

2ej
920



*Universidad Nacional Autónoma
de México*

FACULTAD DE CIENCIAS

Aspectos Bioquímicos del
Endurecimiento del Frijol

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

Licenciatura en Biología

P R E S E N T A :

GLORIA GUTIERREZ VENEGAS

México, D. F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

	PAG.
RESUMEN	1
1 INTRODUCCION	2
1.2 ANTECEDENTES	6
1.2.1 Estructura del grano de frijol	6
1.2.2 El almacenamiento del grano de frijol y su relación con el endurecimiento	8
1.2.3 Aspectos citológicos del frijol durante la cocción y el endurecimiento	9
1.2.4 Aspectos intercelulares de la cocción y el endurecimiento del grano de frijol	11
1.3 HIPOTESIS	11
1.4 OBJETIVOS	12
2. MATERIAL	
2.1 Material Biológico	13
2.2 Reactivos	13
2.3 Material Instrumental	14

2.4 METODOLOGIA

2.1	Deterioro del frijol	15
2.2	Determinación del Contenido de Humedad	15
2.3	Determinación del Tiempo de Cocción	16
2.4	Determinación de Micoflora	16
2.5	Cinética de imbibición de la semilla.....	17
2.6	Aislamiento de cuerpos proteicos	17
2.7	Identificación de cuerpos proteicos	18
2.8	Fraccionamiento de la proteína de cotiledón .	18
2.9	Cuantificación de la proteína de cotiledón de frijol	24
2.10	Caracterización de la proteína de frijol	29
2.11	Aislamiento y determinación de fitina ...	29

3. RESULTADOS

3.1	Obtención de material biológico	34
3.2	Valoración del grado de dureza	34
3.3	Cinética de imbibición	36
3.4	Aislamiento y cuantificación de cuerpos proteicos	38
3.5	Fraccionamiento y Caracterización de la pro- teína de cotiledón y de los cuerpos proteicos	41
3.6	Determinación de fitina	48

4. DISCUSIONES

50

5. CONCLUSIONES

53

6. BIBLIOGRAFIA

54

CONTENIDO DE TABLAS Y FIGURAS

- TABLA 2.1 EFECTO DEL pH Y LA CONCENTRACION IONICA EN LA CANTIDAD DE PROTEINA EXTRAIDA DEL COTILEDON DE FRIJOL.
- TABLA 3.1 EFECTO DEL PERIODO DE ALMACENAMIENTO EN EL TIEMPO DE COCCION Y EL GRADO DE DUREZA DEL GRANO DE FRIJOL.
- TABLA 3.2 DENSIDAD Y PORCENTAJE DE SACAROSA DE LAS BANDAS OBTENIDAS DURANTE LA PURIFICACION DE LOS CUERPOS PROTEICOS AISLADOS DE FRIJOL ALMACENADO POR DIFERENTE PERIODO DE TIEMPO.
- TABLA 3.3 EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN LA CANTIDAD DE CUERPOS PROTEICOS AISLADOS DE COTILEDON DE FRIJOL.
- TABLA 3.4 EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN EL CONTENIDO DE ALBUMINAS Y GLOBULINAS DE LOS CUERPOS PROTEICOS AISLADOS DE COTILEDON DE FRIJOL.
- TABLA 3.5 EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN LA PROPORCION DE LOS COMPONENTES PROTEICOS DEL COTILEDON.
- TABLA 3.6 CUANTIFICACION DE FITINA DE COTILEDON DE FRIJOL DE DIFERENTE GRADO DE DUREZA.
-
- FIGURA 1.1 MANEJO POSTCOSECHA DEL GRANO DESDE EL PRODUCTOR AL CONSUMIDOR.
- FIGURA 1.2 CORTE LONGITUDINAL DEL GRANO DE FRIJOL EN DONDE SE MUESTRAN ALGUNAS PARTES DE SU ANATOMIA.
- FIGURA 2.1 DIAGRAMA DE LA METODOLOGIA EMPLEADA EN EL AISLAMIENTO DE LOS CUERPOS PROTEICOS DEL FRIJOL.
- FIGURA 2.2 DISTRIBUCION DE LOS CUERPOS PROTEICOS EN GRADIENTE DE SACAROSA.
- FIGURA 2.3 MICROGRAFIA DEL MATERIAL PRESENTE EN LAS DIVERSAS FRACCIONES GENERADAS DURANTE LA OBTENCION Y PURIFICACION DE LOS CUERPOS PROTEICOS.
- FIGURA 2.4 REPRESENTACION DIAGRAMATICA DE LA METODOLOGIA UTILIZADA EN EL FRACCIONAMIENTO DE LAS PROTEINAS DEL COTILEDON DE FRIJOL.
- FIGURA 2.5 CURVA PATRON DE SUERO ALBUMINA DE BOVINO POR EL METODO DE LOWRY.

