo a 12,000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.

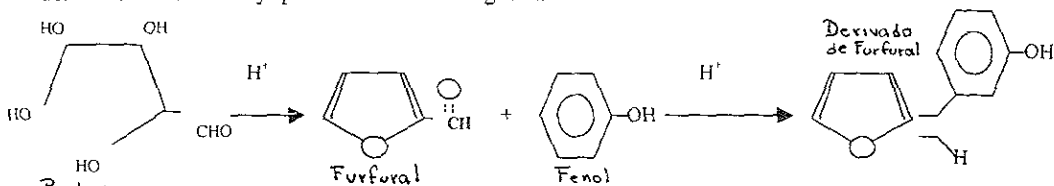
El precipitado se resuspendió en 10 ml de agua desionizada, se dializó contra agua desionizada monitoreándose la conductividad del agua de diálisis. La muestra dializada se precipitó con 4 volúmenes de etanol industrial al 85%.

La pastilla se colocó en cajas de aluminio de 5 cm de diámetro de peso conocido y se introdujeron en un desecador al vacío. La pectina se mantuvo en estas condiciones hasta que alcanzó un peso constante.

### 3.3 Determinación de Azúcares Totales

Se empleó el método de Fenol-Sulfúrico (Dubois *et al* 1956) que se fundamenta en la reacción específica de carbohidratos con un grupo reductor o un grupo potencialmente reductor mas fenol, en un medio fuertemente ácido (ácido sulfúrico) para formar un compuesto colorido (amarillo-naranja)

derivado del furfural y que consistió de lo siguiente:

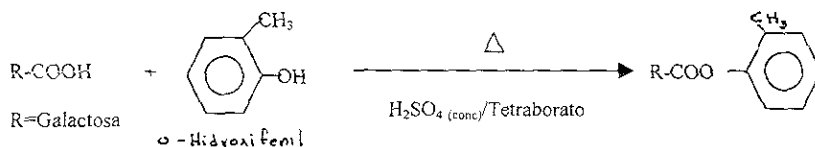


Se tomó un volumen no mayor de 500  $\mu$ l de muestra (3 repeticiones por muestra), se adicionó agua desionizada cbp 500  $\mu$ l, luego se agregaron 300  $\mu$ l de fenol acuoso (Técnica Química) al 5% (p/v), entonces se agregó 1.8 ml de ácido sulfúrico concentrado (Mallinckrod), se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Se leyó a una longitud de onda de 485 nm, en un espectrofotómetro Sequoia-Turner Modelo 540.

El contenido de azúcares totales de la muestra, se obtuvo con la ecuación de la recta de una curva estándar, a partir de una solución de glucosa (Sigma-Chemical) de 200  $\mu$ g/ml, entonces se consideró la dilución de la muestra y se obtuvo el valor de azúcares totales

### 3.4 Determinación de Ácidos Urónicos

Se empleó el método colorimétrico (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973), que se fundamenta en la reacción de carbohidratos con un grupo carboxilo (ácidos urónicos por ejemplo), mas o-hidroxifenil en un medio oxidante agresivo (ácido sulfúrico calentado) con tetraborato para formar un compuesto colorido cíclico y que consiste en lo siguiente:



Se tomó un volumen no mayor de 400  $\mu$ l de muestra (3 repeticiones por cada una). se adicionó agua desionizada cbp 400  $\mu$ l, se agregó 2.4 ml de una solución de tetraborato de sodio (Carlo-Erba) 0.0125 M en ácido sulfúrico concentrado, luego se hirvió 5 minutos, se enfrió en agua con hielo durante 1 minuto y se agregó al blanco 40  $\mu$ l de NaOH al 5% (p/v) y a la muestra 40  $\mu$ l de o-hidróxidifenil al 0.15% (p/v), entonces se reposó 30 minutos a temperatura ambiente con agitaciones cada 10 minutos y se leyó a una longitud de onda de 520 nm, en un espectrofotómetro Sequoia-Turner Modelo 540.

El contenido de ácidos urónicos de la muestra se obtuvo con la ecuación de la recta de una curva patrón con una solución de ácido galacturónico (Sigma -Chemical) de 1 mg/ml, finalmente se consideró la dilución de la muestra.

### **3.5 Cromatografía de intercambio iónico**

Se pesaron 3 gramos de resina Di-Etil-Amino-Etil (DEAE) celulosa y se dejó en reposo en 4 volúmenes de agua desionizada durante 18 horas a una temperatura de 4 a 6 °C, después se eliminó el sobrenadante mediante succión al vacío.

Se agregó el mismo volumen de agua, se dejó reposar por 5 minutos y se eliminaron las partículas suspendidas con una trampa de vacío, la resina se activó con 15 volúmenes de ácido clorhídrico (Baker) 0.5 N por 30 minutos, con agitación esporádica, se lavó con agua desionizada, hasta que el agua de lavado tuvo un pH 4, la resina se resuspendió en 15 volúmenes de hidróxido de sodio (Baker) 0.5 N por 30 minutos, con agitación esporádica, se lavó con agua desionizada, hasta que el agua de lavado tuvo un pH neutro. Se agregaron 5 volúmenes de ácido clorhídrico 0.5 N y se dejó reposar 5 minutos, se trasladó a la columna de 1 x 20 cm (Biorad) y se equilibró con una solución amortiguadora de fosfatos (Merck) 10 mM, pH 6.5

Se determinó el volumen de elución ( $V_0$ ) colocando un mililitro de una solución estándar de glucosa (Sigma-Chemical) de 1 mg/ml y se eluyó con una solución amortiguadora de fosfatos (Baker) 10 mM, se recolectaron fracciones de aproximadamente de 2.5 ml (64 gotas) y se determinó la concentración de azúcares totales por el método Fenol / sulfúrico (Dubois *et al* , 1956).

La muestra se preparó disolviendo 1 mg de pectina por mililitro en una solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 6.5, se eluyó con un gradiente de concentración de cloruro de sodio "NaCl" (Baker) disuelto en una solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 6.5. las fracciones 1 a 10 se eluyeron con una solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, pH 6.5. las fracciones 11 a 20 se eluyeron con una solución de NaCl 0.25 M, las fracciones 21 a 30 se eluyeron con una solución de NaCl 0.50 M, las fracciones 31 a 40 se eluyeron con una solución de NaCl 0.75 M, las fracciones 41 a 50 se eluyeron con una solución de NaCl 1.0 M (El-Nawawi and Ismail, 1997).

Se cuantificaron los azúcares totales de cada una de las fracciones por el método de Fenol/Sulfúrico (Dubois *et al*, 1956) y los ácidos urónicos se cuantificaron por el método colorimétrico (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973).

### 3.6 Cromatografía de Filtración En Gel

Se colocó gel de Sephacryl S-400 (Pharmacia) en 1 litro de agua desionizada y se dejó reposar por 25 minutos, luego se eliminó el agua de lavado con una pipeta conectada a una trampa de vacío. Posteriormente se colocó gel en un matraz kitazato conectado al vacío y se eliminó el aire en una atmósfera de vacío durante una hora, luego se empacó en una columna (Biorad) de 1.5 x 50 cm, se equilibró el gel con una solución amortiguadora de acetato de amonio 200 mM, pH 5.

Se estimó el volumen de exclusión ( $V_0$ ) colocando un mililitro de una solución estándar de azul de dextrana (Pharmacia) y se eluyó con una solución amortiguadora de acetato de amonio 200 mM, pH 5. Se recolectaron fracciones de aproximadamente de 4.75 ml (120 gotas) y a cada fracción se le cuantificó el contenido de azúcares totales por el método Fenol/Sulfúrico (Dubois *et al*, 1956).

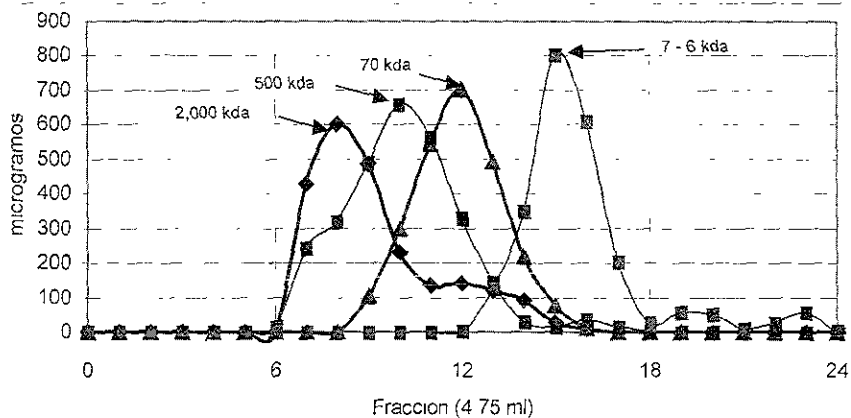


Figura 7. Curva patrón para la determinación de peso molecular de polisacáridos

Para la calibración de la columna se utilizaron dextransas de diferente peso molecular (Donación del Dr. Agustín López Munguía, Departamento de Biotecnología, UNAM). Se preparó una solución de cada una de las dextransas a una concentración de 1.5 mg/ml, se tomaron 3 ml de



cada muestra y se filtraron por separado en la columna (en la figura 5).

