

00528
60



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

"RELACION ENTRE LA ACTIVIDAD DE
POLIGALACTURONASA Y LA CALIDAD DE COCCION
DEL FRIJOL".

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A
ANA VALERIA) MARTINEZ SILVA



MEXICO, D. F.



2003

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Ana Valeria
Martínez Silva
FECHA: 20 / Enero / 2003
FIRMA: Valeria Martínez

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Prof. MARIA DE LOS ANGELES VALDIVIA LOPEZ
Vocal	Prof. IRMA OFELIA BERNAL LUGO
Secretario	Prof. JUAN DIEGO ORTIZ PALMA PEREZ
1er. Suplente	Prof. ALFREDO SALAZAR ZAZUETA
2º. Suplente	Prof. EUCLIDES AVILA CHAVEZ

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 104 Conjunto E Facultad de Química. UNAM

Nombre completo y firma del asesor del tema:

Dra. IRMA OFELIA BERNAL LUGO



Nombre completo y firma del sustentante:

ANA VALERIA MARTINEZ SILVA

Valeria Martínez

**Este trabajo esta dedicado especialmente a
Tere, Bianca y Andrés los quiero muchísimo.**

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios, por ser mi creador y gufa en esta aventura llamada vida.

A Tere, mi mamá, porque sin ti no sería ni la mitad de lo que hoy soy, eres mi mayor ejemplo, motivo e inspiración para salir adelante. Gracias por darme la vida. Gracias por ser mi mamá. Gracias por todo tu amor.

A mis hermanos consentidos: a Bianca, que mejor ejemplo a seguir que tu, Te quiero y te admiro, bien lo sabes. Y a mi hermanito Andrés por que siempre estas conmigo. Te quiero como a nadie. Y a ambos por soportar mi mal carácter y hacer inolvidable cada día juntos.

A mi papá gracias por mostrar interés en las cosas que realizó, te quiero.

A Ivan, por que me has acompañado en todos los momentos importantes de mi vida, por que me has sostenido cuando creía que no lo lograría, por que no existe nadie como tu, simplemente por que Te Amo.

A mi mejor amiga Verónica por tu maravillosa compañía durante los últimos 5 años, y por enseñarme la sinceridad de una verdadera amistad, pase lo que pase siempre estaremos juntas.

A Vanesa J. y Erika, dos grandes amigas con las que he aprendido que no importa que tan diferentes seamos ni la distancia que exista entre nosotras, en realidad siempre estaremos juntas para ayudarnos y aconsejarnos (bien o mal, no importa).

A mis buenos amigos del primer semestre de la carrera, Erick, Pancho, Pedrito, Juan, Liz, Emilio, Ginori, Mario, Miguel, Quique, por todos esos viernes, y esas fiesta que hicieron de la Universidad la mejor época de mi vida.

A mis buenisimas compañeras del laboratorio 104; Marce, Karla, Vanesa M. y Adriana C., que han hecho más agradable mi estancia en ese laboratorio y que me han demostrado su cariño.

En especial, quiero agradecer a la Doctora Bernal, por haberme permitido formar parte de su equipo, por todas y cada una de las oportunidades que me ha brindado, por todo lo que me ha enseñado pero sobre todo por guiarme en este trabajo tan importante para mí, gracias por todo el tiempo que me ha dedicado.

A la Doctora Ma. de Los Angeles Valdivia por el valioso tiempo que dedico a revisar este trabajo, sus observaciones han sido muy oportunas.

A el Profesor Juan Diego Ortiz por sus comentarios tan acertados para mejorar este escrito.

A la UNAM, por ser mi segundo hogar en los últimos años, por abrirme sus puertas y permitir mi superación.

INDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	5
Historia y generalidades	5
Estructura del frijol	6
Pared celular	7
Pectina. Estructura y composición	8
Procesamiento del frijol	10
Calidad del frijol	11
Modificaciones de la pectina durante el remojo y el almacenamiento	14
Poligalacturonasas	15
OBJETIVOS	17
HIPÓTESIS	18
METODOLOGÍA	19
Material biológico	20
Envejecimiento del frijol	20
Obtención de harina de frijol seco	20
Tiempo de cocción	21
Preparación de la columna de bio-gel	23

Preparación del extracto enzimático	24
Purificación de la enzima	24
Actividad de Poligalacturonasas	25
Determinación de actividad enzimática	26
Optimización de la técnica	26
Determinación de proteína	27
Extracción de pectina con CDTA	28
Hidrólisis de pectina por Poligalacturonasas	28
RESULTADOS EXPERIMENTALES	30
Optimización de la técnica	30
Actividad de Poligalacturonasa en semillas de frijol fresco	32
Efecto del remojo en la actividad de Poligalacturonasa en semillas de frijol	33
Efecto del almacenamiento sobre la calidad de cocción	33
Efecto del almacenamiento en la actividad de Poligalacturonasa en frijol Flor de Mayo	34
Actividad de Poligalacturonasa comercial sobre pectina aislada de frijol	37
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIÓN	46
BIBLIOGRAFÍA	47

INDICE DE TABLAS

	Pagina
Tabla 1. Modificación del peso molecular de ácido poligalacturónico por efecto del remojo	15
Tabla 2. Actividad de Poligalacturonasa en semillas de frijol fresco	32
Tabla 3. TC ₅₀ para frijol Flor de Mayo fresco y almacenado	34
Tabla 4. Ácido Urónico liberado por acción de Poligalacturonasa comercial en diferentes sustratos	40

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Anatomía de la semilla de frijol	7
Figura 2. Porción de la pared celular	8
Figura 3. Estructura de la pectina	9
Figura 4. Mecanismo de acción de la Poligalacturonasa	16
Figura 5. Cocinador "Martson"	22
Figura 6. Cinética de la cocción de un lote de frijol	22
Figura 7. Efecto del pH en la actividad de Poligalacturonasa extraída de semilla de frijol remojado durante 18 h a 30° C	30
Figura 8. Actividad de Poligalacturonasa a diferentes concentraciones de poligalacturonato	31
Figura 9. Efecto del remojo en la actividad de Poligalacturonasa en frijol	33
Figura 10. Efecto del almacenamiento en la actividad de Poligalacturonasa en frijol Flor de Mayo	35
Figura 11. Caracterización de las actividades enzimáticas presentes en la preparación de Pectinasa comercial	37
Figura 12. Actividad de Poligalacturonasa en pectina aislada de frijol Flor de Mayo	39

RESUMEN

La calidad de cocción es una de las principales cualidades que el consumidor busca en el frijol. Esta calidad se incrementa por un tratamiento previo a la cocción y se disminuye por el almacenamiento inadecuado de la semilla. En semilla fresca el efecto benéfico va acompañado de una disminución en el peso molecular de las pectinas. Mientras que en la semilla almacenada la pectina se insolubiliza y el remojo no disminuye el peso molecular de la pectina soluble; aunque si mejora ligeramente la calidad de cocción de este tipo de lote. Lo anterior indica que las pectinas se modifican cuando las semillas se someten a tratamientos previos a la cocción que alteran su calidad sensorial y nutricional, así como su tiempo de cocción.

Las pectinas son polímeros de ácido galacturónico cuyo peso molecular disminuye en presencia de Poligalacturonasas, enzimas presentes en la pared celular. Durante el crecimiento por elongación, estas hidrolasas relajan la pared de la célula vegetal, a través de disminuir el peso molecular de los polisacáridos que la forman. Por lo anterior, el efecto diferencial del remojo sobre el peso molecular de las pectinas en semillas frescas o almacenadas podría ser consecuencia de la actividad de enzimas Poligalacturonasas, las cuales estarían presentes en la pared celular y cuya actividad en frijol fresco se incrementaría durante el remojo. En cambio, el almacenamiento inadecuado induciría una disminución en la actividad de estas enzimas, cuyas consecuencias serían la insolubilización de las pectinas en semillas almacenadas, y la imposibilidad de modificar el peso molecular de la pectina soluble. Con la finalidad de

demostrar lo anterior, en este trabajo, se determinó la actividad de estas enzimas en semillas de frijol frescas y almacenadas; tanto secas como remojadas. Se encontró que estas enzimas están presentes en la pared celular de la semilla y su actividad se incrementó dos veces por efecto del remojo. La actividad de Poligalacturonasas se perdió totalmente después de un corto tiempo de almacenamiento inadecuado, y no se recuperó por efecto del remojo. Los resultados anteriores indican que el remojo y el almacenamiento tienen efecto sobre la actividad de las Poligalacturonasas en semillas de frijol. También se demostró que la pectina aislada de frijol es hidrolizada por una preparación comercial de Poligalacturonasas. Lo sugiere que la actividad de Poligalacturonasas presentes en la pared celular de semillas frescas de frijol participa en la modificación de las características de la pectina inducidas por tratamientos que afectan la calidad de cocción de la semilla.

INTRODUCCIÓN

En México el frijol es uno de los principales alimentos y es consumido por todos los estratos sociales, es un grano rico en proteínas ya que contiene 25% de éstas, además de 69.5% de hidratos de carbono totales, 4.7% de fibra cruda, 4.2% de cenizas y 1.3% de grasa y presenta un alto contenido de lisina.

Para que el frijol sea aceptado por el consumidor es necesario que sea un producto de buena calidad, además de apariencia y sabor agradable, es muy importante que la semilla requiera cortos tiempo de cocción, (40 min. aproximadamente). Si el frijol no presenta buena calidad de cocción, será rechazado por el consumidor y esto se reflejará en importantes pérdidas económicas y de cosecha.