- FIGURA 2.6 CURVA PATRON DE SUERO ALBUMINA DE BOVINO FOR EL METODO DE PETERSON.
- FIGURA 2.7 CALIBRACION DE GELES DE ACRILAMIDA AL 10% CON PROTEINAS DE PESO MOLECULAR CONOCIDO.
- FIGURA 2.8 CALIBRACION DE GELES DE ACRILAMIDA AL 15% CON PROTEINAS DE PESO MOLECULAR CONOCIDO.
- FIGURA 2.9 CURVA PATRON DE FITINA CON ACIDO FITICO.
- FIGURA 3.1 CINETICA DE IMBIBICION A 26 C EN FRIJOL FOR DIFERENTES PERIODOS DE TIEMPO.
- FIGURA 3.2 CUERPOS PROTEICOS DE FRIJOL DE DIFERENTE CALIDAD GEL DE ACRILAMIDA-SDS, AL 15 %.
- FIGURA 3.3 PATRON DE ALBUMINAS DE COTILEDON DE FRIJOL EN -- GEL DE ACRILAMIDA-SDS, AL 10%.
- FIGURA 3.4 PORCENTAJE DE LA PROTEINA EN COTILEDON DE FRIJOL DE DIFERENTE CALIDAD.

RESUMEN

El frijol almacenado en condiciones de alta humedad y temperatura se deteriora, este deterioro se conoce como endurecimiento y se manifiesta por la dificultad del grano para suavizarse durante el proceso de la cocción.

Los procesos bioquímicos responsables del endurecimiento del frijol no han sido dilucidados, sin embargo, por técnicas microscópicas se ha observado que el grado de granulación del citoplasma en las células del cotiledón de frijol, duro, es menor, que el observado en las del control (34). Se encontró que la granulación en el citoplasma de estas células se debe a su gran contenido de cuerpos proteicos, los resultados antes mencionados sugieren que durante el fenómeno de endurecimiento, los cuerpos proteicos se modifican en la calidad o en cantidad.

Este trabajo tiene como objetivos determinar los cambios cualitativos y cuantitativos de los cuerpos proteicos durante el endurecimiento del frijol. Se utilizó frijol Phaseolus vulgaris de la variedad Ojo de Cabra, almacenado en 75 % de humedad relativa y 41 °C, por diferentes períodos de tiempo. El grado de endurecimiento se valoró mediante pruebas de cocción, se encontró que a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento, el tiempo requerido para la cocción del grano también se incrementa. Este aumento no se debe a diferencias en la capacidad de captación de agua ya que esta fue similar en todas las muestras estudiadas. La cantidad de cuerpos proteicos aislados de cotiledón de frijol, mediante un gradiente de sacarosa, disminuye a medida que aumenta el grado de endurecimiento. En cuanto a los componentes de estos cuerpos proteicos aislados se encontró que el contenido de fitina disminuye a medida que el frijol se endurece mientras que el de la proteína permanece constante. Sin embargo las propiedades de solubilidad de estas varía en forma tal que a medida que el frijol se endurece la fracción de globulinas disminuye. Estos resultados muestran que a medida que el frijol se endurece el contenido de cuerpos proteicos se modifica cuantitativamente y cualitativamente, lo que nos sugiere que durante el almacenamiento los componentes del cuerpo proteico se modifican participando en el cambio de textura del frijol que ocurre durante la Cocción.