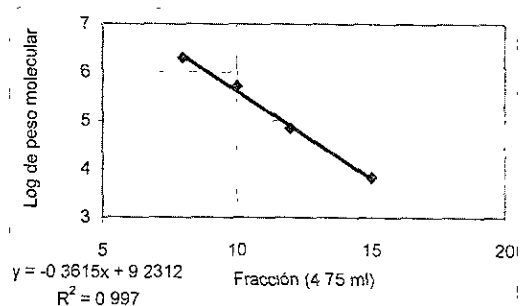


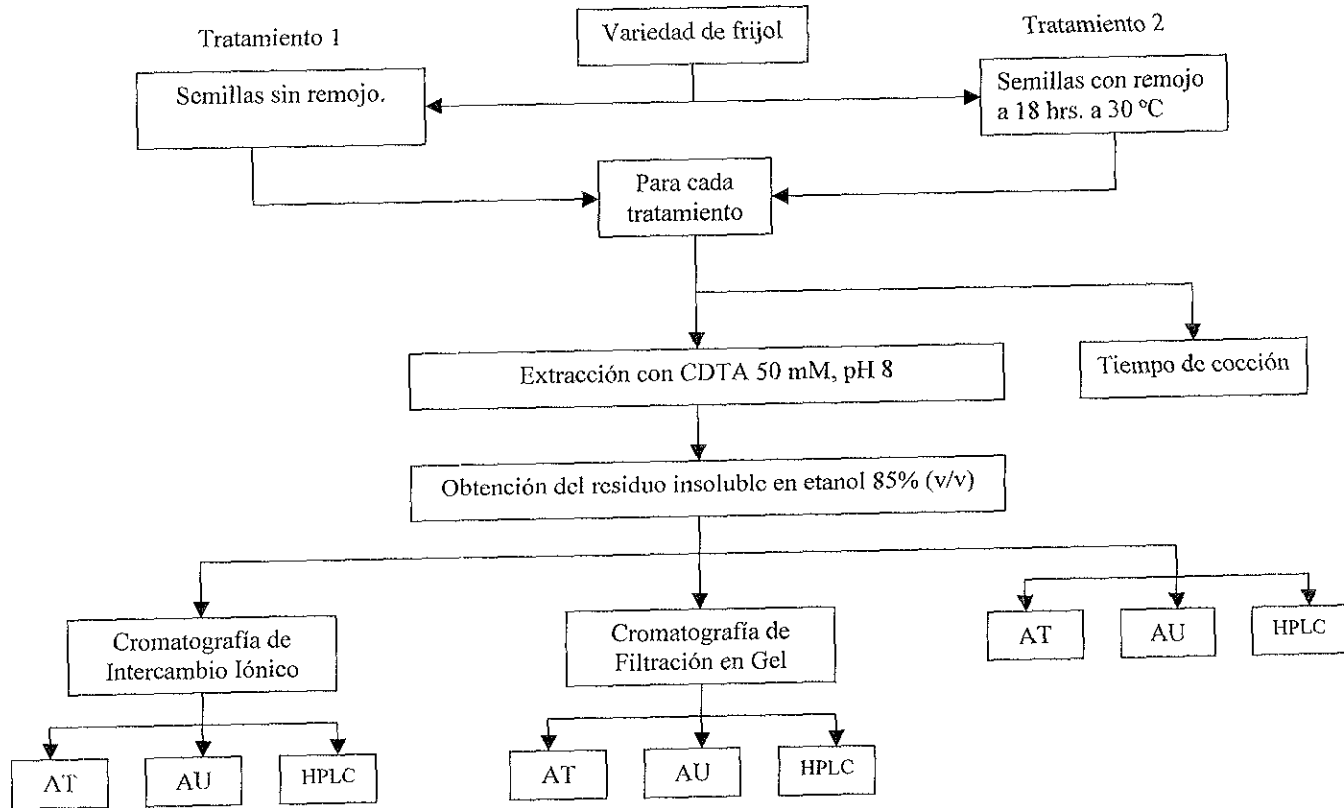
Figura 8. Relación lineal de la cromatografía de filtración en gel

Se encontró que la filtración de las dextranas de distinto peso molecular, tenían una relación lineal la cual se obtuvo al graficar la fracción mas significativa de elución y el logaritmo (base 10) del peso moléculas de cada dextrana (figura 6)

En cada fracción se cuantificaron los azúcares totales por el método de Dubois et al (1956) y los ácidos urónicos se cuantificaron por el método colorimétrico de Blumenkrantz y Asboe-Hansen (1973).

### 3.7 Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Se realizó en un cromatógrafo marca Waters modelo 60F, con un detector de índice de refracción marca waters modelo 410, con una columna de 4.6 mm x 25 cm, con una fase estacionaria de Supelcosil LC-NH2 (5 micrones) y una fase móvil isocrática de Acetonitrilo:Agua (85:15), a una temperatura de 35 a 40°C, a un flujo de 1.2 ml min.



**Figura 9.** Metodología empleada con las semillas de frijol con y sin remojo. AT = Azúcares Totales, AU = Ácidos Urónicos, HPLC = Cromatografía líquida de alta presión.

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Caracterización del material biológico

La cocción del frijol es un proceso que se realiza en dos etapas. En la primera el frijol se remoja durante 18 horas a temperatura ambiente y posteriormente se somete a un tratamiento de ebullición hasta que adquiere las características de palatabilidad que exige el consumidor (Liu, 1995, MacDougall *et al*, 1996). En la etapa de remojo la semilla de frijol debe sufrir cambios que facilitan el proceso de cocción ya que los frijoles remojados presentan tiempos de cocción menores que los frijoles no remojados (Tovar, 1997).

El tiempo de cocción del frijol depende en gran parte de la facilidad con la que se termosolubilizan las pectinas de la lamina media (Bernal *et al*, 1997, Ng *et al*, 1997, y Kon, 1968). Lo anterior sugiere que durante el remojo de la semilla de frijol, las pectinas se modifican de forma tal que facilitan su termosolubilización y/o no se modifican pero su termosolubilización se facilita como consecuencia de la hidratación.

Con la finalidad de contar con cultivares adecuados para estudiar los cambios que durante el remojo de la semilla de frijol sufre la pectina, se determinó el tiempo de cocción del frijol seco y remojado (Tabla 1). Como se aludió anteriormente, se encontró que las semillas sin remojo presentaron un mayor tiempo de cocción que las semillas con remojo, estas diferencias son estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla 1. Tiempos de cocción de tres cultivares de frijol común con y sin remojo**

Variedad	TC <sub>50</sub> (minutos)	
	sin remojo	con remojo
Flor de Mayo	126 <sup>a</sup>	38 <sup>b</sup>
Bayo Mecentral	97 <sup>a</sup>	42 <sup>b</sup>
2626	96 <sup>a</sup>	61 <sup>b</sup>

Cada determinación se realizó por triplicado

\*Diferente letra entre tratamiento indica diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

### 4.2 Efecto del remojo en las características de solubilidad de las pectinas

El aislamiento de pectinas se realizó con una solución acuosa de un agente quelante (CDTA), que fue liberando la pectina de los complejos que pudo estar formando con iones divalentes como

magnesio y calcio, en los complejos conocidos como caja de huevo (Liu, 1995, Redwell y Hansen, 2000) La cantidad de pectina extraída en CDTA se cuantificó como azúcares totales en la solución (Tabla 2).

**Tabla 2. Pectina extraída con CDTA de la semilla de frijol**

Variedad	% de pectina (p/p)	
	sin remojo	Con remojo
Flor de Mayo	5.5**	4.6**
Bayo Mecentral	4.8**	4.0**
2626	7.2*	6.3*

% de pectina (p/p): porcentaje de pectina seca en 100 g de cotiledón de frijol

\* La determinación se realizó una vez, \*\* La determinación se realizó por duplicado

La cantidad de pectina extraída de semilla seca o remojada fue del mismo orden de magnitud, aunque se observó una tendencia a extraer un poco menos de pectina de los frijoles remojados. Pero no se hicieron el número de repeticiones suficientes para saber si estas diferencias eran o no significativas. Curiosamente no todos los azúcares extraídos con CDTA fueron precipitables con etanol, que es la forma usual de recuperar las pectinas de la solución (Tabla 3).

**Tabla 3. Pectina precipitada con etanol**

Variedad	% de pectina (p/p)	
	sin remojo	con remojo
Flor de Mayo	5.9** (100) <sup>1</sup>	3.8** (82)
Bayo Mecentral	1.1** (23)	1.4** (35)
2626	4.9* (68)	2.1* (33)

\* La determinación se realizó una vez, \*\* La determinación se realizó por duplicado

<sup>1</sup>Los números representan el porcentaje de pectina precipitada con etanol respecto a la cuantificada en la solución con CDTA

Con excepción de Flor de Mayo, donde casi toda la pectina extraída es precipitada con etanol (comparar tabla 2 y tabla 3), el porcentaje de pectina precipitada fue cultivar y tratamiento de la semilla (remojo o no) dependiente. Para el caso de 2626 el remojo de la semilla disminuyó de manera importante la cantidad de pectina precipitada, no así en BM o FM. El hecho de que en 2626 el porcentaje de pectina precipitable por etanol disminuyera cuando la pectina se extrajo de la semilla remojada sugiere que durante el remojo se realizaron modificaciones en la pectina que disminuyeron su peso molecular, mientras que en FM y BM parecería que el remojo no modificó el

tamaño de la fibra pues el porcentaje de pectina precipitado por etanol fue similar independientemente de si las pectinas se extrajeron de semilla seca o remojada.

#### 4.3. Composición química de la pectina de frijol

La pectina soluble en la solución de CDTA fue caracterizada químicamente y no se encontró diferencia significativa en la composición de pectina de semillas secas y remojadas, como lo indica el hecho de que la abundancia de azúcares neutros (AN: La abundancia de azúcares neutros se obtuvo de la sustracción del contenido de ácidos urónicos a el contenido de azúcares totales) y ácidos urónicos (AU), fueron similares entre pectina extraída de semillas remojadas y la extraída de semillas secas (Tabla 4). Sin embargo la abundancia de AU definida como el cociente de AN/AU fue mayor para las pectinas extraídas de BM y menor para las extraídas de 2626. Las de FM presentaron una abundancia intermedia.

**Tabla 4. Composición química de pectina en la solución de CDTA**

Variedad	% de pectina (p/p) "azúcares"			
	Sin remojo		Con remojo	
	AN <sup>1</sup>	AU <sup>2</sup>	AN	AU
Flor de Mayo	4.2 <sup>a,3</sup>	1.3 <sup>b</sup>	3.5 <sup>a</sup>	1.2 <sup>b</sup>
Bayo Mecentral	1.9 <sup>a</sup>	2.9 <sup>b</sup>	1.8 <sup>a</sup>	2.2 <sup>b</sup>
2626	6.1 <sup>a</sup>	1.1 <sup>b</sup>	5.2 <sup>a</sup>	1.1 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>AN: Azúcares Neutros, <sup>2</sup>AU: Ácidos Urónicos

Las determinaciones se realizaron por duplicado en dos experimentos independientes

<sup>3</sup>Diferentes letras en los renglones de cada tratamiento indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

La composición química de la pectina precipitada por etanol se muestra en la Tabla 5 donde se observó que la abundancia de azúcares neutros y ácido urónico fue similar en las pectinas provenientes de ambos tratamientos

**Tabla 5. Composición química de la pectina insoluble en etanol al 85%**

Variedad	µg/mg ps			
	Sin remojo		Con remojo	
	AN	AU	AN	AU
Flor de Mayo	864 <sup>a,1</sup>	136 <sup>b</sup>	876 <sup>a</sup>	124 <sup>b</sup>
Bayo Mecentral	796 <sup>a</sup>	204 <sup>b</sup>	821 <sup>a</sup>	179 <sup>b</sup>
2626	795 <sup>a</sup>	205 <sup>b</sup>	762 <sup>a</sup>	238 <sup>b</sup>

ps: pectina seca, AN Azúcares Neutros y AU. Ácidos Urónicos.