La calidad de cocción puede sufrir modificaciones tanto positivas (disminución en el tiempo de cocción, aumento en la disponibilidad de nutrimentos y la reducción en el contenido de factores antinutricionales) como negativas (aumento en el tiempo de cocción y disminución en la disponibilidad de nutrimentos) . El remojo es un tratamiento que se le da al frijol previo a la cocción, este tratamiento favorece la calidad de cocción, ya que su principal función es disminuir el tiempo de cocción, y el cambio observado es una disminución en la dureza de la semilla. El almacenamiento en condiciones de alta temperatura y elevada humedad relativa, provoca una pérdida en la calidad de cocción ya que a pesar de los tiempos prolongados de cocción, la semilla no alcanza la suavidad y palatabilidad deseadas por el consumidor, lo cual además de representar un problema económico; es un problema nutricional, debido a la importante pérdida de

nutrientes por el prolongado tratamiento térmico; es un problema energético por el aumentado gasto de energía durante la cocción y ecológico debido a que en poblaciones rurales se cocina con leña, y un largo tiempo de cocción implicaría un aumento en la tala de árboles.

La suavización de la semilla, depende principalmente de cambios físicos de sus constituyentes celulares, y desde el punto de vista estructural, de la pared celular y su lámina media formada principalmente de pectinas.

Se han estudiado los cambios que ocurren en el frijol fresco durante el remojo encontrándose una disminución en el peso molecular de las pectinas, esta modificación parece ser la responsable del menor tiempo de cocción observado en el frijol fresco remojado respecto del que presentan los frijoles secos. Por otra parte, en estudios realizados anteriormente se ha observado que el peso molecular de las pectinas de frijoles almacenados no disminuye por efecto del remojo.

El cambio en el peso molecular de este polisacárido podría deberse a la acción de las enzimas Poligalacturonasas presentes en la pared celular de semillas de frijol seco. La actividad de esta hidrolasa podría incrementar o disminuir por la hidratación de la pared celular durante el remojo y/o almacenamiento en condiciones adversas. Como consecuencia de esto, se podrían modificar o no las pectinas.

Con la finalidad de probar la hipótesis anterior en este trabajo se estudió el efecto que tiene el remojo y el almacenamiento sobre la actividad de Poligalacturonasas.

ANTECEDENTES

HISTORIA Y GENERALIDADES:

El frijol (*Phaseolus vulgaris sp.*) es miembro de la familia de las leguminosas, de la tribu Phaseolae, subfamilia Papilionoidea. Son semillas variadas en color y en forma, de 4-5 mm de largo por 3.5-4 mm de ancho. (Graham et al. 1997) .

Algunos de sus nombres comunes son: frijol, habichuela, judía común, alubia, cholo, ayocote, ajote, french bean, kidney bean, poroto, entre otros (Blancas, 2001). El frijol común se reporta originario de México y Centroamérica (Graham et. al., 1997). Poblaciones silvestres de *Phaseolus vulgaris* se encuentran desde el centro de México hasta el norte de Argentina y poblaciones de frijol cultivado han sido encontrados en el centro de México y en la sierra de Perú hace 7000 años, también se han encontrado frijoles silvestres en Oaxaca de 9000 años de antigüedad (León, 1987). Los Españoles y Portugueses se llevaron al frijol común de su centro de origen a Europa, África y otras partes del nuevo mundo. Ahora es ampliamente cultivado en los trópicos, subtrópicos y regiones templadas del mundo. De manera general, el 30% de la producción mundial es en Latinoamérica.

Es una especie que se desarrolla en altitudes de 800-2000 m; en lugares donde el rango de precipitación es de 90-4290 mm y las temperaturas óptimas son de 15.6-21.1° C; es sensible a las concentraciones de aluminio, boro, manganeso y sodio, pero se adapta a un amplio rango de pH: 5.5-6.8, 5.5-7.5, 6.0-7.0 y 6.0-7.5 dependiendo de la variedad o cultivar (Duke, 1981).

La planta del frijol florece anualmente entre los meses de octubre y noviembre y los frutos se producen de diciembre a mayo (Binder, 1997; Duke, 1981; León, 1987).

La composición de la semilla es 25% proteínas, 69.5% hidratos de carbono totales, 4.7% de fibra cruda, 4.2% de cenizas, 1.3% de grasa 7.4 % de humedad y presenta un alto contenido de lisina (Binder, 1997).

El frijol se considera como la cuarta fuente de proteína en América tropical (García et al. 1988). Su contenido proteico es aproximadamente el doble del de la mayoría de las leguminosas y es rico en micronutrientes esenciales como el hierro y el ácido fólico (una de las vitaminas del complejo B) (Martín-Cabrejas et al. 1997; Reyes – Moreno Y Paredes, 1993). Por lo tanto, el frijol es la leguminosa alimenticia más importante para cerca de 300 millones de personas, que, en su mayoría, viven en países en desarrollo (Ensmiger et al. 1994). El frijol representa también una fuente importante de dinero en efectivo para los agricultores de escasos recursos (Sgarbieri y Whitaker, 1982).

ESTRUCTURA DEL FRIJOL

Botánicamente, una semilla madura de frijol esta compuesta de testa, dos cotiledones y un embrión. La testa consiste de varias capas de células, dependiendo de la especie. Los cotiledones están formados de células parenquimatosas, las cuales contienen distintas paredes celulares y organelos especializados conocidos como gránulos de almidón y cuerpos proteicos (Liu Kenshui 1995; Figura 1).

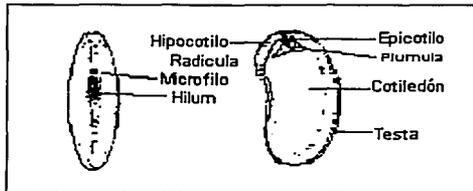


Figura 1. Anatomía de la semilla de frijol.

PARED CELULAR

La pared celular es un componente típico de las células vegetales. Tienen un papel importante en actividades como absorción, transpiración, traslocación, secreción y reacciones de reconocimiento. En las células del cotiledón encontramos: 1) **lámina media**, 2) **pared primaria** y 3) **pared secundaria**, (Figura 2).

1) **Lámina media**: Se inicia como "placa celular", en el momento de la división celular. Es amorfa y ópticamente activa. Es una zona libre de celulosa y se compone principalmente de pectina. Se descompone con facilidad, y cuando esto sucede el tejido se separa en células individuales.

2) **Pared primaria**: Se forma inmediatamente después de la división celular, antes de que la célula complete su crecimiento. Los cambios que experimenta son reversibles. Es una estructura que se expande y se acomoda durante el crecimiento de la célula.

3) **Pared secundaria**: Sigue a la pared primaria en orden de aparición. Tiene una alta proporción de celulosa. Generalmente consta de tres capas con características físicas y

químicas diferentes, que se denominan de afuera hacia adentro S1 (capa externa), S2 (capa medial o central) y S3 (capa interna). Algunos consideran que la última capa puede ser considerada como una pared terciaria.

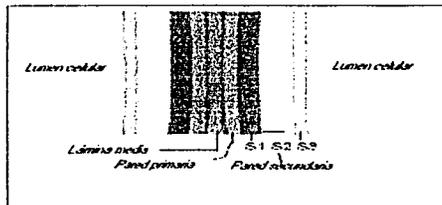


Figura 2. Porción de Pared celular.

PECTINA. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN

La pectina fue definida por Kertesz (1951) como los ácido pectínicos solubles en agua de grado de metilación variado que son capaces de formar geles con azúcar y en medio ácido bajo condiciones determinadas.

La pectina es un heteropolisacárido estructural, que le confiere rigidez a las paredes celulares de todos los vegetales en los que actúa como agente cementante. Su peso molecular varía de 20 a 400 KDa, lo cual depende del tipo y estado de madurez de la fuente de origen.

Está formada por un polímero principal de moléculas de ácido D-galacturónico unidas por enlaces $\alpha(1,4)$, algunos de cuyos grupos carboxilos están esterificados con metanol (metoxilados); contiene, además pequeñas cantidades de azúcares neutros como

ramnosa, galactosa, arabinosa y xilosa que forman cadenas laterales en la estructura principal (figura 3) (Blancas, 2001).

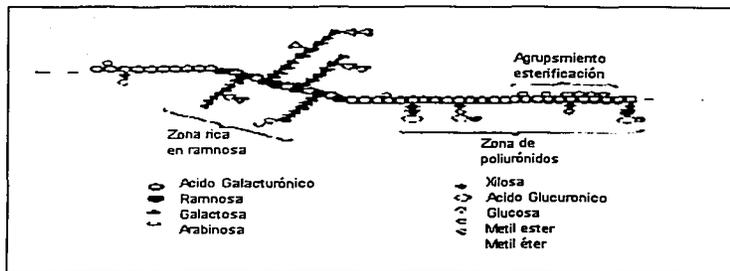


Figura 3. Estructura de la pectina.

Las sustancias pécticas constituyen una tercera parte de la pared celular de las plantas dicotiledóneas y de algunas monocotiledóneas. (Jarvis et al. 1988). En ellas las zonas más ricas corresponden a la pared celular primaria y a la lámina media que las separa. Las sustancias pécticas se hallan asociadas a los otros constituyentes de la pared celular (celulosa, hemicelulosa, lignina, etc.) mediante uniones físicas y/o químicas actuando como cementante intercelular y dando así rigidez a los tejidos (Piñik y Voragen, 1970).

Un aspecto que diferencia a las pectinas entre sí es su contenido de esteres metílicos, o grado de esterificación, que disminuye al producirse la maduración y ablandamiento de las plantas.