I N I R O D U C C I O N

Los vegetales son el recurso alimenticio más importante del mundo y constituyen el 81.8 % del total de alimentos consumidos por el hombre, mientras que los productos animales y marinos contribuyen solamente en el 16.6 % (FAO 1977). Se estima que el promedio de producción de los recursos proteicos de vegetales consumidos anualmente por el hombre es de 196.8 millones de toneladas comparados con los 49.1 millones de toneladas de la proteína animal. Entre los recursos vegetales ricos en proteínas se encuentra la familia de las leguminosas, la cual comprende una amplia variedad de especies que incluyen desde árboles grandes como son el tamarindo y la acacia, hasta plantas pequeñas como el trébol. La característica principal de las leguminosas es que su fruto se presenta en forma de vaina o legumbre la cual es membranosa y en sus márgenes van adheridas las semillas. En la actualidad y desde hace aproximadamente 800 años se ha cultivado un gran número de leguminosas tales como: alfalfa, soya, chícharo, frijol soya y frijol ejotero. De las anteriormente mencionadas las más importantes para el consumo humano en América Latina son: el frijol y el chícharo. El frijol *Phaseolus vulgaris* se cultiva principalmente con el fin de cosechar semilla seca, ésta provee del 20 al 50 % de la proteína de las poblaciones rurales. La proteína del frijol presenta un alto contenido de lisina que junto con la proteína de los cereales constituye un buen complemento alimenticio. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, el consumo en calorías de las poblaciones rurales es de solo el 43.3 % de los requerimientos normales es decir que solo ingieren 1,529 calorías de las cuales un 56.6 % provienen del maíz y el 17.1 % del frijol y solo el 10.3 % de grasas y aceites. El frijol y el maíz en conjunto aportan el 73.6% de las calorías consumidas.

En los grupos urbanos marginados el 84.5% de las calorías consumidas proviene exclusivamente del maíz y el frijol. Los principales estados productores de frijol de la República mexicana son los siguientes: Zacatecas, Durango, Jalisco, Nayarit, Sinaloa, Chihuahua, Veracruz, Guanajuato, San Luis Potosí y Chiapas.

Una vez que la cosecha se ha realizado el grano pasa a través de una serie de procesos antes de llegar al consumidor, esta cadena de eventos se conoce como manejo Post-cosecha (Fig. 1.1). El manejo inadecuado del grano durante cada uno de estos estadios puede provocar pérdidas en cantidad y calidad del producto agrícola. La cuantía de las pérdidas en cada fase es variable, siendo la de almacenamiento la fase donde se realizan las pérdidas más importantes.

Dadas las condiciones climatológicas de nuestro país durante el almacenamiento el grano está expuesto a factores físicos adversos como son la humedad y temperatura altas lo que provoca la pérdida de calidad del grano que en el caso particular del frijol se conoce como el endurecimiento del frijol.

Este fenómeno se caracteriza por la dificultad que presenta el grano a la suavización durante su cocción además de que en algunas condiciones adquiere sabor y olor desagradables. Estas características del frijol endurecido hacen que sea rechazado tanto por el consumidor, como por el industrial.