Cada valor indica el promedio de tres repeticiones Ajustados a 1 mg

<sup>1</sup> Diferente letra entre tratamiento indica diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

Con la finalidad de definir si el etanol precipitaba alguna fracción particular de pectinas, lo que se hizo fue comparar la composición de las pectinas presentes en la solución de CDTA con la de las pectinas precipitadas con etanol (Tabla 6).

**Tabla 6. Comparación de la composición química de la pectina de frijol**

Variedad	Relación de azúcares neutros / ácidos urónicos (AN/AU)			
	Sin remojo		Con remojo	
	Soluble en CDTA	Precipitada c/EtOH 85%	Soluble en CDTA	Precipitada c/EtOH 85%
Flor de Mayo	3.23	6.35	2.90	7.06
Bayo	0.65	3.90	0.80	4.58
Mecentral				
2626	5.50	3.87	4.70	3.20

\* La media es resultado de tres repeticiones

Con excepción de 2626, la relación de azúcares neutros fue mayor en las pectinas precipitadas que en las solubles sugiriendo que las pectinas que no precipitaron eran ricas en ácido urónico. Esto podría ser el resultado de la acción de enzimas como la poligalacturonasa cuyos productos serían de menor peso molecular y no precipitables por etanol.

#### 4.4 Análisis de la composición de los azúcares neutros de la pectina.

Para conocer si había diferencias en la composición de azúcares neutros de las pectinas presentes en cada cultivar, lo que se hizo fue identificar y cuantificar por HPLC, los azúcares presentes en la pectina extraída y precipitada con etanol (Tabla 7). Los azúcares mayoritarios en la pectina extraída de semillas sin remojo fueron xilosa y arabinosa, mientras que en la pectina extraída de semillas remojadas fueron los monosacáridos anteriores, además de galactosa.

**Tabla 7. Composición química de la pectina de frijol común, precipitada con etanol**

monosacárido	μg/mg p.s.					
	Sin remojo			Con remojo		
	F. Mayo	B.Mecentral	2626	F. Mayo	B.Mecentral	2626
Ramnosa	139 <sup>a, 1</sup>	103 <sup>c</sup>	74 <sup>e</sup>	34 <sup>b</sup>	43 <sup>d</sup>	43 <sup>f</sup>
Xilosa	244 <sup>a</sup>	282 <sup>c</sup>	251 <sup>e</sup>	222 <sup>a</sup>	135 <sup>d</sup>	244 <sup>e</sup>
Arabinosa	409 <sup>a</sup>	372 <sup>c</sup>	422 <sup>e</sup>	374 <sup>a</sup>	354 <sup>c</sup>	310 <sup>f</sup>
Glucosa	ND	9 <sup>c</sup>	43	16	12 <sup>d</sup>	ND
Galactosa	73 <sup>a</sup>	29 <sup>c</sup>	5 <sup>e</sup>	230 <sup>b</sup>	277 <sup>d</sup>	165 <sup>f</sup>
Ac. Urónicos	136 <sup>a</sup>	204 <sup>c</sup>	205 <sup>e</sup>	124 <sup>a</sup>	179 <sup>c</sup>	238 <sup>e</sup>
AU/Ram	1 <sup>a</sup>	2 <sup>c</sup>	3 <sup>e</sup>	4 <sup>b</sup>	4 <sup>d</sup>	6 <sup>e</sup>
Xil/glu	ND	31 <sup>c</sup>	6	14	12 <sup>d</sup>	ND
ara/gal	6 <sup>a</sup>	13 <sup>c</sup>	79 <sup>e</sup>	2 <sup>b</sup>	1 <sup>d</sup>	2 <sup>e</sup>

\* La media es resultado de tres repeticiones, ajustados a 1 mg ND No Detectable

p s : pectina seca, ram: ramnosa, xil: xilosa, glu glucosa, gal galactosa, AU: ácidos urónicos

<sup>1</sup>Diferentes letras en los renglones de cada tratamiento indican diferencia significativa (p≤0.05)

La abundancia de arabinosa fue mayor que la de xilosa en los tres cultivares sin remojo, aunque los niveles para cada azúcar fue similar. El remojo de la semilla disminuyó la abundancia de arabinosa en 2626 y de xilosa en BM. Mientras que en los otros cultivares la abundancia de estos azúcares no se modificó. En todos los cultivares el remojo de la semilla aumentó notablemente la abundancia de galactosa. Este aumento no va acompañado de ácido urónico lo que sugiere, se trata de la solubilización de polímeros ricos en galactosa, otro monosacárido cuya abundancia se modifico por el remojo fué la ramnosa. Las pectinas extraídas de granos remojados presentaron menor abundancia de ramnosa que la extraída de granos no-remojados.

Uno de los polímeros que se encuentran de manera abundante en las pectinas de frijol son los ramnagalacturonanos cuya composición es de una ramnosa por un ácido galacturónico y poseen

grandes cadenas laterales de arabinosa. Si asumimos que toda la ramnosa y la arabinosa y parte de los AU están formando RGU. El contenido de RGU es menor en frijol remojado, que en frijol no remojado dado que el primero presentó menor contenido de ramnosa. Aparentemente, las pectinas del frijol están interaccionando fuertemente con hemicelulosas, especialmente xilanos, ya que la xilosa presente en las pectinas es un monosacárido característico de hemicelulosas de dicotiledóneas (Carpita and Gibeaut, 1993). Esta posible interacción no se modificó por el remojo, ya que las cantidades de xilosa presentes en pectinas aisladas de ambos tratamientos fueron similares.



#### *4.5 Cromatografía de intercambio iónico*

Para conocer si la hidratación de los polímeros de la pared celular durante el remojo, modifica la fuerza de interacción de las pectinas con calcio, lo que se hizo fue fraccionar las pectinas extraídas en una columna de intercambio iónico. En este sistema, la fuerza de unión representada por la concentración de NaCl con que se eluye, sería un reflejo de la longitud de la cadena de homogalacturonano presente. De tal forma que las pectinas que interaccionen con mayor fuerza con los grupos cargados de la resina contendrán regiones ácido urónico de una de mayor longitud, que aquellos que se unen menos, la pectina de alto y bajo metoxilo juega un papel importante como ramnogalacturonanos que están formados por un esqueleto de ácido galacturónico, que puede estar acetilado y con ramificaciones de ramnosa.

Los perfiles de tales experimentos se muestran en la Figura 8, se observa que en la semilla Flor de Mayo las pectinas se eluyeron con 1 N de NaCl mientras que para BM y 2626 la mayor parte de las pectinas, en ambos casos eluyó, con solo 0.25 N de NaCl. Lo anterior indica que las pectinas extraídas de FM contienen segmentos de homogalacturonanos de mayor longitud que las que presentan las cadenas extraídas de BM y 2626 (Figura 8).

El remojo de la semilla no modificó notablemente el perfil de azúcares neutros (Figura 8). Pero modificó notablemente la distribución de los AU (Figura 9). El porcentaje de AU fuertemente unido a la columna, representado por la fracción de AU eluido con 1 N de NaCl (Figura 9), disminuyó significativamente en todos los casos, mientras que la eluida con 0.5 N de NaCl se incremento.

Respecto de la otras fracciones pobremente unidas a la columna, representadas por la fracción eluida a 0.25 N de NaCl, estas aumentaron mientras que el BM presentó una disminución. Solo en BM la fracción eluida con 0.75 N de NaCl incrementó notablemente. En los otros cultivares la fracción de 0.75 N de NaCl disminuyó.

Las pectinas presentes en cada cultivar son diferentes no solo por la distribución de los AU en la fibra sino también por la composición de azúcares neutros. La diferencia mas significativa fue