Existen diferentes tipos de sustancias pécticas: la protopectina que es la sustancia péctica presente en la pulpa de los frutos inmaduros; los ácidos pectínicos son sustancias pécticas menos metiladas que la anterior, dependiendo del grado de polimerización y el de metilación los ácidos pectínicos pueden ser coloidales (de alto metoxilo) o solubles en agua (de bajo metoxilo).

Asociadas a las pectinas se encuentran diversas hidrolasas como: Poligalacturonasas, Galactosidasas, Xilosidasas, Pectin metilesterasas, entre otras. Estas enzimas modifican las propiedades de la pectina durante la elongación celular, y tanto su actividad como su especificidad dependen del grado de esterificación metílica.

Como las sustancias pécticas son elementos estructurales de la lamina media y la pared celular primaria de los vegetales superiores, las alteraciones en su grado de polimerización y esterificación provocados por acción de enzimas pécticas producen cambios en la textura de las frutas y legumbres durante la maduración, el almacenamiento o durante su procesamiento.

PROCESAMIENTO DEL FRIJOL

La preparación del frijol para su consumo se realiza en dos etapas separadas: el remojo y la cocción.

Remojo: Le permite a la semilla de frijol absorber el agua que necesita para cocinarse uniformemente. Como consecuencia de la hidratación aumenta el volumen de la semilla y se favorece la solubilización de compuestos (Stanley et al. 1978). Además la finalidad

del remojo es disminuir el tiempo de cocción de los frijoles ya que un tiempo de cocción prolongado resulta en la destrucción de proteínas y vitaminas por acción del calor.

Cocción: En este tratamiento térmico, el calor aplicado induce en la semilla los cambios estructurales que conducen a su ablandamiento, al desarrollo de sabor y aroma agradables y a la disminución de su toxicidad. La suavización de los cotiledones, depende principalmente de cambios físicos de los constituyentes celulares, como son la gelatinización del almidón, la desnaturalización de proteínas, lípidos, polifenoles, y desde el punto de vista estructural, la pared celular y su lámina media en donde se favorece la solubilización y despolimerización de la pectina (Stanley et al. 1978).

El período de tratamiento térmico que requieren las semillas para alcanzar la textura y palatabilidad deseada por el consumidor se le denomina tiempo de cocción (Blancas 2001).

CALIDAD DEL FRIJOL.

La calidad del frijol es determinada por factores como aceptabilidad por el consumidor, características en el remojo, calidad de cocción y valor nutrimental. Las características de aceptabilidad incluyen tamaño, color, forma, apariencia, estabilidad bajo condiciones de almacenamiento, propiedades de cocción, calidad en el producto obtenido y sabor (Reyes-Moreno y Paredes, 1993). Un estudio en la calidad de las características de consumo de frijol identificó el tiempo cocción como uno de los factores más importantes (Herpen, 1991).

La calidad del frijol está relacionada el tiempo de cocción; un frijol con buena calidad de cocción adquiere un grado de suavidad aceptable para el consumidor en un tiempo aproximado de 40 minutos (Dos Santos y Bourne, 1985; Moscoso et al., 1984). El consumo del frijol puede ser afectado por una pobre calidad de cocción (Vindiola et al. 1986). Se han estudiado algunos tratamientos que modifican la calidad de cocción. Es sabido que al remojar las semillas secas mejora su calidad de cocción (Liu y Mc Watters, 1994; Silva et al., 1981; Singh et al., 1988; Taiwo et al., 1996); y si el remojo se realiza en soluciones salinas de hidróxido de sodio, carbonato de sodio o bicarbonato de sodio, se favorece la absorción de agua y se reduce drásticamente el tiempo de cocción (Palma-Tirado et al. 1992), el tratamiento con enzimas pectinasas también reduce el tiempo de cocción de los frijoles (Singh y Rao 1995).

Se han realizado muchos estudios acerca de la pérdida de calidad de cocción, cada uno de ellos hace énfasis en diferentes aspectos: grado de hidratación (Rockland y Jones, 1974); grado de cocción (Kon, 1980; Molina et al. 1975); tiempo, temperatura y humedad del almacenamiento (Burr et al., 1968; Martson, 1946; Morris, 1963; Sefa-Dedeh y Stanley, 1979; Sefa-Dedeh et al., 1979) cambios en la microestructura (Rockland y Jones, 1974; Varriano-Martson y Jackson, 1981); y cambios químicos o enzimáticos ocurridos en el cotiledón durante el almacenamiento (Gloyer, 1921; Varriano-Martson y Jackson, 1981; Moscoso et al., 1984).

Pero no todas las modificaciones sobre la calidad de cocción son positivas, también existen condiciones que pueden afectarla aumentando el tiempo de cocción, como por ejemplo: condiciones genéticas, ambiente de crecimiento, o almacenamiento. El efecto del almacenamiento inadecuado sobre la calidad de cocción ha sido estudiada por

varios investigadores quienes encontraron que los frijoles secos pueden deteriorarse muy rápidamente como una función de tiempo y condiciones de almacenamiento, particularmente bajo las condiciones de temperatura elevada y humedad alta que prevalecen en climas tropicales. Las consecuencias observadas de este deterioro involucran un aumento en tiempo cocción y un deterioro de la textura y el sabor (Martin-Cabrejas et al. 1999), pero la textura no es el único atributo de calidad afectado; el valor nutritivo también es dañado por una pérdida de vitaminas y una disminución en la disponibilidad de la proteína (Sgarbieri y Whitaker, 1982). Estos cambios resultan en pérdidas económicas debido a que los consumidores rechazan los frijoles con una textura pobre y también por la necesidad aumentada de energía requerida para cocinarlos, este fenómeno es conocido como el defecto Hard-to-cook (HTC) (Molina et al., 1976; Reyes-Moreno et al., 1994). Las semillas HTC no logran obtener la textura adecuada a pesar de ser sometidas a tiempos prolongados de cocción debido a un fracaso de las células del cotiledón para separarse durante la cocción (García et al. 1998).

Se han sugerido varias causas para explicar el fenómeno de HTC. (1) la formación de pectatos insolubles en la lámina media de la pared celular (Chang et al., 1977; Kon y Sanshuck, 1981.; Jones y Boulter, 1983.; Moscoso et al., 1984; Hentges et al., 1991). (2) la degradación de membranas de la célula (Varriano-Marston y Jackson, 1981). (3) los cambios en los compuestos fenólicos también fue implicado por varios autores y (4) una combinación de mecanismos también fue sugerida (Hincks y Stanley, 1986; Aguilera y Ballivian, 1987; Liu, 1995).

Las células de la lámina media de los frijoles frescos se destruyen durante la cocción, en cambio las semillas de frijoles almacenados muestran una pobre separación durante la cocción (Liu Kenshui 1995), lo cual se ha atribuido a un incremento en las propiedades adhesivas de los componentes de la lámina media durante el almacenamiento (Bourne, 1976; Hincks y Stanley, 1986).

MODIFICACIONES DE LA PECTINA DURANTE EL REMOJO Y EL ALMACENAMIENTO.

Se han estudiado los cambios que ocurren en la pectina durante el remojo del frijol encontrándose que en frijol seco hay una disminución en el peso molecular de este polímero (Tabla A), un descenso en el contenido de residuos ácidos de la pared celular, y un aumento en la cantidad de ácidos urónicos solubles en agua. Mientras que el peso molecular de las pectinas, aisladas de frijol endurecido, no se modifica por efecto del remojo. Esto se interpreta como que en el primer caso los ácidos urónicos de la pared celular, localizados fundamentalmente en la lámina media se solubilizan (Ebbelar, 1996 y Blancas, 2001). Mientras que en el segundo esto no ocurre. Lo anterior puede deberse a que la hidratación de la semilla durante el remojo debilita la unión electrostática calcio-ácido urónico lo que se puede deber a la acción de Poligalacturonasas presentes en la pared celular de semillas frescas sin remojo y activada por la hidratación de la pared celular durante el remojo de las semillas, esta modificación podría ser la responsable del menor tiempo de cocción observado en el frijol remojado respecto del que presentan los frijoles secos (Blancas, 2001).

Tabla 1. Modificaciones del peso molecular de la pectina de frijol por efecto del remojo.

PM de pectinas	Flor de Mayo		Bayo Mecentral		2626	
	Seco	Remojado	Seco	Remojado	Seco	Remojado
2000 kDa	56	26	62	52	72	56
500 kDa	22	40	14	31	20	23
70 kDa	18	23	14	14	6	12
7 kDa	4	11	10	2	1	9

Mientras que durante el almacenamiento la estructura o composición química de las pectinas se podrían modificar. Estas modificaciones evitarían que las Poligalacturonasas actúen sobre la cadena de pectina para despolimerizarla y facilitar su solubilización durante la cocción.

Otra alternativa sería que durante el almacenamiento inadecuado del frijol la actividad de Poligalacturonasas disminuyera, y por lo tanto el peso molecular de las pectinas no se modificaría.

POLIGALACTURONASAS

Las enzimas pécticas catalizan la degradación de las sustancias pécticas de las paredes celulares.