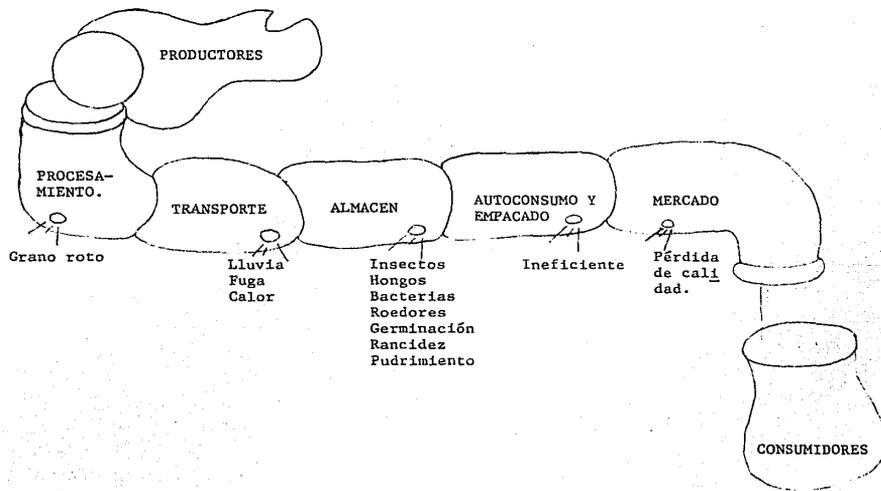


Fig. 1.1 MANEJO POSTCOSECHA DEL GRANO DESDE EL PRODUCTOR AL CONSUMIDOR
 (Tomado de Post-Harvest Biotechnology of Fruits Vol. 1-C.R.C.
 Press 1984).

Causas que producen pérdidas en cada fase.

La pérdida de la calidad del frijol durante el almacenamiento por un lado disminuye la cantidad de grano disponible para la alimentación y por otro representa pérdidas económicas para el productor, para el industrial y para el ama de casa que requiere de más consumo de energía para la cocción del grano.

A N T E C E D E N T E S

1.2.1 ESTRUCTURA DEL GRANO DE FRIJOL

La legumbre , es el fruto característico de las leguminosas el cual se abre por la sutura ventral y por el nervio dorsal. La semilla es el óvulo maduro, contiene al embrión, que constituye la parte esencial de la semilla y el rudimento de la planta futura, está integrado por un pequeño eje con los ápices radicular, plumular u hojas embrionarias. Los cotiledones almacenan los nutrientes los cuales mantienen el desarrollo del embrión hasta que adquiera capacidad para efectuar fotosíntesis.

El embrión y los cotiledones se encuentran cubiertos por un intertegumento o testa que esta destinado a proteger a la semilla.

Al observar el grano de frente se localizan unas estructuras en la porción superior como sutura que recibe el nombre de rafe cuya función es unir el óvulo o frijol a la legumbre.

En la porción inferior se encuentra el micrópilo, esta estructura es una abertura o poro que tiene como función unir la testa con los tegumentos de los cotiledones. (Fig. 1.2)