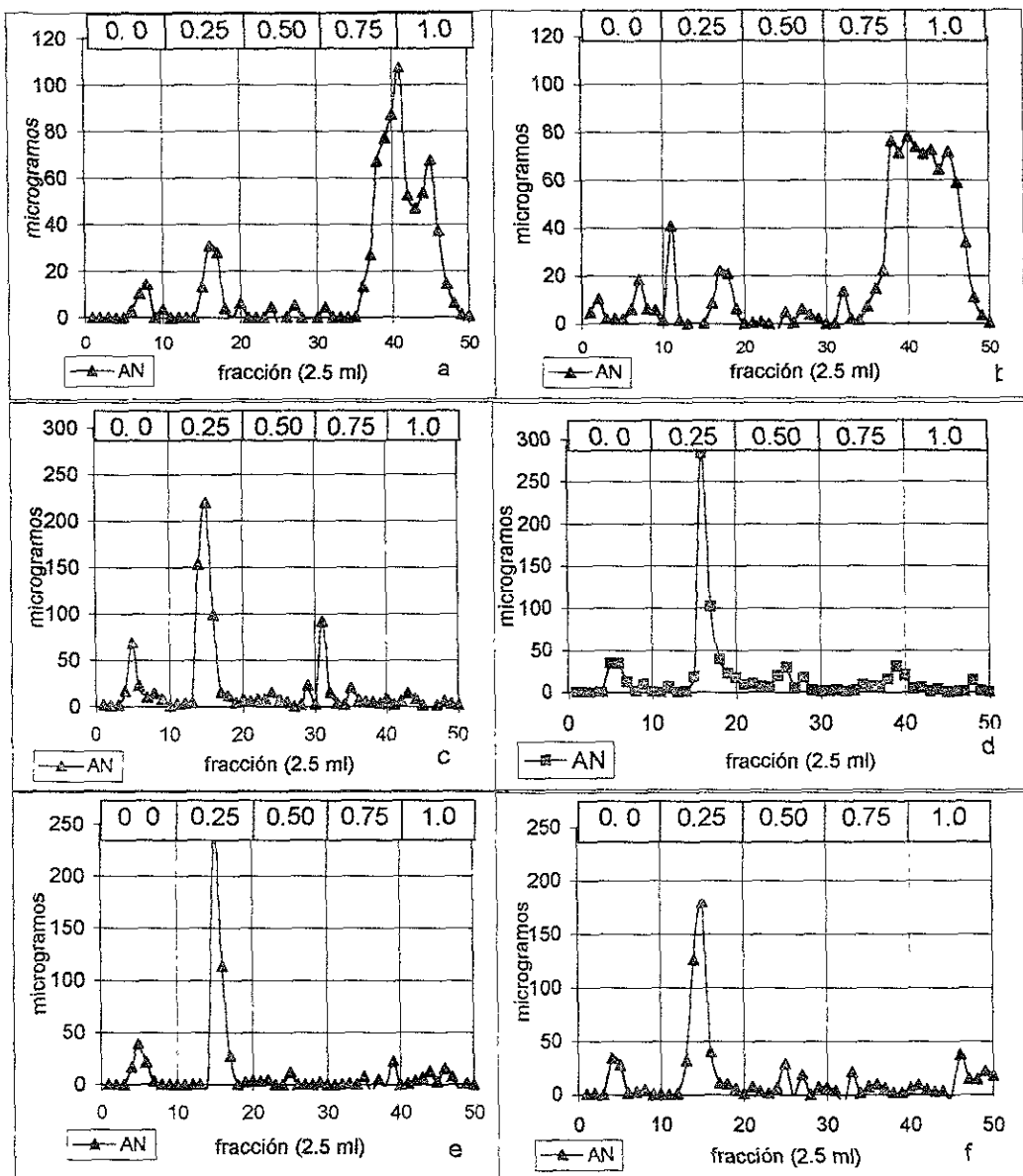


Figura 10. Cromatogramas de intercambio iónico de la pectina del cultivar a) Flor de Mayo sin remojo, b) Flor de Mayo con remojo, c) Bayo Mecentral sin remojo, d) Bayo Mecentral con remojo, e) 2626 sin remojo y f) 2626 con remojo. Eluidos con una solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 6.5, en una columna (biorad) de 1x25 cm, flujo 2 ml/min, AU= ácidos urónicos, AN= azúcares neutros

la ausencia de xilosa en la pectina extraída de la semilla de FM seca y la de la arabinosa de la extraída de 2626. El remojo modificó la composición de AN de la fibra de pectina, en general la abundancia de azúcares disminuyó o se mantuvo (Tabla 8).

**Tabla 8. Composición química del pico mas significativo de la elución de intercambio iónico.**

monosacárido	µg/mg ps					
	Sin remojo			Con remojo		
	Flor de Mayo	BM	2626	Flor de Mayo	BM	2626
Ramnosa	317 <sup>a,1</sup>	23	163 <sup>e</sup>	144 <sup>b</sup>	ND	217 <sup>f</sup>
Xilosa	ND	79 <sup>c</sup>	319	110	571 <sup>d</sup>	ND
Arabinosa	255 <sup>a</sup>	179 <sup>c</sup>	ND	201 <sup>b</sup>	ND	223
Glucosa	92 <sup>a</sup>	112 <sup>c</sup>	147 <sup>e</sup>	100 <sup>a</sup>	ND	241 <sup>f</sup>
Galactosa	149 <sup>a</sup>	263 <sup>c</sup>	109 <sup>e</sup>	186 <sup>a</sup>	181 <sup>d</sup>	96 <sup>e</sup>
Ac. Urónicos	188 <sup>a</sup>	344 <sup>c</sup>	262 <sup>e</sup>	259 <sup>b</sup>	248 <sup>d</sup>	224 <sup>e</sup>
AU/Ram	1 <sup>a</sup>	15	2 <sup>e</sup>	2 <sup>a</sup>	ND	1 <sup>e</sup>
xil/glu	ND	1	2	1	ND	ND
Ara/gal	2 <sup>a</sup>	1	ND	1 <sup>b</sup>	ND	2

\* La media es resultado de tres repeticiones, ajustados a 1 mg. ND, No Detectable  
 p.s : pectina seca, ram: ramnosa, xil: xilosa, glu: glucosa, gal: galactosa, AU: ácidos urónicos

<sup>1</sup>Diferentes letras en los renglones de cada tratamiento indican diferencia significativa (p≤0.05)

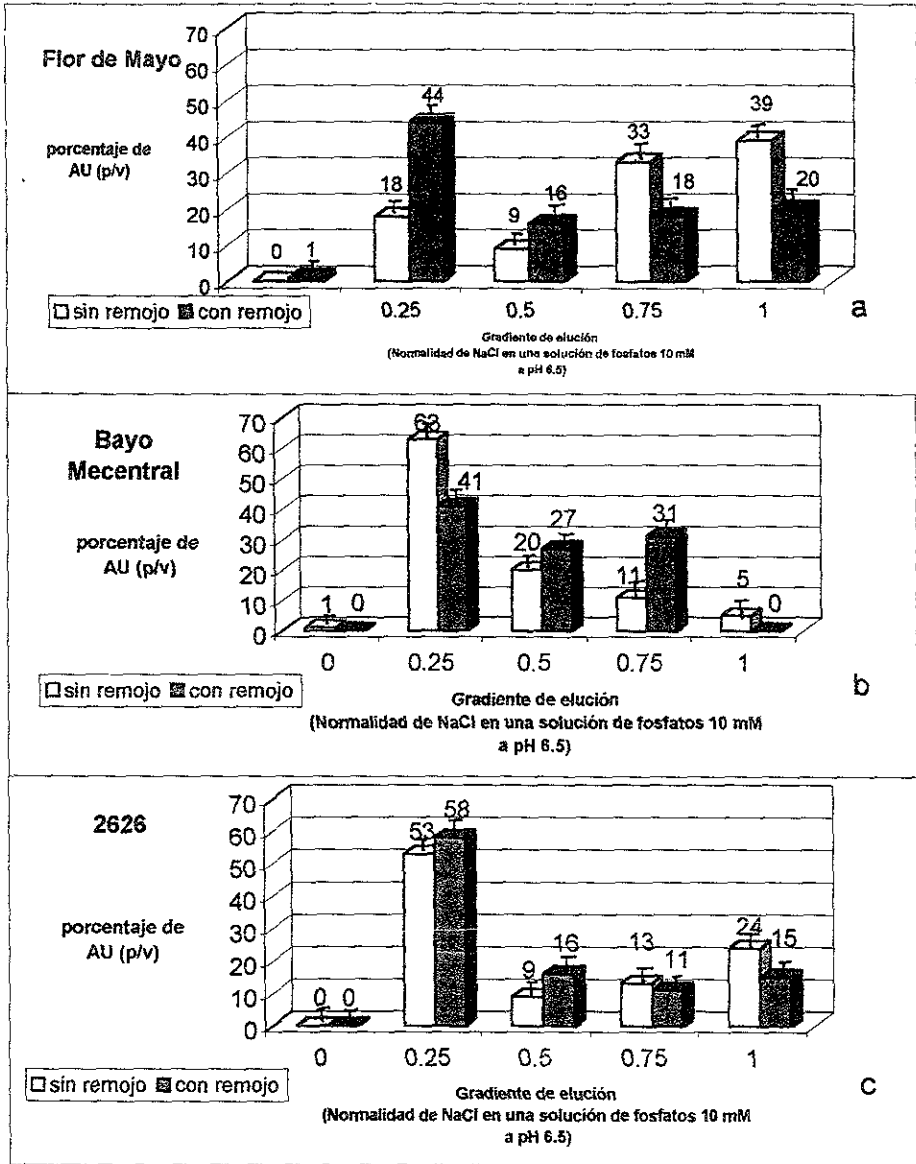


Figura 11. Porcentaje (p/v) de ácidos urónicos en cada fracción obtenida con la cromatografía de intercambio de la pectina de tres cultivares de frijol sin remojo y con remojo, siendo los siguientes: a) Flor de Mayo, b) Bayo Mecentral y c) 2626. En una columna de 1 x 20 cm (biorad) y una velocidad de flujo de 2 ml/min

#### **4.6 Cromatografía de Filtración en gel**

La filtración en gel se realizó para conocer el peso molecular aproximado de los polisacáridos de la pectina de las semillas secas y remojadas de los distintos cultivares de frijol con que se trabajó. En la figura 10 se reporta la distribución de los azúcares neutros de las péctinas en los diferentes pesos moleculares asignados por filtración en una columna de Sephacryl S400. En términos generales se observa que en la pectina extraída de semilla seca predominan las cadenas de alto peso molecular, en el caso de FM y BM, el remojo de la semilla resultó en una disminución de la abundancia de la pectina de alto peso molecular y un aumento de la abundancia de la pectina de menor peso molecular. En 2626 el remojo no modificó los pesos moleculares de las péctinas. Este comportamiento también se observó cuando la pectina se cuantificó como ácidos urónicos.

Los perfiles de elución de la pectina cuantificando AN o AU del cultivar FM seco y remojado, son diferentes, lo que indicó que los polisacáridos de la pectina de las semillas secas era en su mayoría de alto peso molecular (2,000 kda), los que después del remojo sufrieron una disminución del peso molecular (500 kda).

En el perfil de elución de las péctinas del cultivar BM los polisacáridos cuantificados como AN o AU mostraron que al igual que en FM el remojo disminuyó el peso molecular y para el cultivar 2626 se mantuvo el perfil de elución antes y después del remojo de las semillas, lo que indicó que no hubo cambios notables en el tamaño de los polisacáridos (Figura 10).

El perfil de los AU de la pectina del cultivar FM seco es igual prácticamente al del perfil de AN lo que indicó que colegien. Pero el perfil de los AU de las semillas remojadas es distinto, ya que disminuyó el peso molecular de las cadenas de AU ubicándose la mayoría con un peso molecular de 500 kda y 70 kda, lo que indicó una disminución del tamaño de 10 y 100 veces aproximadamente reuniendo el 63% de los AU eluidos (Figura 11).