Las Poligalacturonasas catalizan la hidrólisis de los enlaces α -D-1,4-glicosídicos de los residuos no esterificados de la pectina (Figura 4). Su sustrato preferido son las pectinas de bajo grado de metoxilación. Su pH óptimo es del rango de 4.5 – 6.0 (Wong, 1986). Hay dos tipos de Poligalacturonasas: Las exopoligalacturonasas clasificadas como EC.3.2.1.67, que eliminan residuos de ácido galacturónico (Pressley et al., 1971). Las endopoligalacturonasas, clasificadas como EC.3.2.1.15, rompen los enlaces α -1-4 glicosídicos al azar a lo largo de la cadena de urónico. Los dos tipos de enzimas requieren de residuos desesterificados. La acción de las Poligalacturonasas está limitada ya que su acción termina cuando en la cadena principal hay residuos de ramnosa u otros monómeros.

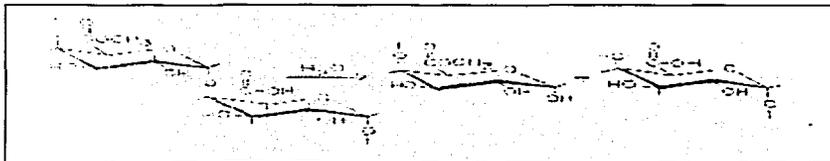


Figura 4. Mecanismo de acción de Poligalacturonasa.

OBJETIVOS

Objetivo General

✓ Determinar la participación de la Poligalacturonasa en las modificaciones que sufre la pectina cuando la semilla de frijol se somete a tratamientos que modifican su calidad de cocción, como son remojo y almacenamiento inadecuado.

Objetivos específicos

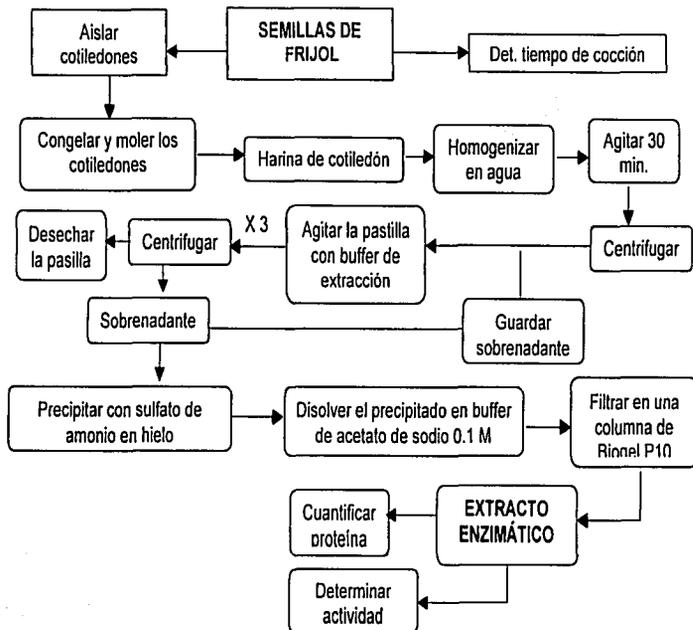
- a) Determinar los tiempos de cocción de tres variedades de frijol fresco y almacenado, utilizando semillas con y sin remojo.
- b) Optimizar la técnica para determinar actividad de Poligalacturonasa en semillas de frijol.
- c) Explorar la presencia de Poligalacturonasa en semillas de frijol frescas.
- d) Determinar el efecto del remojo sobre la actividad de Poligalacturonasa.
- e) Identificar el efecto del almacenamiento inadecuado sobre la actividad de Poligalacturonasa.

HIPÓTESIS

En este trabajo se plantearon la siguiente hipótesis:

- El remojo de semillas frescas de frijol resulta en una disminución del peso molecular de la pectina. La Poligalacturonasa es una enzima que hidroliza la pectina entonces la acción de la Poligalacturonasa podría ser la responsable de estos cambios.
- El almacenamiento inadecuado de las semillas de frijol insolubiliza las pectinas. La Poligalacturonasa es una enzima que facilita la solubilización de las pectinas entonces el almacenamiento inadecuado induce una disminución en la actividad de la enzima.

DIAGRAMA DE FLUJO



MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron tres variedades de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) las cuales fueron: Flor de Mayo cosecha 1999, Bayo Mecentral y 2626 ambos cosecha 1996. Los cultivares se mantuvieron en frascos herméticamente cerrados y almacenados a 4° C hasta el momento de su análisis.

Tanto las semillas frescas como las envejecidas se ensayaron en dos condiciones: secas y remojadas, esta última condición se logró remojando las semillas en agua destilada durante 18 horas a 30° C.

Las variedades Bayo Mecentral y 2626 se ensayaron solo en forma fresca tanto secas como remojadas.

ENVEJECIMIENTO DE FRIJOL

Las semillas de frijol Flor de Mayo fueron almacenadas en un recipiente de plástico sellado a una temperatura de 30° C y con una humedad relativa del 75% obtenida a partir de una solución saturada de NaCl. En nuestro laboratorio hemos demostrado que en estas condiciones de almacenamiento el frijol alcanza un 16% de contenido de humedad, lo cual es suficiente para que se realicen las reacciones que conducen al endurecimiento del frijol, pero son limitantes para el crecimiento de hongos. El tiempo de almacenamiento fue de 10 y 18 días.

OBTENCIÓN DE HARINA DE FRIJOL SECO

Con ayuda de una navaja se retiró la testa y el eje embrionario de los frijoles secos.

Los cotiledones se molieron en licuadora por pulsos para evitar que la muestra se calentara y se desnaturalizaran las proteínas presentes. Después de cuatro ciclos de molienda, la harina se tamizó en un cedazo y se almacenó en un frasco bien cerrado y en refrigeración hasta su uso.

TIEMPO DE COCCIÓN

Se utilizó el "cocinador Martson" (Figura 5) que contiene una charola con 25 pozos en donde se colocaron los frijoles, se puso una varilla encima de cada frijol con una masa de 200g cada una. El cocinador se introdujo en una olla con agua hirviendo, se cubrió la olla con una tapa de plástico y se mantuvo el agua en ebullición. Se tomó el tiempo en que cada una de las varillas perforó la semilla de frijol. Se hizo una gráfica de número de frijoles cocidos contra tiempo (Figura 6) y de la gráfica se obtuvo el tiempo de cocción medio (TC_{50}) determinado como los minutos en los que el 50% de las semillas de frijol se cocieron. Las pruebas de cocción se realizaron por triplicado para cada tratamiento; frijol fresco (seco y remojado) y frijol almacenado (seco y remojado).

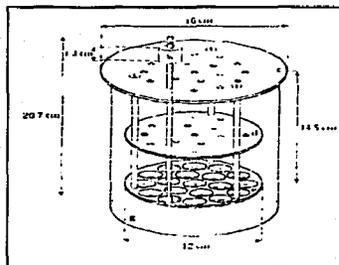


Figura 5. "Cocinador Martson" tomado de Varriano-Martson and Jackson (1981)

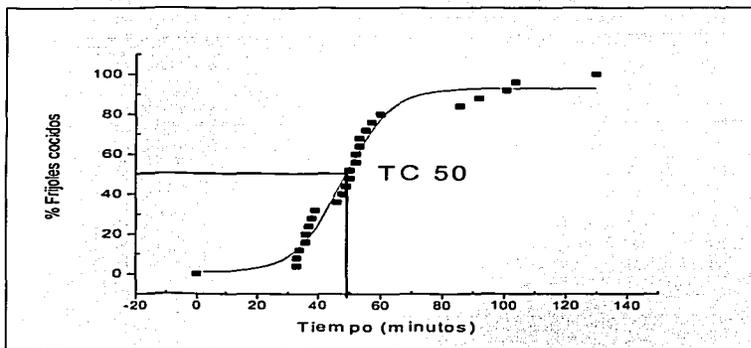


Figura 6. Cinética de la cocción de un lote de frijol. En la gráfica se indica el tiempo de cocción medio (TC₅₀).

PREPARACIÓN DE LA COLUMNA DE BIO-GEL.

- a) El Bio-Gel seco se adicionó gradualmente a un vaso de precipitados que contenía agua destilada y se dejó hidratar por dos días a temperatura ambiente, la resina se agitó suavemente y se retiraron los finos.
- b) Para montar la columna, ésta se cerró y adicionó agua hasta arriba de la mitad de la columna. Con una pipeta de plástico se tomaron aproximadamente 10 ml de la resina la cual se dejó caer lenta y cuidadosamente en el interior de la columna.
- c) Después se abrió la columna y se adicionó el agua necesaria para evitar que la columna se secase. Durante ese proceso la resina se empaquetó perfectamente. Se cuidó que no se formaran burbujas en el interior de la columna.
- d) El volumen externo de la columna se determinó adicionando a la columna empaquetada 400 μ l de una solución colorida de sulfato de hierro. En cada fracción se recolectaron 5 gotas en tubos de ensayo hasta que eluyó de la columna toda la solución colorida, todos los tubos que no contenían solución colorida se vaciaron en una probeta graduada y se midió el volumen total, este volumen fue de 1.6 ml que se consideró como el volumen externo, es decir, es el volumen en el que salen las sustancias con un peso molecular mayor que el sulfato de hierro.
- e) Para equilibrar la columna se utilizó un buffer de acetato de sodio 0.1 M (pH = 4.5). La columna se lavo con 10 ml de este buffer. Para comprobar que en la columna se había equilibrado el buffer de corrida se diluyo 1:100 y se midió su conductividad que fue de 111 Ω . El buffer que emergió de la columna se

recolectó, se diluyó 1:100 y se le midió la conductividad que fue de 112 Ω , estos valores semejantes de conductividad indicaron que la columna se había equilibrado.