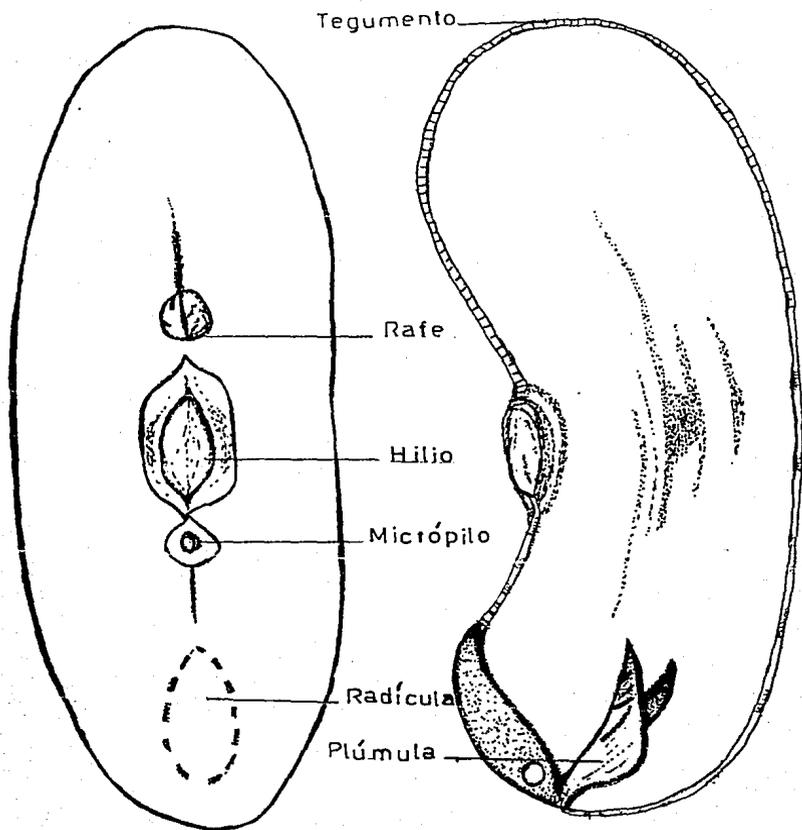


FIG. 1.2 CORTE LONGITUDINAL DE GRANO DE FRIJOL EN DONDE SE MUESTRAN ALGUNAS PARTES DE SU ANATOMIA.

1.2.2 EL ALMACENAMIENTO DEL GRANO DE FRIJOL Y SU RELACION CON EL ENDURECIMIENTO

Durante su almacenamiento el frijol se endurece, este cambio en la calidad del grano se pone de manifiesto al ser sometido al proceso de cocción. El frijol se clasifica como frijol duro cuando el tiempo de cocción que requiere para su suavización es significativamente mayor que el de un frijol normal. El fenómeno del endurecimiento del frijol comprende dos categorías que son: Semillas duras (Hard shell) (6) y granos difíciles de cocer (Hard to cook) (14).

Las semillas duras son aquellas que presentan problemas para imbibir agua, este problema se ha relacionado con la impermeabilidad de la testa. Por otra parte los granos difíciles de cocer son aquellos que no presentan problemas de imbibición pero que requieren de un mayor tiempo para la cocción.

Los factores que se han relacionado con el endurecimiento del frijol durante el almacenamiento son: Humedad, temperatura y tiempo de almacenamiento; estos tres parámetros son interdependientes según las condiciones del grano y regularmente de la variedad a utilizar. (2,8,14,16,21,28,33) El frijol con un contenido de humedad entre 13 y 18 % requiere de tiempos de almacenamiento mayores de 6 meses para endurecerse siempre y cuando la temperatura del almacén sea menor de 30 °C. (2).

Sin embargo, el frijol expuesto a 100 % de humedad relativa y 41 ° C solo requiere de 14 días de almacenamiento para aumentar su tiempo de cocción. (14)

La velocidad y el grado de endurecimiento se deben principalmente a las condiciones de temperatura y humedad bajo las cuales se almacena el grano.

También se han hecho estudios con la finalidad de definir condiciones de almacenamiento que minimizen el fenómeno de endurecimiento del frijol durante el almacenamiento.

Recientemente se ha reportado (2) que el frijol con 13 % de contenido de humedad no se endurece si la temperatura es de -12 ° C aún cuando haya sido almacenado por 2 años.

Experimentos similares muestran que en atmósfera de dióxido de carbono la temperatura requerida para evitar el endurecimiento es de 4 ° C, aún cuando el grano presente contenidos de humedad como 10 %. (8)

1.1.3 ASPECTOS CITOLÓGICOS DEL FRIJOL DURANTE LA COCCIÓN Y ENDURECIMIENTO

Durante la cocción del frijol las características que conducen al reblandecimiento y la adquisición de sabor agradable para su consumo como alimento va acompañada de cambios en la textura del grano.