El perfil de los AU de la pectina del cultivar BM también sufrió una disminución de peso molecular de los polisacáridos, después del remojo, pero al parecer en menor grado y para este cultivar el 31% de la elución de los AU se concentró en un peso molecular de 500 kda, lo que implicó también una ruptura de las cadenas de pectina.

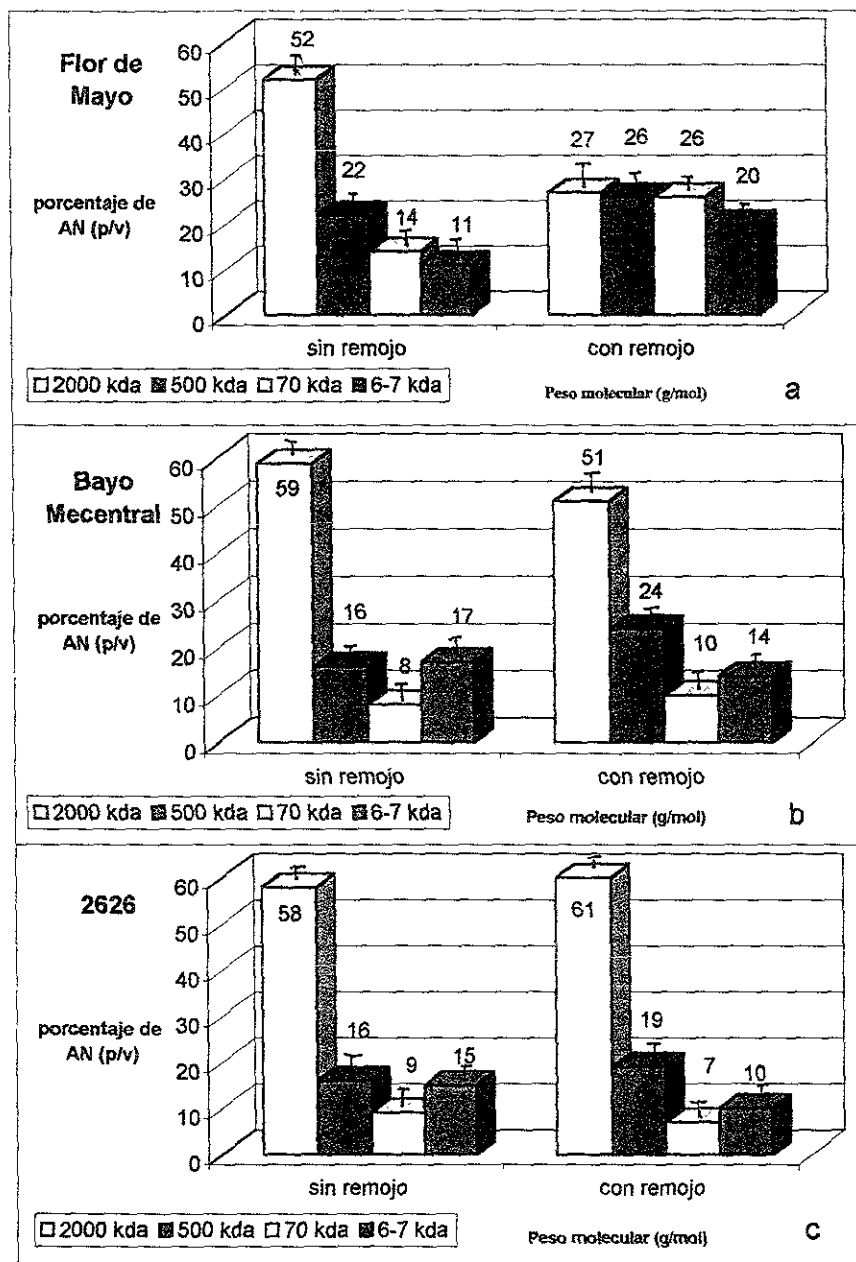


Figura 12. Porcentaje de elución de la filtración en gel de los azúcares neutros de tres cultivares distintos de frijol, en una columna de 1.5 x 50 cm, con una cama de 77 ml, velocidad de flujo de 15-20 ml/hora. Material Sephacryl S400 con marcadores moleculares de dextrana

El perfil de los AU de la pectina del cultivar 2626 sufrió el mismo efecto al parecer pero en mayor grado que para BM y casi en el mismo grado que para el cultivar FM, lo que al parecer es un fenómeno que ocurrió en todos los cultivares pero en distinto grado, esto podría involucrar la acción de alguna enzima que degrade los polisacáridos a unidades de menor tamaño.

Finalmente se realizó la identificación de los AN que componen la pectina que se analizó por filtración en gel (Tabla 9).

**Tabla 9. Composición química de la pectina de alto peso molecular de frijol purificada por filtración en gel.**

monosacárido	µg/mg ps					
	Sin remojo			Con remojo		
	Flor de Mayo	BM	2626	Flor de Mayo	BM	2626
Ramnosa	ND	ND	ND	ND	ND	40
Xilosa	453 <sup>a,1</sup>	383 <sup>c</sup>	410 <sup>d</sup>	647 <sup>b</sup>	223 <sup>d</sup>	151 <sup>e</sup>
Arabinosa	196	ND	215 <sup>d</sup>	ND	440	535 <sup>e</sup>
Glucosa	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Galactosa	118 <sup>a</sup>	335 <sup>c</sup>	86 <sup>d</sup>	81 <sup>b</sup>	53 <sup>d</sup>	33 <sup>e</sup>
Ac. Urónicos	233 <sup>a</sup>	282 <sup>c</sup>	289 <sup>d</sup>	273 <sup>a</sup>	284 <sup>c</sup>	240 <sup>d</sup>
AU/Ram	ND	ND	ND	ND	ND	6
xil/glu	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ara/gal	2	ND	2 <sup>d</sup>	ND	8	16 <sup>e</sup>

\* La media es resultado de tres repeticiones, ajustados a 1 mg ND. No Detectable  
 p.s.: pectina seca, ram: ramnosa, xil: xilosa, glu. glucosa, gal. galactosa, AU. ácidos urónicos  
<sup>1</sup>Diferentes letras en los renglones de cada tratamiento indican diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

Se encontró diferencia significativa en la abundancia de xilosa y galactosa para todos los cultivares, lo que confirmó la presencia de xiloglucananos y arabinoxilanos, pero lo que no se pudo detectar fue ramnosa, lo que sugiere que las cadenas de alto peso molecular son pobres en ramnosa.

La pectina analizada por filtración en gel del cultivar FM tuvo un aumento significativo en el contenido de xilosa lo que lo hace el azúcar más abundante en la cadena. La galactosa disminuyó su abundancia después del remojo.

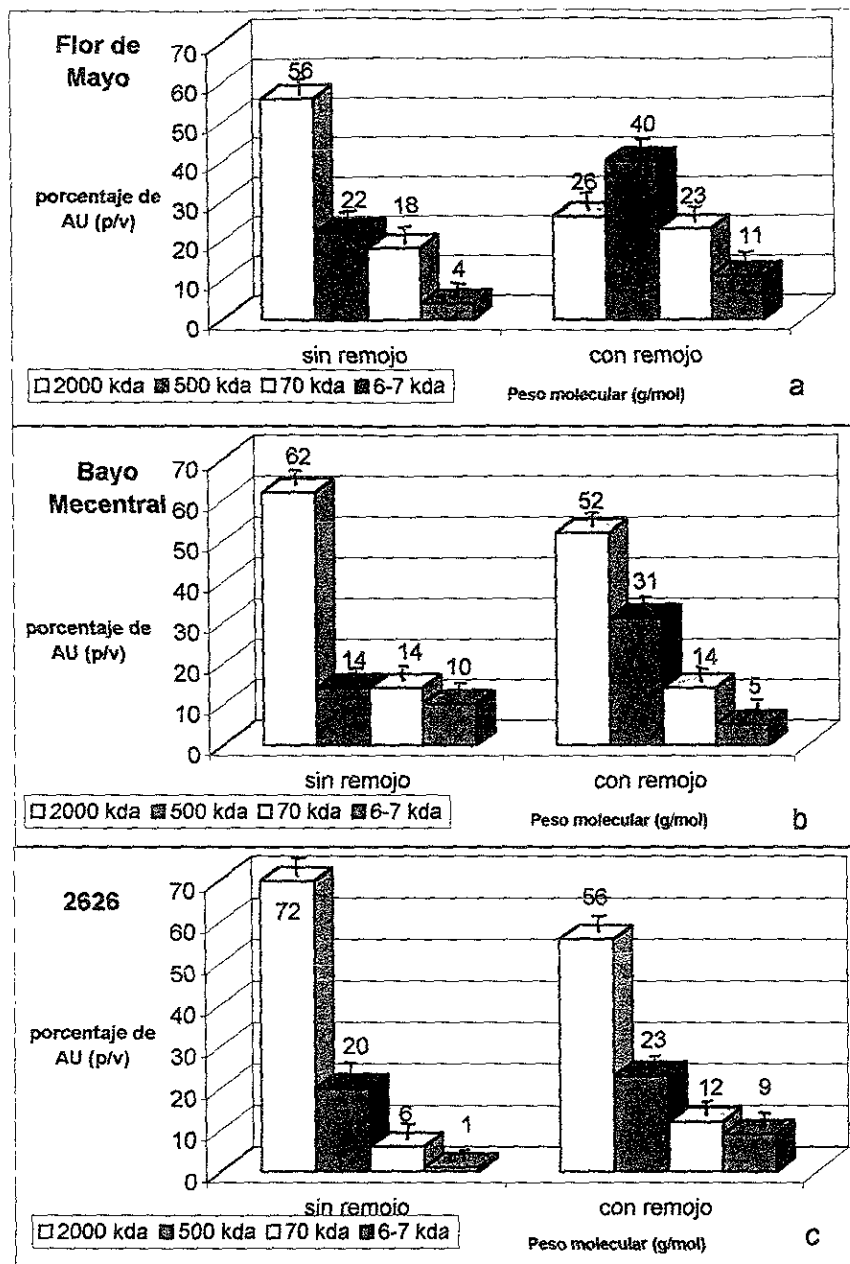


Figura 13. Porcentaje de elución de la filtración en gel de los ácidos urónicos de tres cultivares distintos de frijol, en una columna de 1.5 x 50 cm, con una cama de 77 ml, velocidad de flujo de 15-20 ml/hora. Material Sephacryl S400 con marcadores moleculares



Numerosos estudios determinaron que la estructura de regiones ramificadas altamente acetiladas de ramnogalacturanonas, acarrean cadenas laterales compuestas de arabinosa, galactosa y xilosa (Doco *et al*, 1997; Mukhiddinov *et al*, 2000), lo que refuerza este resultado.