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO

Se pesaron 500 mg de harina de coliflor y se congelaron con nitrógeno líquido, se homogenizó con mortero y se resuspendieron en 5 ml de agua destilada, se centrifugó por 10 minutos a 6000 rpm a 4° C y se guardó el sobrenadante. La pastilla se sometió a una extracción con 5 ml de buffer (acetato de sodio 0.1 mM, NaCl 1.5 M pH 4.5) con agitación magnética durante 30 minutos a 4° C; se centrifugó nuevamente a 6000 rpm por 10 minutos a 4° C, y se juntaron los sobrenadantes. La pastilla se reextrajo con otros 5 ml de buffer, los cuales después se centrifugaron se juntaron con los otros sobrenadantes.

PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA ENZIMA

Todos los sobrenadantes se precipitaron con sulfato de amonio al 100% de la siguiente forma:

- a) Se agregó poco a poco y con agitación constante, 10.45 g de sulfato de amonio a los 15 ml de sobrenadante obtenido de la extracción enzimática en frío. El pH de esta solución se midió frecuentemente, esto es con el fin de evitar que varíe y que las enzimas se desnaturalicen, el pH se mantuvo en valores por arriba de 5 adicionando NaOH 1 M.

- b) Una vez adicionado todo el sulfato de amonio se dejó en agitación por 15 minutos más para que las proteínas terminen de precipitar.
- c) Pasado ese tiempo se centrifugo 15 minutos a 1000 rpm a 4° C, se desechó el sobrenadante y la pastilla formada se disolvió en 2 ml de buffer de ensayo (acetato de sodio 0.1 mM, pH =5.5).
- d) Se centrifugo a 4° C por 10 minutos a 3000 rpm.
- e) Enseguida se filtraron 400 µl del extracto por una columna de Bio-Gel P-10 (Bio-Rad Laboratories) para eliminar las sales contaminantes.

ACTIVIDAD DE POLIGALACTURONASA

La actividad de Poligalacturonasa se determinó cuantificando la cantidad de ácido urónico obtenido de incubar ácido poligalacturónico con el extracto enzimático. Se utilizó la metodología propuesta por Gross (1982) en la cual se usa 2-cianocetamida.

- a) A dos tubos eppendorf se adicionaron 100 µl de buffer de ensayo (acetato de sodio 0.1M, pH 5.5), 400 µl de extracto enzimático desalado, 100 µl de solución de ácido poligalacturonico (SIGMA) al 0.5% y finalmente agua c.b.p. 800 µl. El blanco se elaboró de la misma manera pero sin adicionar extracto enzimático.
- b) Enseguida, los tubos eppendorf se incubaron durante 1 hora a 37° C, transcurrido ese tiempo se paró la reacción con 100 µl de buffer de boratos (ácido bórico 250 mM, tetraborato de sodio 250 mM) y 100 µl de 2-cianocetamida 1% pH 9.

- c) Se incubó por 45 minutos a 95° C. Una vez terminado el tiempo de incubación se centrifugo a velocidad máxima por 1 minuto y se leyó en espectrofotómetro a 270 nm.
- d) El contenido de ácidos urónicos se obtuvo con la ecuación de la recta de una curva estándar, a partir de una solución de ácido galacturónico (ALDRICH) de 1 mg/ml adicionándolo en lugar del extracto enzimático y siguiendo la metodología anterior.

Se hicieron tres repeticiones independientes para cada variedad de frijol sometido a los diferentes tratamientos (frijoles frescos y frijoles envejecidos) tanto secos como remojados.

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

- OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA

1. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD A DIFERENTES VALORES DE pH

Con la finalidad de optimizar la técnica la actividad de la Poligalacturonasa se determinó a diferentes valores de pH. Los valores de pH utilizados para los ensayos fueron 4.0, 5.5, 6.0, 7.0 y 8.0. Para realizar esta determinación se usaron buffers de fosfato de sodio 0.1 M, cuyo valor de pH fue ajustado con NaOH concentrado cuando se requirió subir el valor de pH, o HCl concentrado para disminuir el pH del buffer.

El ensayo se realizó por triplicado, y siguiendo la metodología antes descrita para determinar actividad de Poligalacturonasa.

2. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO

Las diferentes concentraciones de poligalacturonato con los que se determinó actividad de Poligalacturonasa para conocer cual es el valor óptimo fueron 0.1%, 0.2%, 0.5% y 1.0%.

Este ensayo se realizó por triplicado usando el pH óptimo determinado en el ensayo anterior.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

Se empleó el método de Lowry et al (1978).

- a) En un tubo de ensayo se adicionó de 50 a 150 μ l de extracto enzimático desalado y de agua destilada c.b.p. 350 μ l, luego se agregó 1 ml de solución C (Na_2CO_3 2%, NaOH 0.4%, tartrato de potasio 0.16% y SDS 1% que constituye la solución A; Y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4% que es la solución B en una proporción 100:1),
- b) Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- c) Se agregó 0.1 ml de reactivo de Folín, se agitó y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos para desarrollar color y se leyó a una longitud de onda de 660 nm en un espectrofotómetro.
- d) El valor de absorbencia obtenido se interpola en una curva patrón que se realizó con una solución estándar de seroalbúmina de bovino dentro de un rango de 0 a 100 μ g de proteína / ml, siguiendo la técnica de Lowry para conocer los μ g de proteína en la muestra.

EXTRACCIÓN DE PECTINA CON CICLOHEXANO-TRANS-1,2-DIAMINO-N,N,N'-TETRACETATO ÁCIDO (CDTA)

- a) Se pesaron 5 gramos de harina de frijol fresco y seco, se homogenizó en 50 ml de buffer de extracción (50 mM acetato de sodio, 50 mM CDTA, pH 6.5) y se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente.
- b) Transcurrido este tiempo, se centrifugo a 10000 rpm por 10 minutos a 4° C, luego se separó el sobrenadante y se guardó en un tubo.
- c) El pellet resultante se homogenizó en 50 ml de agua destilada para lavarlo, y se centrifugo nuevamente a 10000 rpm durante 10 minutos a 4° C, el sobrenadante obtenido se junto con el anterior y se guardó el pellet a 4° C.
- d) Los sobrenadantes acumulados se dializaron con varios cambios de agua destilada a 4° C usando membranas para diálisis de celulosa ester (CE) con un poro que solo deja pasar compuestos con un peso molecular menor o igual a 500 Da de peso molecular (Spectra/Por). El dializado obtenido fue liofilizado a -50°C.

HIDRÓLISIS DE LA PECTINA POR POLIGALACTURONASAS.

Para determinar que la Poligalacturonasa era responsable, al menos en parte, de las modificaciones que sufre la pectina durante el remojo del frijol, se ensayaron diversas fuentes de pectinas (pectina de frijol, pectina cítrica y poligalacturónico), y combinaciones de enzimas que utilizan a la pectina como sustrato (Poligalacturonasa de *Aspergillus niger* y Pectin metilesterasa de cítricos y *Aspergillus niger*).

El ensayo fue similar al descrito en la sección actividad de Poligalacturonasa.

Las diversas combinaciones de enzimas se indican en el pie de tabla donde se muestran los resultados de estos experimentos.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA

- ACTIVIDAD DE POLIGALACTURONASA A DIFERENTES VALORES DE pH

En la literatura encontramos que el pH óptimo de la enzima Poligalacturonasa es 5.5 en determinaciones realizadas en tomate, con la finalidad de determinar si en el frijol este valor es el adecuado para determinar actividad enzimática, cuantificamos esta actividad a diferentes valores de pH (4, 5.5, 6, 7 y 8). Confirmando lo reportado en la bibliografía, se observó que el pH óptimo para la determinación de Poligalacturonasa es de 5.5, siendo en este valor donde encontramos mayor actividad enzimática, por el contrario a pH 4 se observa la actividad más baja (figura 7).

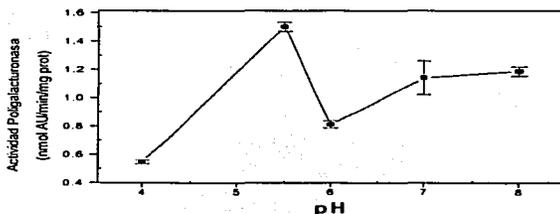


Figura 7. Efecto del pH en la actividad de Poligalacturonasa extraída de semilla de frijol remojado durante 18 h a 30° C.

- ACTIVIDAD DE POLIGALACTURONASA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO

Con la finalidad de conocer la concentración óptima de sustrato para medir actividad de Poligalacturonasa, lo que se hizo fue determinar su actividad a diferentes concentraciones de poligalacturonato (SIGMA) que es el sustrato para esta enzima. Los diferentes valores obtenidos de actividad de Poligalacturonasa se muestran en la figura 8.

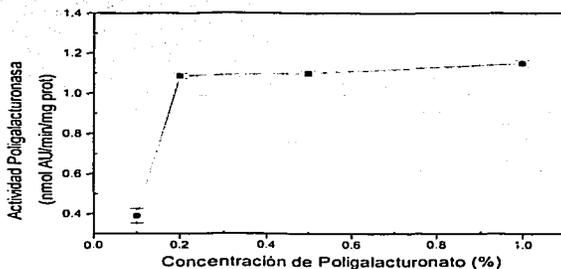


Figura 8. Actividad de Poligalacturonasa a diferentes concentraciones de poligalacturonato.

Observamos que la concentración de Poligalacturonato que satura la enzima es 0.5%, siendo en esta concentración donde se aseguró que la Poligalacturonasa alcance su actividad máxima.