Estos cambios en textura son consecuencia de cambios estructurales en las células del cotiledón durante el proceso de cocción (34). Micrografías electrónicas de barrido muestran que cuando el cotiledón de frijol fresco (no húmedo) se

fractura; las paredes celulares están fragmentadas, a diferencia del frijol cocido donde las células del cotiledón se separan rápidamente a lo largo de las superficies individuales (9,26,34). Las micrografías también muestran que la matriz intercelular de la lamela media ha disminuido (16). Estos resultados demuestran que durante el proceso de cocción las células del cotiledón pierden rigidez lo que resulta en la suavización del grano.

Dado que el proceso de cocción del frijol involucra cambios estructurales de sus componentes celulares los estudiosos del campo han sugerido que durante el proceso de endurecimiento el grano sufre modificaciones que le impiden o retardan el establecimiento de los cambios estructurales responsables de la cocción del grano, lo que trae como consecuencia un aumento en el tiempo de cocción para su suavización. Una forma de comprobar esta hipótesis es comparando la estructura del grano de frijol con la que presenta después de haber sido sometido al proceso de endurecimiento.

Para comprobar esta sugerencia se han estudiado los cambios ultraestructurales inducidos en el cotiledón del frijol después de haber sido sometido al proceso de endurecimiento. En estos trabajos se ha demostrado que en las células del cotiledón de frijol almacenado en condiciones adversas el citoplasma y el plasmalema se encuentran retraídas de la pared celular (26,34) mientras que en el no endurecido las dos primeras se encuentran en íntimo contacto con la pared celular. También se ha demostrado que la estructura granular observada en frijol fresco disminuye notablemente durante el almacenamiento. (14,26,34)

1.2.4 ASPECTOS INTERCELULARES DE LA COCCION Y EL ENDURECIMIENTO DEL GRANO DE FRIJOL.

Además de los cambios estructurales observados en la célula del cotiledón descritos en la sección anterior la cocción y el fenómeno del endurecimiento del frijol también involucran cambios cualitativos y cuantitativos de sus componentes (9). Por ejemplo se ha descrito que el contenido de pectinas y de iones divalentes de la pared celular del cotiledón de un grano de frijol cocido es menor que el que presenta antes de ser sometido a este proceso (9,16). También se ha descrito que el frijol endurecido presenta mayor contenido de pectinas insolubles y de iones divalentes en la pared celular que el frijol control; otro parámetro que sufre alteraciones durante el proceso de endurecimiento es el grado de metilación de las pectinas siendo menor para el frijol endurecido que para el control. (16)

HIPOTESIS:

De la evidencia experimental descrita en la sección anterior se concluye que el cambio en la textura del grano de frijol durante la cocción se debe a la solubilización del cemento intercelular.

El cemento intercelular o lamela media esta constituida por polisacáridos de los cuales el mas abundante es la pectina que se encuentra asociada a iones divalentes (Ca^{++} y Mg^{++}), esta interacción hace insoluble a la lamela media (16,34) sugiriendo que durante el proceso de cocción los iones

abandonan la estructura permitiendo su solubilización (16, 26, 34).

El tiempo que requiere el grano para suavizarse durante el proceso de cocción se ha interpretado en este trabajo como índice de la facilidad con que la movilización iónica antes planteada se realiza indicando que en frijol endurecido la velocidad de movilización es menor que en el control. Esta disminución podría deberse a que los componentes que en ella participan se han dañado.

El cotiledón es un órgano de almacenamiento sus células son ricas en proteínas de reserva y fitina, dadas las características de estas últimas es posible que sean ellas las responsables de quelar dichos iones y que durante el endurecimiento estas sean las que sufran alteraciones.

Para ello se postuló la siguiente hipótesis:

Si la proteína de reserva y la fitina se modifican durante el proceso de endurecimiento entonces la capacidad para efectuar la movilidad iónica que acompaña al proceso de cocción estará disminuida y por tanto requerirá de mayor tiempo para su suavización.