En la composición de la pectina del cultivar BM analizada por filtración en gel se encontró que la abundancia de xilosa y galactosa disminuyó y aparentemente el de arabinosa aumentó lo que indica que la combinación de estos azúcares junto con los AU podrían ser los polímeros que proporcionan el peso molecular de la pectina.

Los resultados encontrados en la variedad de 2626 son diferentes a los de las otras dos variedades estas diferencias solo las podemos atribuir a factores inherentes a la semilla, los cuales son influenciados directamente por aspectos genéticos y/o ambientales.

## V. DISCUSIÓN

El remojo de la semilla resultó en una disminución en el tiempo de cocción respecto al que presentó la semilla sin remojo. La magnitud de este cambio fue dependiente de cada variedad, como lo muestra el hecho de que el porcentaje de disminución del tiempo de cocción fue mayor para FM (70%) que para BM (57%) y para este último mayor que para 2626 (37%).

Dado el resultado anterior, este trabajo se realizó con el propósito de determinar si la magnitud de la disminución del tiempo de cocción de semillas remojadas de diversas variedades, respecto al que presentan sus semillas sin remojo, se debían a que las diversas variedades poseían diferentes cantidades de pectina y/o a los cambios que sufre la pectina durante el remojo de la semilla de frijol (Sefa-Dedeh and Stanley, 1979, Liu, 1995, MacDougall *et al*, 1996, Stolle-Smith *et al*, 1999).

Para contestar a la primera cuestión lo que se hizo fue cuantificar el contenido de pectina extraída de cada cultivar y definir sus características químicas como la relación de azúcares neutros de las pectinas extraídas de semillas secas y remojadas, para la segunda posibilidad se determinaron las características iónicas y el peso molecular de las mismas.

El hecho de que cantidad de pectina extraída fuese similar entre cultivares (Tabla 2) y que la relación azúcares neutros a ácido urónico de semillas sin remojo o remojadas fuese también similar (Tabla 4) sugiere que ni el contenido ni el tipo de pectinas determinan el efecto del remojo en el tiempo de cocción.

Las modificaciones de las pectinas inducidas por el remojo fueron de dos tipos: a) **Disminución de la fuerza de interacción entre los polímeros que forman la lámina media** y b) **disminución en el peso molecular de las pectinas.**

La evidencia que apoya la primera aseveración es el hecho de que las pectinas extraídas de semillas remojadas, presentaron mayor abundancia de galactosa que la extraída de semillas secas (Tabla 7). Este resultado solo puede explicarse si la hidratación de los polisacáridos que forman la lámina media debilita la interacción intermolecular de las pectinas. La evidencia adicional fue el

hecho de que la fuerza de unión de las pectinas a la columna de intercambio iónico era menor en las pectinas extraídas de la semilla remojada que las extraídas de la semilla sin remojo (Figura 9).

Esta interpretación se basa en el hecho de que en la lámina media las pectinas están interaccionando con calcio a través del grupo carboxilo del ácido urónico (Thompson y Fry, 2000; Carpita y Gibeaut, 1993), entonces la disminución en la fuerza de interacción de la pectina a la columna se puede interpretar como que el remojo debilitó la unión electrostática calcio-ácido urónico. Esta relajación de la pared celular podría deberse a que durante el remojo los iones divalentes de la pared celular se intercambian por monovalentes del citoplasma (Van Buren, 1986; Liu, 1995), o bien a la acción de una endopoligalacturonasa (hidrolasa) presente en la pared celular de semillas sin remojo y activada por la hidratación de la pared celular, evento que se realizaría durante el remojo de la semilla (Kigel and Galili, 1995, Stolle-Smith *et al*, 1999).

**La segunda modificación inducida en las pectinas por el remojo de la semilla fue cambiar los pesos moleculares de las pectinas** (Figura 10 y 11). Esta afirmación se fundamenta en el hecho de que el porcentaje de pectina de peso molecular mayor o igual a 2000 kda disminuyó importantemente en FM y BM, los cultivares con mayor efecto en el tiempo de cocción por el remojo (Tabla 1), mientras que en 2626, cultivar con el menor efecto del remojo en el  $T_{c50}$ , no se modificó (Tabla 1). Esta disminución en el peso molecular de las pectinas inducida por el remojo de la semilla podría ser producto de la acción de hidrolasas de pared celular sobre las pectinas i.e.  $\beta$ -glicosidasas o endo o exo poligalacturonasas o la reacción química de la  $\beta$ -eliminación de las pectinas metiladas. La segunda posibilidad no parece ser el caso pues la reacción química de la  $\beta$ -despolimerización se realiza con la concurrencia de calor (Whistler y Bemiller, 1973; Fry, 1988).

La posibilidad de que la despolimerización de las pectinas pudiera deberse a la acción de las hidrolasas de pared celular durante la imbibición de las semillas parece más factible dado que la presencia y activación por hidratación de  $\beta$ -galactosidasa y poligalacturonasas, en semillas se ha demostrado (Fanutti *et al*, 1991, Stolle-Smith *et al*, 1999) . Por otro lado la composición de las pectinas (Tabla 6) también pudiera estar afectando la sensibilidad de la cadena a la acción de las enzimas. En semillas sin remojo el contenido de ramnosa correlaciona ( $r = 0.98$ ) de manera directa con la magnitud del cambio en el tiempo de cocción inducido por el remojo. En semillas remojadas

el contenido de ácido urónico de las pectinas extraídas de las semillas remojadas correlaciona ( $r = 0.99$ ) de manera indirecta con la magnitud del efecto del remojo de la semilla en el tiempo de cocción. Los resultados anteriores se pueden integrar en el modelo que ha continuación se presenta.

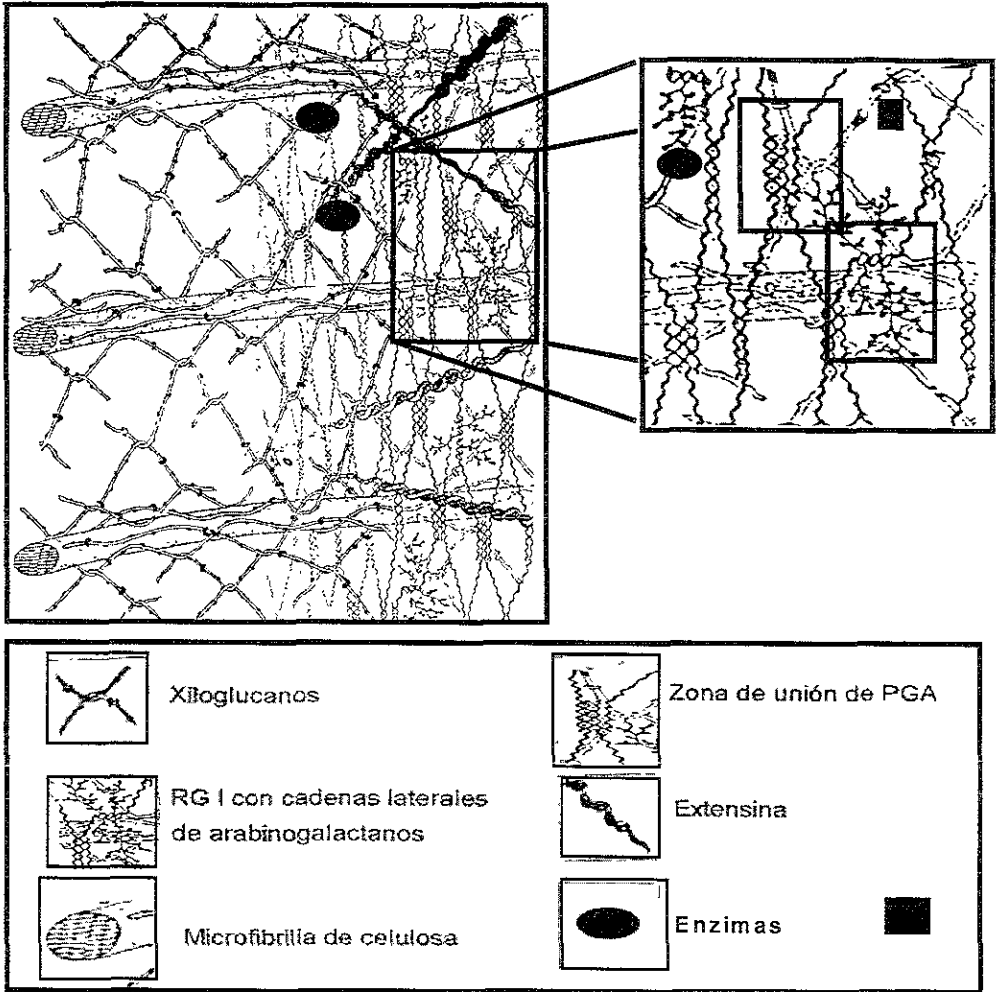


Figura 14. Modelo propuesto de Carpita and Gibeaut, en donde basamos las modificaciones que ocurren en la pectina durante el remojo de semillas de frijol *Phaseolus vulgaris*, RG I: Ramnogalacturonano, PGA: Poligalacturonano