De los resultados anteriores se concluyó que la actividad de Poligalacturonasa debe ensayarse a pH 5.5 y a una concentración de poligalacturonato de 0.5% para asegurar que la enzima alcance un máximo de actividad.

ACTIVIDAD DE POLIGALACTURONASA EN SEMILLAS DE FRIJOL FRESCO.

Con la finalidad de verificar la presencia de las enzimas Poligalacturonasas en frijol fresco, se determinó su actividad en extracto enzimático desalado de semillas frescas de tres diferentes variedades; Flor de Mayo, Bayo Mecentral y frijol 2626.

En los tres cultivares de frijol detectamos actividad de Poligalacturonasas, indicando que la enzima Poligalacturonasa esta presente en la pared celular del frijol fresco. La actividad específica de Poligalacturonasa fue significativamente menor en 2626 que en Flor de Mayo y similar en Flor de Mayo y Bayo Mecentral (Tabla 2).

Tabla 2. Actividad de Poligalacturonasa en semillas de frijol fresco.

Variedad	Actividad (nmol AU/min/mg proteína)
Flor de Mayo	4.076 ± 0.4 ^a
Bayo Mecentral	3.997 ± 1.3 ^a
2626	2.179 ± 1 ^b

Letras diferentes en un mismo renglón indican diferencia significativa (p ≤ 0.05)

EFFECTO DEL REMOJO EN LA ACTIVIDAD DE POLIGALACTURONASA EN SEMILLAS DE FRIJOL

Para conocer el efecto del remojo sobre la actividad de Poligalacturonasa, las semillas de frijol de las tres variedades se colocaron en agua durante 18 horas a 30° C, y los valores de actividad encontrados fueron comparados con la actividad de esta enzima presente en estos mismos cultivares pero en semillas secas. Se observó que la actividad específica de Poligalacturonasa (figura 9), se incrementó más de dos veces por efecto del remojo.

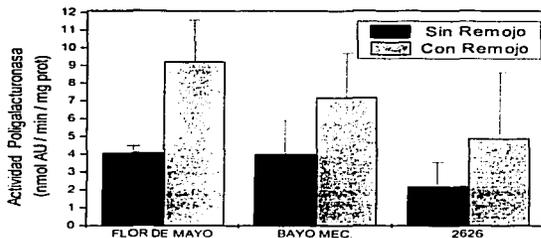


Figura 9. Efecto del remojo en la actividad de Poligalacturonasa del frijol.

EFFECTO DEL ALMACENAMIENTO SOBRE LA CALIDAD DE COCCIÓN

Para conocer el período en el que el almacenamiento bajo condiciones de alta temperatura y elevada humedad relativa producen un efecto negativo sobre la calidad

de cocción de las semillas de frijol Flor de Mayo, lo que se hizo fue determinar el tiempo de cocción de las semillas de frijol almacenadas de cada lote (10, 18 y 35 días) con y sin remojo, usando el "cocinador Martson" y se comparó con el TC₅₀ determinado en frijoles frescos secos y remojados.

Observamos que el valor TC₅₀ de las semillas de frijol aumento con el tiempo de almacenamiento en condiciones adversas, es decir, un almacenamiento inadecuado produjo una pérdida en la calidad de cocción de las semillas de frijol (Tabla 3).

Tabla 3. TC₅₀ para frijol Flor de Mayo fresco y almacenado.

TIEMPO DE ALMACENAMIENTO	TC₅₀ (minutos)	
	SIN REMOJO	CON REMOJO
0 DÍAS (FRESCOS)	126 ^{a,1}	40 ^{b,1}
10 DIAS	129 ^{a,1}	42 ^{b,1}
18 DÍAS	133 ^{a,2}	56 ^{b,2}
35 DÍAS	178 ^{a,3}	79 ^{b,3}

Letras diferentes en un mismo renglón indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$)
 Números diferentes en la columna sin remojo indican diferencias significativas ($p \leq 0.01$)
 Números diferentes en la columna con remojo indican diferencias significativas ($p \leq 0.001$)
 Almacenamiento a 30°C y 75% HR.

Los tiempos medios de cocción de frijol remojado son en todos los casos menores a los determinados en frijol seco debido a que el remojo disminuyo el tiempo de cocción tanto en semillas frescas como en semillas almacenadas. Sin embargo aún con remojo se puede observar que a partir de 18 días en almacén los frijoles se endurecen porque el TC₅₀ es significativamente mayor que a 0 días de almacenado.

EFFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN LA ACTIVIDAD DE POLIGALACTURONASA EN FRIJOL FLOR DE MAYO.

El efecto del almacenamiento en la actividad de Poligalacturonasa se ensayo en frijol Flor de Mayo, almacenado en condiciones adversas. Lo que se hizo fue determinar su actividad en frijoles almacenados, secos y remojo. Se siguió exactamente la misma metodología que para determinar actividad en semillas frescas. Los resultados se muestran en la figura 10. La actividad de Poligalacturonasa decayó a medida que transcurrió el tiempo de almacenamiento: Esta disminución se observó tanto en frijol seco como en frijol remojado. La velocidad de este decremento fue tal que en 7 días de almacenamiento la actividad de la enzima ya no fue detectable.

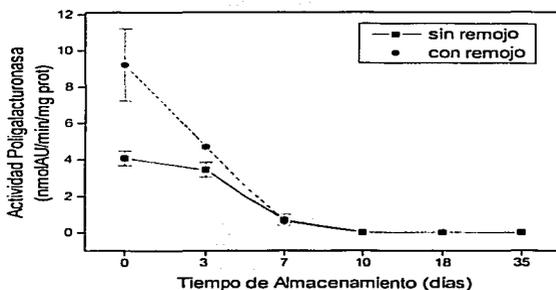


Figura 10. Efecto del almacenamiento en la actividad de Poligalacturonasa en frijol Flor de Mayo

Para descartar la posibilidad de que la actividad de la enzima Poligalacturonasa no se detectara debido a problemas durante la realización de la técnica, se repitió el ensayo enzimático con las siguientes modificaciones:

- 1) Se determinó actividad de Poligalacturonasa en frijoles secos y remojados después de 10 días de almacenamiento en las mismas condiciones.
- 2) Para eliminar la posibilidad de que la actividad se estuviera perdiendo por la presencia de contaminantes en la columna que pudieran inhibir a la Poligalacturonasa, se montó una nueva columna de Bio-Gel P10 para desalar el extracto enzimático.
- 3) Para descartar la posibilidad de que por las condiciones adversas de almacenamiento se hubiera originado un entrecruzamiento de la pectina provocando que la enzima quedará "atrapada" y requiriera de un mayor tiempo de extracción, se aumentó el tiempo de extracción. En el ensayo original, la extracción se realizó dos veces durante 30 minutos cada vez, pero en este ensayo se extrajo la enzima durante 18 horas.
- 4) Finalmente, para cerciorarnos de que no había proteólisis se adicionó un cóctel de inhibidores de proteasas al buffer de extracción. Este cóctel contenía: fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) 1.0 mM, Leupeptina (50 μ M) y Aprotinina (50 μ M).

En ninguno de los ensayos anteriores fue posible detectar actividad de Poligalacturonasa en semillas de frijol almacenado en condiciones adversas durante 10 días.

ACTIVIDAD DE POLIGALACTURONASA COMERCIAL SOBRE PECTINA AISLADA DE FRIJOL

Se ha reportado que la eficiencia con que la Poligalacturonasa hidroliza a la pectina, depende del grado de metilación del polímero (Bonnin, 2002). A su vez el grado de metilación de la pectina depende de la fuente utilizada para su aislamiento (ya sean cítricos o manzana). Por lo que antes de probar la eficiencia de la Poligalacturonasa comercial para hidrolizar la pectina de frijol, se caracterizaron los tipos de pectinasas presentes en una preparación comercial de Poligalacturonasa aislada de *Aspergillus niger* (figura 11).

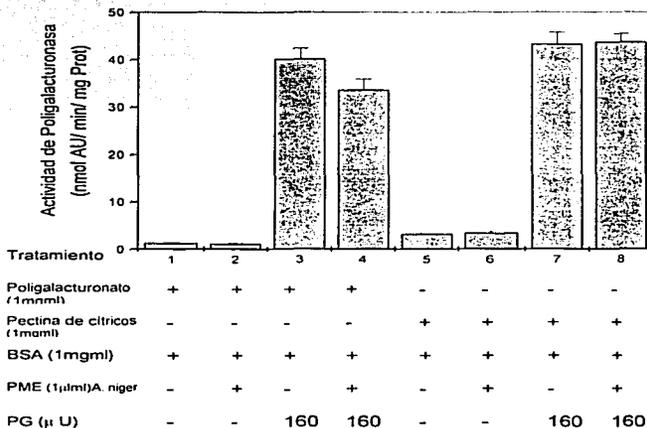


Figura 11. Caracterización de las actividades enzimáticas presentes en la preparación de Pectinasa comercial.

Dado que la preparación comercial de Poligalacturonasas utilizada era muy activa , la concentración de proteína en el ensayo era muy baja, por lo que con la finalidad de proteger la actividad de la enzima de la posible desnaturalización por efecto de la dilución en todos los ensayos se adicionó BSA (seroalbumina de bovino).