OBJETIVOS

1. AISLAMIENTO , CARACTERIZACION Y PURIFICACION DE CUERPOS PROTEICOS DE FRIJOL DE DIFERENTE GRADO DE DUREZA.
2. DETERMINAR LOS CONTENIDO DE PROTEINA Y FITINA EN FRIJOL DE DIFERENTE GRADO DE DUREZA.

2. MATERIAL Y METODOLOGIA

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO:

Para el estudio del endurecimiento del frijol Phaseolus vulgaris se utilizó la variedad Ojo de Cabra proporcionada por la Compañía Nacional de Subsistencias Populares (CONASUPO).

2.2 REACTIVOS:

Para la realización de este trabajo se utilizaron los reactivos de las siguientes casas comerciales:

BAKER-ANALYZED:

Acido clorhídrico, Acido acético, Acido fosfórico, Acido tioglilcólico ó Acido mercaptoacético, Acido tricloroacético, Cloruro de sodio, Etanol, Glicerol, Metanol, Sulfato de sodio.

MERCK:

Acrilamida, Azul de bromofenol, Azul de coomasie, 2'2
Bipiridina, Bisacrilamida, Carbonato de sodio, Cloruro

Férrico, Folin-Ciocalteus, Glicina, Lauril sulfato de sodio, 2-mercaptoetanol, Persulfato de amonio, Sacarosa, Sulfato de cobre pentahidratado, Sulfato de fierro amonio, N,N,N',N'-Tetrametilendiamina o TEMED, Tris (hidroximetil).

QUIMICA-JVC:

Citrato de sodio, Hidróxido de sodio, Tartrato de sodio-potasio.

SIGMA:

Acido ftico o inositol hexafosfórico de sodio, Suero albúmina de bovino, Albúmina de huevo, Gliceladehido 3-fosfato deshidrogenasa, Anhidrasa carbónica, Lactoalbúmina.

2.3 MATERIAL INSTRUMENTAL:

Centrifuga Beckman modelo j2-21. Rotor jA-20.
Ultracentrifuga Beckman modelo L-50. Rotor 3W-27
Espectrofotómetro UV/Vis. Pye Unicam modelo SP[^]-550.
Homogenizador Politron Kinametica GMBH.
Equipo de Electroforesis BIO-RAD modelo 220. Fuente de poder para la electroforesis ISCO modelo 490.
Microscopio de Luz ZEISS.

2.4. METODOLOGIA

2.4.1. DETERIORO DE FRIJOL.

La semilla se seleccionó según el análisis de calidad de CONASUPO consistente en agrupar semillas sin daños físicos aparentes, de un tamaño semejante y de la misma coloración. Se colocaron 1,000 semillas para cada tiempo de muestreo en charolas de plástico con perforaciones, estas se introdujeron en una cámara de deterioro (caja de plástico 35 x 25.5 x 13.5 cms.), conteniendo una solución saturada de cloruro de sodio (comercial), para mantener una humedad relativa de 75 %, (36) la cámara se colocó en un horno de circulación forzada a 41 C. Las muestras se almacenaron durante 7, 14, 21 y 30 días. A los tiempos indicados una caja se retiró del horno y se tomó una muestra para determinar el contenido de humedad y el resto del lote se seca durante 5 hrs. a 60 °C.

2.4.2 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE HUMEDAD:

Para determinar el contenido de humedad de la semilla se utilizó el método de secado en estufa, según el Departamento de Agricultura de EUA (USDA 1979), el cual consistió en pesar 5 gr. de grano que se colocan en cajas de metal las cuales se meten a una estufa con circularción forzada de aire a 103 °C. por 72 horas.

El contenido de humedad se calculó por diferencia de peso y se expresó con base al peso húmedo de la semilla. Utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Contenido de humedad} = \frac{A}{B} \times 100$$

donde: A= peso seco de la muestra
B= peso húmedo de la muestra.