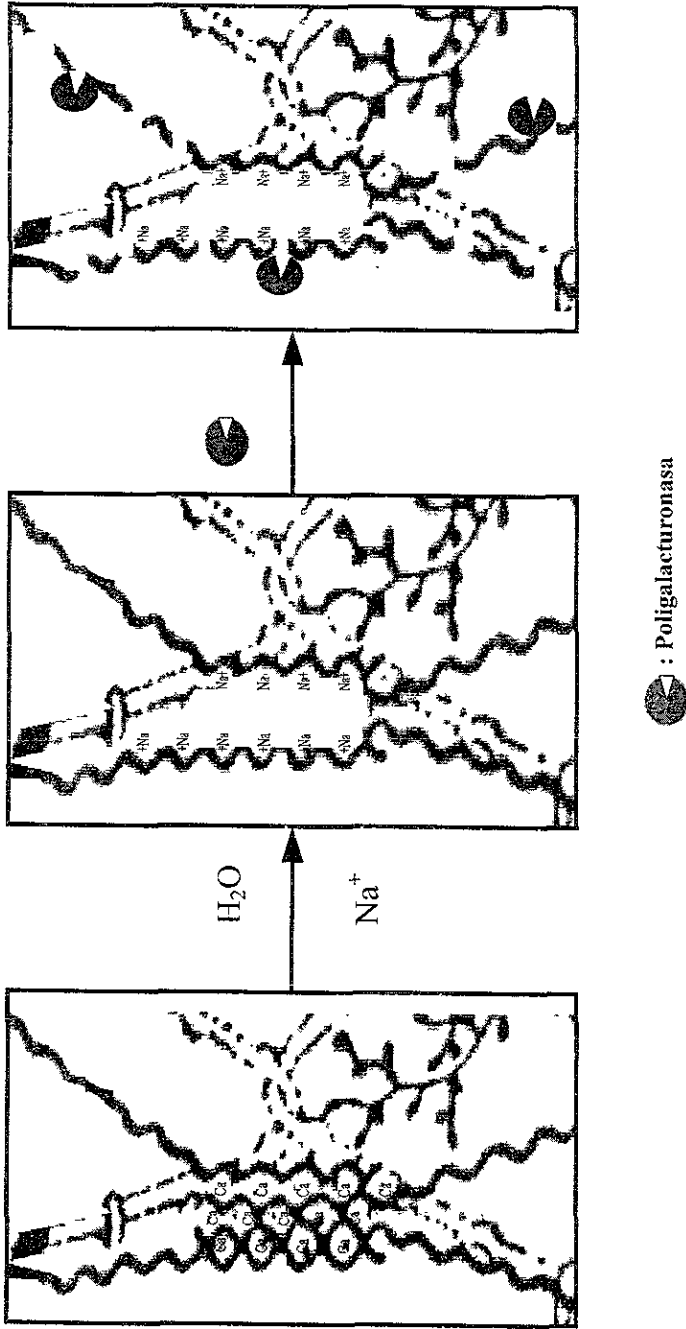


Figura 15. Modificación propuesta que ocurre en las zonas conocidas como cajas de huevo donde el intercambio de cationes divalentes se realiza por cationes monovalentes y posteriormente se sugiere que la acción de una (s) poligalacturonasa(s) (hidrolasa) que provoca la hidrólisis de la cadena de pectina(s).

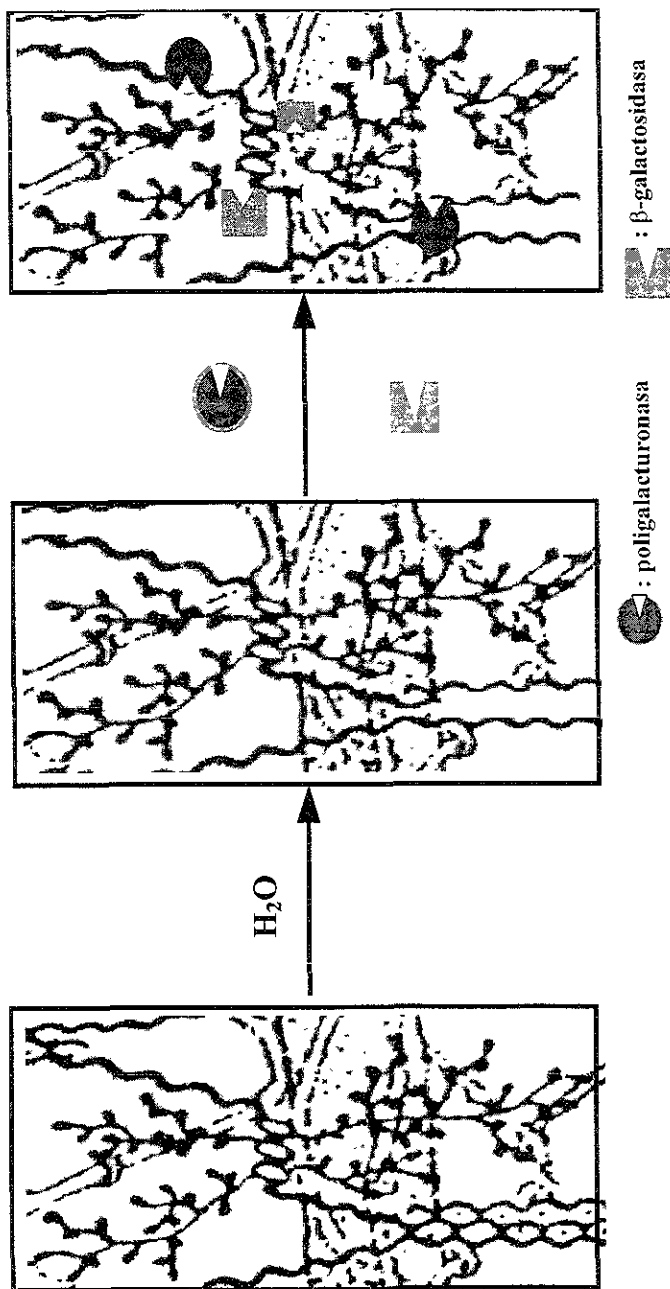


Figura 16. Modificación propuesta en Ramnogalacturonanos I, donde la modificación puede ser tanto por poligalacturonasas como por  $\beta$ -galactosidasas, produciéndose la hidrólisis de las cadenas de pectina, en consecuencia con un menor peso molecular, en resumen se sugiere que la activación de hidrolasas (enzimas) durante el remojo tiene lugar y la acción de estas influye de manera significativa en la suavización del cotiledón y la termo-solubilización de la lamina media durante la cocción.

## VI. CONCLUSIONES

- El remojo de la semilla no modificó la cantidad de pectina extraída con CDTA.
- La relación de azúcares neutros y ácidos urónicos en las cadenas de pectina no se modificó por efecto del remojo.
- La abundancia de galactosa aumentó después del remojo de la semilla.
- La abundancia de ramnosa disminuyó después del remojo de la semilla.
- El remojo disminuyó la fuerza de interacción entre los polímeros que formaban la lámina media.
- El remojo disminuyó el peso molecular de las pectinas.

## OBSERVACIONES Y PERSPECTIVAS

- Los resultados obtenidos sugieren que estos cambios que ocurren en la pectina de semillas frescas de frijol ablandan el tejido y facilitan su cocción por lo que es posible que en frijoles endurecidos no tengan lugar estos cambios, por lo cual se sugiere hacer en una investigación subsecuente, la comparación de los cambios en semillas frescas con semillas endurecidas de frijol.
- La identificación de los cambios que ocurren en la pectina sugieren la actividad enzimática de hidrolasas, lo que indica que sería conveniente la medición de la actividad enzimática en semillas frescas de frijol.
- De confirmarse la actividad enzimática durante el remojo de las semillas se sugiere hacer una identificación de las proteínas que tienen esta facultad para su posterior ubicación dentro de su genoma para identificar los mecanismos que regulan su transcripción, si esto fuera posible, entonces podría manipularse y crear semillas con la facultad de facilitar su cocción y de esta manera se pueda mantener su calidad culinaria y nutrimental aun después de largos periodos de almacenamiento en altas temperaturas ( $>40^{\circ}\text{C}$ ) y alta humedad ( $>85\%\text{HR}$ ).
- El impacto en la agricultura del país sería favoreciendo a los agricultores con semillas que conserven su calidad aun después de pésimas condiciones de almacenamiento y que al ser sembradas en la siguiente temporada de cultivo, se mantenga la alta calidad del frijol.
- El desarrollo de semillas de alta calidad culinaria y nutrimental de rápida cocción, impactaría en la industria del procesamiento de alimentos en el desarrollo tecnológico para la manipulación de las condiciones de cocción de los frijoles y así reducir el uso de energéticos y recursos económicos.
- En la SAGARPA se podría favorecer la certificación, la patente y su fe de origen de la semilla para lograr su alta cotización en el mercado y dar solución a los millones de trabajadores rurales que viven en extrema pobreza.



## VI. CONCLUSIONES

- El remojo de la semilla no modificó la cantidad de pectina extraída con CDTA.
- La relación de azúcares neutros y ácidos urónicos en las cadenas de pectina no se modificó por efecto del remojo.
- La abundancia de galactosa aumentó después del remojo de la semilla.
- La abundancia de ramnosa disminuyó después del remojo de la semilla.
- El remojo disminuyó la fuerza de interacción entre los polímeros que formaban la lámina media.
- El remojo disminuyó el peso molecular de las pectinas.

## OBSERVACIONES Y PERSPECTIVAS

- Los resultados obtenidos sugieren que estos cambios que ocurren en la pectina de semillas frescas de frijol ablandan el tejido y facilitan su cocción por lo que es posible que en frijoles endurecidos no tengan lugar estos cambios, por lo cual se sugiere hacer en una investigación subsecuente, la comparación de los cambios en semillas frescas con semillas endurecidas de frijol.
- La identificación de los cambios que ocurren en la pectina sugieren la actividad enzimática de hidrolasas, lo que indica que sería conveniente la medición de la actividad enzimática en semillas frescas de frijol.
- De confirmarse la actividad enzimática durante el remojo de las semillas se sugiere hacer una identificación de las proteínas que tienen esta facultad para su posterior ubicación dentro de su genoma para identificar los mecanismos que regulan su transcripción, si esto fuera posible, entonces podría manipularse y crear semillas con la facultad de facilitar su cocción y de esta manera se pueda mantener su calidad culinaria y nutrimental aun después de largos periodos de almacenamiento en altas temperaturas ( $>40^{\circ}\text{C}$ ) y alta humedad ( $>85\%\text{HR}$ ).
- El impacto en la agricultura del país sería favoreciendo a los agricultores con semillas que conserven su calidad aun después de pésimas condiciones de almacenamiento y que al ser sembradas en la siguiente temporada de cultivo, se mantenga la alta calidad del frijol.
- El desarrollo de semillas de alta calidad culinaria y nutrimental de rápida cocción, impactaría en la industria del procesamiento de alimentos en el desarrollo tecnológico para la manipulación de las condiciones de cocción de los frijoles y así reducir el uso de energéticos y recursos económicos.
- En la SAGARPA se podría favorecer la certificación, la patente y su fe de origen de la semilla para lograr su alta cotización en el mercado y dar solución a los millones de trabajadores rurales que viven en extrema pobreza.