La velocidad enzimática mostrada por la preparación comercial de Poligalacturonasa fue similar cuando en el ensayo de actividad se utilizó poligalacturonico o pectina altamente metilada extraída de cítricos como sustrato. Sorprendentemente la velocidad de Poligalacturonasa no se incremento en el ensayo en el cual se utilizó como sustrato, pectina altamente metilada, y como enzimas, una mezcla de Poligalacturonasas y Pectin metilesterasa obtenida de *Aspergillus niger* (Figura 5). Por el contrario, la adición de Pectin metilesterasa de *Aspergillus niger* en el caso del poligalacturonato disminuyó ligeramente la actividad de la Poligalacturonasa (Figura 5). Donde no se adicionó la Poligalacturonasa no hubo hidrólisis de pectina (Figura 5). Lo anterior sugiere que la actividad que se esta cuantificando es debido a la Poligalacturonasa y que la preparación comercial de la enzima utilizada en este trabajo contenía Pectin metilesterasa.

Cuando la pectina extraída del frijol Flor de Mayo con CDTA se utilizó como sustrato de la Poligalacturonasa, se observó que la cantidad de ácido urónico libre era mayor cuando se incubo por tiempos cortos y mucha actividad de Poligalacturonasa que cuando se adiciono poca actividad de enzima y se dejó incubando por 18 horas (Figura 6). Por el contrario, la enzima Pectin metilesterasa de cítricos y la Pectin metilesterasa de *Aspergillus niger* no tienen efecto sobre la cantidad de ácido urónico libre. Y cuando se incubo la pectina con los dos tipos de hidrolasas (PG y PME), se observó que la

cantidad de urónicos libres fue semejante a los obtenidos por la acción de la Poligalacturonasa sola (Figura 12). Lo anterior sugiere que la pectina de frijol es sustrato de la Poligalacturonasa. Dado que la preparación comercial contenía tanto Poligalacturonasa como la Pectin metilesterasa los resultados anteriores no indican si la pectina de frijol está o no metilada.

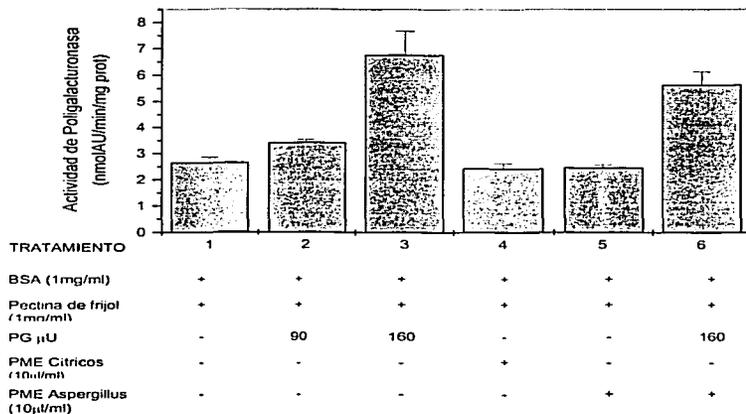


Figura 12. Actividad de Poligalacturonasa en pectina aislada de frijol Flor de Mayo.

En cada ensayo, se cuantificó el ácido libre inicial, lo que permite calcular el valor de ácido urónico liberado por acción de la Poligalacturonasa y si este valor se modifica por la acción de la Pectin metilesterasa. Los valores de ácido urónico liberados se presentan en las tablas 4, 5 y 6 para pectina de frijol, pectina comercial y poligalacturonato respectivamente.

Tabla 4. Acido Urónico liberado por acción de Poligalacturonasa comercial en diferentes sustratos.

SUSTRATO	nmol AU/min/mg proteína
Pectina comercial	40.08
Pectina de frijol	4.112
Poligalacturonato	38.92

En todos los casos se observó que la acción de Poligalacturonasa provocó un importante aumento en los ácidos urónicos libres de las pectinas y del poligalacturonato.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS EXPERIMENTALES

El tiempo de cocción de la semilla de frijol se debe principalmente a la velocidad de termosolubilización de la pectina que es el componente mayoritario de la pared celular de los cotiledones. El tiempo de cocción de esta leguminosa se ve afectado por diferentes factores, algunos de los cuales son positivos como el remojo, y otros que provocan cambios negativos en la calidad de cocción como el almacenamiento inadecuado. Ambos tipos de factores, remojo y cocción, tienen en común el favorecer la hidratación de la pared celular y por tanto proporcionar las condiciones adecuadas para que las enzimas presentes en la pared celular de las células del cotiledón se activen. Una de estas enzimas es la Poligalacturonasa que hidroliza a la pectina generando fragmentos de menor peso molecular. Esta disminución del peso molecular de las pectinas durante el remojo podría incrementar su termosolubilización durante la cocción, mientras que la acción de la Poligalacturonasa durante el almacenamiento resultaría en un incremento de la reactividad de estos polímeros debido a la exposición de un número mayor de extremos terminales. En el primer caso, la acción de la Poligalacturonasa aumentaría la calidad de cocción de la semilla pues el tiempo de cocción disminuiría. En el segundo caso la acción de esta hidrolasa resultaría negativa pues el tiempo de cocción aumentaría.

Dado lo anterior, este trabajo se realizó con el propósito de determinar si la Poligalacturonasa participaba en la modificación de la pectina, inducida por el remojo o almacenamiento inadecuado de la semilla de frijol.

Para comprobar lo anterior primero se determinó la actividad de Poligalacturonasa en semillas de frijol fresco de tres variedades, encontrando que la enzima esta presente en forma activa en la pared celular del frijol. El hecho de que la actividad de Poligalacturonasa fuera dos veces mayor en semillas remojadas que en secas indica que durante el remojo de la semilla, la enzima se activó o bien este incremento se debe a un aumento de el número de moléculas de la enzima, a través de síntesis de novo del péptido.

En otros sistemas se ha demostrado que durante la elongación celular, la actividad de Poligalacturonasa se incrementa por síntesis de novo (Cotte et al. 2002 y Atkinson et al. 1998). Dado que el remojo de la semilla induce la elongación de las célula del cotiledón, es probable que el aumento de actividad de Poligalacturonasa aquí reportado, también se deba a una síntesis de novo de la enzima. Lo anterior sugiere que la disminución del peso molecular de las pectinas inducido por el remojo (Blancas, 2001) pueda deberse a la acción de Poligalacturonasa. Si esto fuera así, la pectina aislada de frijol debería ser un sustrato adecuado para la Poligalacturonasa aislada de otra fuente. En efecto, la Poligalacturonasa de *Asperigillus niger* fue capaz de utilizar a la pectina de frijol como sustrato aunque la velocidad de hidrólisis que en este caso presento la enzima fue 10 veces menor que la que presento cuando el sustrato fue pectina altamente metilada ó poligalacturonato de sodio. Este resultado podría deberse a que la estructura y / o composición de la pectina de frijol fuese diferente a la reportada para pectina de cítricos o el poligalacturonato.

La composición del polímero aquí estudiado fue similar a la reportada para pectinas del tipo de los ramnogalacturonanos I que constituye el componente más abundante de la

pared celular primaria de las dicotiledóneas. Este tipo de polímero está constituido por una cadena principal de α -1,4 ácido galacturónico con uniones α -1,2 ramosa con ramificaciones de azúcares neutros en la posición 4 de las pentosas (Bonnin, 2002). Mientras que las pectinas de cítricos y poligalacturonato están constituidas por una cadena lineal de ácido galacturónico.

Estas diferencias en composición y estructura explicarían porque la Poligalacturonasa comercial presento menor actividad con la pectina aislada de frijol que con los sustratos ricos en homogalacturonano. En el primer caso el enlace a hidrolizar por la Poligalacturonasa podría presentar menor accesibilidad que en el segundo.

La actividad de la Poligalacturonasa disminuye desde los 7 días de almacenamiento. Esta disminución no se debió a la acción de proteasas, pues se adicionaron inhibidores de proteasas y la actividad de la Poligalacturonasa no se modificó. Tampoco parece deberse a una disminución en su extractabilidad, debido a que tiempos mayores de extracción de la enzima no modificaron el resultado. Dado que en otros sistemas se ha reportado que el aumento en la actividad de Poligalacturonasa se debe a síntesis de novo de la enzima, el resultado de que el almacenamiento disminuye la actividad de la Poligalacturonasa podría deberse a que en las semillas almacenadas el proceso de expresión de los genes de Poligalacturonasa se han dañado y además que la enzima presente en la semilla fresca se hubiese inactivado reacción de Millard, ya que la pared celular es rica en carbohidratos.

El remojo de la semilla almacenada no induce cambios en el peso molecular de la pectina; pero, el remojo también resulta un tratamiento benéfico para el frijol almacenado, ya que el tiempo de cocción del frijol almacenado remojado fue menor que

el del frijol almacenado y seco. Sin embargo en el lote de frijol endurecido no se detecto actividad de Poligalacturonasa, aún antes de que el frijol se endureciera. Estos resultados sugieren que en el efecto benéfico del remojo en el tiempo de cocción participan varios eventos , siendo uno de ellos la hidrólisis de pectinas por la Poligalacturonasa.

En conjunto, los resultados anteriores muestran que la pectina de frijol puede ser modificada por la Poligalacturonasa y que muy probablemente durante el remojo de la semilla, la Poligalacturonasa de la pared celular hidroliza a las pectinas *in muro*, incrementando su termosolubilización, lo que se refleja en una disminución en el tiempo de cocción del frijol. Lo anterior parece constituir la base molecular que explicaría parcialmente el efecto beneficio del remojo en la calidad de cocción.

Para demostrar de manera definitiva que la Poligalacturonasa constituye uno de los factores que contribuyen al efecto benéfico del remojo en el tiempo de cocción se requiere contar con semillas de frijol que no presenten actividad de Poligalacturonasa y que por tanto al ser remojados el peso molecular de las pectinas no se modifique y el tiempo de cocción podría o no disminuir.

En el caso de frijol endurecido, la Poligalacturonasa no parece estar participando en el efecto negativo del almacenamiento en la calidad de cocción ya que la actividad de la enzima disminuye hasta niveles no detectables en el frijol que se ha almacenado pero la semilla aún no se ha endurecido. Lo anterior indica que durante el almacenamiento del frijol la pectina no es modificada *in muro* por la Poligalacturonasa presente en la semilla seca.

La evidencia que apoya esta última propuesta la constituye el hecho de que si bien el remojo de las semillas endurecidas disminuye el tiempo de cocción, los valores de tiempo de cocción alcanzados en estos lotes son mayores que los que presentan las semillas control remojadas en las que está presente la Poligalacturonasa y donde el peso molecular de las pectinas se reduce durante este tratamiento.

CONCLUSIONES

- ✓ El remojo favorece la calidad de cocción aún en frijoles almacenados bajo condiciones adversas.
- ✓ La enzima Poligalacturonasa esta presente de forma activa en la pared celular de semillas de frijol frescas.
- ✓ La Poligalacturonasa incrementa más del doble su actividad durante el remojo de las semillas.
- ✓ La actividad de Poligalacturonasa se pierde después de 10 días de almacenamiento inadecuado.
- ✓ El remojo pierde su efecto favorable de aumentar la actividad de Poligalacturonasa como consecuencia del almacenamiento inadecuado.

Por las conclusiones anteriores podemos decir que los niveles de actividad de Poligalacturonasa están asociados a la calidad de cocción de las semillas de frijol, y para preservar esta calidad, es necesario almacenar el frijol bajo condiciones adecuadas de temperatura (4°C) y humedad relativa baja. Por otro lado, recomendamos remojar el frijol antes de cocinarlo para favorecer considerablemente su calidad de cocción.

BIBLIOGRAFÍA

1. Academic Press, International union of biochemistry. 1979 Enzyme Nomenclature.
2. Aguilera, J. M. y Ballivián, A. 1987 A Kinetic interpretation of textural changes in a black beans during prolonged storage. *J. Food Sci.*, 52: 691-718.
3. Atkinson, R. G., Bolitho, K. M., Wright, M. A., Iturriagagoltía-Bueno, T., Reid, S. J., Ross, G. S. 1988 Apple ACC-oxidase and polygalacturonase: ripening-specific gene expression and promoter analysis in transgenic tomato. *Plant Molecular Biology*. 38(3): 449-460.
4. Badui, D.S. Diccionario de Tecnología de los Alimentos. Alhambra Mexicana, México D.F. Pág. 33, 192, 1192.
5. Blancas, V. H. 2002 Estudio de las modificaciones en la pectina que ocurren durante el remojo de las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F. Pág.. 19, 24 -27, 34, 39-40.
6. Bourne, M. C. 1972. texture measurement of individual cooked dry beans by puncture test. *J. Food Sci.* 37:751.
7. Burr, H. K., Kon, S. y Morris, H. J. 1968. Cooking rates of dry beans as influenced by moisture content and temperature end time of storage. *Food Techno.* 22:336.
8. Chang, R., Schwimmer, S., y Burr, H. K. 1977. Phytate removan from whole dry beans by enzymatic hydrolysis and diffusion. *J. Food Sci.* 42:1098

9. Dos Santos, R. G. y Bourene, M. C. 1985. Effect of storage conditions of dry beans seeds (*Phaseolus vulgaris* L.) on texture profile parameters after cooking. *J. Food Sci.* 50: (4):1067-1071.
10. Duke, J.A., 1981 Handbook of legumes of world economic importance. Plenum Press, New York, 345 pp.
11. Ebbelar, E.M. 1996 Characterization of pectinases and pectin methylesterase cDNAs in pods of green beans (*Phaseolus vulgaris*), *Plant Molecular Biology*, 31 : 1141-1151.
12. Garcia, E., Tullia, M. C., Fillsetti, C., Udaeta, E. y Lajolo F. M. 1998 Hard-To-Cook Beans (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of Phenolic Compounds and Pectates *J. Agric. Food Chem.*, 46 (6), 2110 -2116.
13. Graham, P.H., Ranalli, P. 1997 Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Field Crops* 53 :131 –146.
14. Gross, K. C. 1982 A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying poligalacturonase using 2-cyanocetamide. *Hort Science*. 17(6):933-934.
15. Hentges, D.L., Weaver, W. M., y Nielsen, S. S. 1991 Changes of selected physical and chemical components in the development of the hard-to-cook bean defect. *J. Food Sci.*, 56 : 436.
16. Hincks, M. J. y Stanley, D. W. 1986 Multiple mechanism of bean hardening. *J. Food Sci.*, 21: 731.
17. Jarvis, M. C., Forsyth, W. y Duncan, H. C. 1988 A survey of the pectin content of nonlignified monocot cell walls. *Plant Physiol.* 88: 309 – 314.

18. Jones, P. M. B. y Boulter, D. The cause of reduced cooking rate in *Phaseolus vulgaris* following adverse storage conditions. *J. Food Sci.*, 48: 623 – 649.
19. Kertesz, Z. I. 1951 Pectic enzymes in the pectic substances. Ed., Interscience, New York, 353.
20. Keshun, L. 1995. Cellular, Biological, and physicochemical basis for Hard-To-Cook defect in legume Seeds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(4):263-298
21. Keshun, L. y McWatters, K. H. 1994. Effects of storage, soaking and cooking method on cookability of cowpeas. *Research Notes Technol.* 27: 95- 97.
22. Keshun, L. Phillips D. R., McWatters H. 1993. Mechanism of pectin changes during sg and heating as related to Hard-To-Cook defect in Cowpeas. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1476 – 1480
23. Kon, S. 1980. effect of soaking temperature on cooking and nutritional quality of beans. *J. Food Sci.* 44:1229.
24. Martín-Cabrejas, M. A., Jaime, L., Karanja, C., Downie, A. J., Parker, M. L., Lopez-Andreu, J. Maina, G., Esteban, R. M. Smith, A. S. y Waldron, K. W. 1999 Modifications to Physicochemical and Nutritional Properties of Hard-To-Cook Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by Extrusion Cooking *J. Agric. Food Chem.*, 47 (3), 1174 –1182.
25. Martson, S. 1946. The cookability of yellow peas: a colloid-chemical and biological study. *Acta Agriculturae Suecana*, 2, 185-231.

26. Molina, M. R., De la Fuente, G. y Bressani, R. 1975. Interrelationships between storage, soakg time, cooking time, nutritive value and other characteristics of the black bean. *J. Food Sci.* 40:587.
27. Morris, H. J. 1963. Cooking qualities of dry beans. 6th Annual dry bean conference, Los Angeles, USA.
28. Moscoso W., Bourne M.C., and Hood L. F. 1984 Relationship between the hard-to-cook phenomenon in Red Kidney beans and water absorption, puncture force, pectin phytic acid, and minerals. *J. of Food Sci.* 49: 1577-1583.
29. Palma-Tirado, M. L., Reyes-Moreno, C., Carabez-TRejo, A., Montes-Rivera, R., Paredes-Lopez, O. 1992. Hardening and softening phenomena in beans: Technological alternatives. *Arch. Latinoam. Nutr.*
30. Reyes-Moreno, C., Paredes-Lopez, O. 1993. Hard-to-cook phenomenon in common beans – A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 33(3):227-286.
31. Rockland, L. B. y Jones, F. T. 1974. Scanning electron microscope studies of dry beans. Effects of cooking on the cellular structure of cotyledons in dehydrated large lima beans. *J. Food Sci.* 39:342.
32. Sefa-Dedeh, S., Stanley, D. W., Voisey, P. W. 1979. Effect of storage time and conditions on the hard-to-cook defect in cowpeas (*Vigna unguiculata*). *J. Food Sci.* 44: 790.
33. Silva, C. A. B., Bates, R. P. y Deng, J. C. 1981. Influence of soaking and upon the softening and eating quality of black beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food. Sci.*, 46 (3) 716-720.

34. Singh, U. y Rao, P. V. 1995. Quick-cooking DHAL of pigeonpea as influenced by salt solution and enzyme ts. J. of Food Sci. Technol.
35. Singh, U., Erskine, W., Robertson, L. D., nakkoul, H. y Williams, P. C. 1988. Influence of pretreatment on cooking quality parameters of dry food legumes. J. Food Sci. and Agric., 44, 135-142.
36. Stanley, D.W. Sefa, S. y Voisey P.W. 1978 Effects of soaking time and cooking conditions on texture and microstructure of cowpeas (*Vigna unguiculata*). J. Food Science, 43: 1832 – 1838.
37. Taiwo, K. A., Akanbi, C. y Ajibola, O. O. 1996. The effects of soaking and cooking time on the cooking properties of two cowpea varieties. J. of Food Enging. 33:337-346.
38. Varriano-Marston, E. y Jackson, G. M. 1981. Hard-to-cook phenomenon in beans. Structural changes during storage and inhibition. J. Food Sci. 46: 1379.
39. Vindiola, O. L., Seib, O. A. y Hoseney, R. C. 1986. Accelerated development of a hasrd-to-cook state in beans. Cereal Foods World. 31 (8), 538-552.
40. Whitaker., J. 1972 Principles of enzymology for the food science. Pág: 441 –442, 472 –475.
41. Wong, G. 1986 Quí mica de los Alimentos mecanismos y teoría. Acribia, Zaragoza España, Pág.: 248-251.