## VII. LITERATURA CITADA

1. Anzaldúa-Morales A., Quintero A. and Baladrán R. (1996). **Kinetics of thermal softening of six legumes during cooking.** Journal of Food Science. 61(1): 167-170.
2. Bernal L., Parra C., Portilla M., Peña-Valdivia C., Moreno E. (1997), **Cotyledon thermal behavior and pectic solubility as related to cooking quality in common beans.** Plant Foods For Human Nutrition. 50: 141-150.
3. Blumenkrantz N. and Asboe-Hansen G.(1973). **New method for quantitative determination of uronic acids.** Analytical Biochemistry, 54: 484-489.
4. Bourges R. H., (1987a). **Las leguminosa en la alimentación humana.** Cuadernos de Nutrición. 10(1): 17-32.
5. Bourges R. H., (1987b). **Las leguminosa en la alimentación humana.** Cuadernos de Nutrición. 10(2): 17-32.
6. Camara de diputados, (2000a), **Proposición de punto de acuerdo para que la camara de diputados solicite al ejecutivo federal, se incluya en el presupuesto de egresos de la federación para el 2001 al producto frijol en el programa de apoyo a la comercialización y desarrollo de mercados regionales.** <http://www.cddhcu.gob.mx/comisiones/comagr/pa6.htm> 30/octubre/00.
7. Camara de diputados, (2000b), **Comunicación del congreso del estado de Guanajuato, en el que se transcribe punto de acuerdo por el que se solidarizan y apoyan el acuerdo del congreso del estado de Zacatecas, relativo al rechazo a la convocatoria para la importación del frijol.** <http://www.cddhcu.gob.mx/comisiones/comagr/pa8.htm>. 9/noviembre/00
8. Camara de diputados, (2000c). **Proposición con punto de acuerdo para que en el presupuesto de egresos para el ejercicio fiscal del 2000, en el rubro de apoyo a la comercialización, se incluya al frijol, y que la secretaria de hacienda, retire los cupos ya expedidos.** <http://www.cddhcu.gob.mx/comisiones/comagr/pa14.htm>, 29/noviembre/00.
9. Carpita N.and Gilbeaut D.(1993) , **Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth.** The plant Journal. 3 (1): 1-30.

11. Cruz García N. (1996). **Características de la calidad tecnológica y nutrimental de diez variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*)**. Tesis. Departamento de Fitotecnia. UACH. México. 90 paginas.
12. Deman J., Voisey P., Rasper V. and Stanley D. (1976). **Reology and texture in food quality**. AVI Publising. 7: 275-307.
13. Díaz de León S. F.(1989). **Relación entre el grado de metilación de la pectina y el tiempo de cocción en algunas variedades de frijol**. Tesis. Facultad de Ciencias. UNAM. México. Paginas 80.
14. Doco T., Williams P., Vidal S. and Pellerin P. (1997). **Rhamnogalacturonan II, a dominant polysaccharide in juices produced by enzymic liquefaction of fruits and vegetables**. Carbohydrate Research 297: 181-186.
15. Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P., Smith F. (1956), **Colorimetric method for determination of sugar and related substances**. Analytical Chemistry, 28(3), March: 350-356.
16. El-Nawawi and Ismail. (1997). **Fractionation of citrus pectin on diethylaminoethyl-cellulose columns**. Process biochemistry. 32(5): 377-379.
17. Fanutti C., Gidley and Reid. (1991). **A xiloglucan-oligosaccharide-specific- $\alpha$ -D-xilosidase, or exo-oligoxiloglucan- $\alpha$ -xilohidrolase from germinated nasturtium (*Tropacolum majos L.*) seeds**. Planta. 184:137-147.
18. Fry S. (1988). **The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis**. Longman scientific and technical. England.
19. Fuchigami M., Miyazaki K. and Hyakumoto N. (1995). **Frozen carrots texture and pectic components as affected by low-temperature-blanching and quick freezing**. Journal of Food Science. 60(1): 132-136.
20. García H. y Peña-Valdivia. (1995). **La Pared Celular. Componente fundamental de las células vegetales**. UACH. México. Paginas 96.
21. Graham P. and Ranalli P., (1997). **Common Bean (*Phaseolus vulgaris*)**. Field Crops Research. 53: 131-146.
22. Hoagland P., Konja G., Claus E. and Fishman M. (1997). **HPSEC with component analysis of citrus and apple pectins after hollow fiber ultra filtration**. Journal of Food Science. 62(1): 69-74.

22. Hoagland P., Konja G., Claus E. and Fishman M. (1997). **HPSEC with component analysis of citrus and apple pectins after hollow fiber ultra filtration.** Journal of Food Science. 62(1): 69-74.
23. Howard L., Burma P. and Wagner A. (1997). **Firmness and cell wall characteristics of pasteurized Jalapeño pepper rings as affected by preheating and storage.** Journal of Food Science. 62(1): 89-92.
24. Jalil Saab (2001). **Biología molecular de la tolerancia a sequía en plantas.** [http://pt7mdv.ceingebi.unam.mx/server/PRG.base?alterno:0.clase:div.tit:Biología\\_molecular\\_de\\_la\\_tolerancia\\_a\\_sequía\\_en\\_plantas.tipo:doc.dir:div.capsula07.html.res:crobles.edita:jalil\\_pre:div](http://pt7mdv.ceingebi.unam.mx/server/PRG.base?alterno:0.clase:div.tit:Biología_molecular_de_la_tolerancia_a_sequía_en_plantas.tipo:doc.dir:div.capsula07.html.res:crobles.edita:jalil_pre:div), UNAM.
25. Jones P. and Boulter D. (1983). **The cause of reduced cooking rate in *Phaseolus vulgaris* following adverse stage conditions.** Journal of Food Science. 48: 623-626.
26. Kigel J. and Galili G. (1995). **Seed development and germination.** Marcel Dekker, New York. 447-474.
27. Kon S. (1968). **Pectic substances of dry beans and their possible correlation with cooking time.** Journal of Food Science. 33: 437-438.
28. Liu K. (1995). **Cellular, biological, and physicochemical basis for the hard-to-cook defect in legume seeds.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 35(4): 263-298
29. McDougall G., Morrison I., Stewart D., and Hillman J.(1996), **Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function.** Journal Science Food Agriculture 70: 133-150.
30. Mendoza Aguilar M. (1992). **Contribución de las pectinas a la calidad culinaria del frijol (*Phaseolus vulgaris*).** Tesis. Facultad de Ciencias. UNAM. México. Páginas 72.
31. Moskowitz R. (1987). **Food Texture.** Marcel Dekker. Part 1: Physical Measures Of Texture: 1-94.
32. Mukhiddinov Z., Khalikov D., Abdusamiev F. and Avloev Ch. (2000). **Isolation and structural characterization of a pectin homo and ramnogalacturonan.** Talanta. 53: 171-176.
33. Ng A. and Waldron K. (1997). **Effect of cooking and per-cooking on cell-wall chemistry in relation to firmness of carrot tissues.** Journal Science Food Agriculture. 73: 503-512.

- 36 SAGARPA (1997a), Producción mundial de frijol, Claridades Agropecuarias, 44 24-32.
37. SAGARPA (1997b), Producción de frijol en México: Diversidad y libre mercado, Claridades Agropecuarias, 3-23.
38. Sefa-Dedeh S. and Stanley D. (1979). **Textural implications of the microstructure of legumes.** Food Technology. 33(10): 77-83.
39. Sharma S., Liptay A. and Le-Mayer M. (1998). **Molecular characterization, physico-chemical and functional properties of tomato fruit pectin.** Food Research International. 30(7): 543-547.
40. Stanley W. (1986). **Chemical and structural determinants of texture of fabricated foods.** Food Technology. 3: 65-69.
41. Stolle-Smith T., Beekhuizen J., Kok M., Pijnenburg M., Recourt K., and Derksen J., and Voragen A. (1999). **Changes in cell wall polysaccharides of green bean pods during development.** Plant Physiology. 121: 363-372.
42. Stolle-Smith T., Beekhuizen J., Recourt K., Voragen A. and Dijk C. (2000). **Preheating effects on the textural strength of canned green beans. L. Cell wall chemistry.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. ASAP, articulo. 1-9.
43. Thompson E. and Fry C. (2000). **Evidence for covalent linkage between xiloglucano and acidic pectins in suspension-cultured rose cell.** Planta. 211: 275-286.
44. Tovar Martinez M. (1997). **Determinación de los cambios estructurales relacionados con el fenómeno de reversibilidad del endurecimiento en dos cultivares de frijol (*Phaseolus Vulgaris*).** Tesis. Fac. Ciencias. U. N. A. M. México, D. F. 80 paginas.
45. Van Buren. (1986). **Snap bean texture softening and pectin solubilization caused by the presence of salt during cooking.** Journal of food science. 51:131-134.
46. Vaquero Rojas M. M. (1986). **Características morfológicas y anatómicas (Testa) de la semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en relación con vigor, imbibición y cocción.** Tesis. Fac. Agronomía. U. A. N. L. México. 80 paginas.
47. Variano-Marston E. and Jackson (1981). **Hard-to-cook phenomenon in beans: structural changes during storage and imbibition.** Journal Of Food Science. 46: 1379-1385.
- 48 Waldron K., Smith A., Parr A., Ng A. and Parker M. (1997). **New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture.** Trends in Food Science and Technology. 8: 213-221.

47. Variano-Marston E. and Jackson (1981). **Hard-to-cook phenomenon in beans: structural changes during storage and imbibition.** Journal Of Food Science. 46: 1379-1385.
48. Waldron K., Smith A., Parr A., Ng A. and Parker M. (1997). **New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture.** Trends in Food Science and Technology. 8: 213-221.
49. Whistler and Bemiller J. N. (1973). **Industrial Gums. Polysaccharides and their derivatives.** 2a Edición. Academic Press. New York and London. Pag. 429-465.