Los contenidos de humedad de los granos se expresan como el promedio de 4 repeticiones.

2.1.3 DETERMINACION DEL TIEMPO DE COCCION.

Para la determinación del tiempo de cocción se colocan 450 semillas en una olla de peltre con 2 litros de agua bidestilada hirviendo; durante el tiempo que dura la prueba el volumen se mantiene constante añadiendo agua hirviendo. Cada media hora se sacan 50 granos y se presionan entre los dedos índice y pulgar; se considera que la muestra está cocida si 45 de ellos o sea el 90% ceden a la presión de los dedos y no presentan grumos. Este procedimiento se efectúa cada media hora hasta que se ha cocido la muestra o hasta sacar el último lote de granos lo que equivale a 5 horas y media, después de este tiempo se considera a la muestra como no cocida. Este método se usa en el Laboratorio de Control de Calidad de la Compañía Nacional de Subsistencias Populares (CONASUPO).

2.4.4 DETERMINACION DE MICROFLORA

Para determinar el porcentaje de semillas invadidas por hongos se utilizaron lotes de 100 semillas en cada uno de los tiempos de muestreo, las cuales se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 2% durante un minuto y se sembraron en un medio selectivo para hongos de almacén MSA (2% de Malta, 6% de Sal y 2% de Agar), se incubaron a 26°C durante 7 días hasta que los hongos pudieron ser identificados.

El contenido de hongos de una variedad fue expresada como porcentaje del número total de granos contaminados. Cada determinación se hizo con 4 repeticiones.

2.4.5 Cinética de Imbibición de la Semilla

Las semillas de frijol se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. con 50 ml. de solución cloralex al 20 %, se agitó durante 5 min. y se enjuagó por 3 ocasiones con agua bidestilada estéril para eliminar los residuos del blanqueador, 25 semillas superficialmente esterilizadas se colocaron en cajas de Petri estériles, que contenían dos discos de papel filtro Wathman # 1 con 5 ml. de agua bidestilada estéril, las cajas de Petri se pusieron a incubar a 26° C durante diferentes periodos. A los tiempos indicados en las figuras correspondientes, los frijoles se secan superficialmente con papel filtro y se calcula su grado de hidratación con la siguiente ecuación:

$$\text{Ganancia de agua} = A - B$$

donde: A = peso inicial.

B = peso húmedo.

Los datos obtenidos se expresan como el promedio de 3 repeticiones, independientes.

2.4.6 AISLAMIENTO DE CUERPOS PROTEICOS

Los frijoles se cortaron en forma transversal separándose el embrión de los cotiledones estos se molieron hasta harina fina. Un gramo de la harina se homogenizó a 4 °C. en glicerol al 80% (v/v) en amortiguador de citrato fostato 25mM pH 5. Se

centrifugó a baja velocidad, 200 g.. El sobrenadante se colocó en tubos que contenían glicerol 90% (v/v) en amortiguador de citrato-fosfato 25 mM pH 5 y se centrifugó a 24 000 g. durante 45 min. (12).

La pastilla que se obtuvo fue resuspendida en sacarosa al 20 % en amortiguador de citrato 50 mM pH 5. La solución obtenida se colocó en la parte superior de un gradiente discontinuo de sacarosa 90 % (p/v); 70% (p/v); 50% (p/v) , en amortiguador de citrato 50 mM pH 5 en la proporción de 1:1:1; se centrifugó a 23 000 g. durante 40 min. (30).

Una vez centrifugado se fraccionó en alícuotas de 1 ml. a cada una se le determinó su densidad en un refractómetro de Abbe y su absorción a 280 nm. (Fig. 2.1 , Fig. 2.2)

2.4.7 IDENTIFICACION DE LOS CUERPOS PROTEICOS.

Para valorar la eficiencia del método de aislamiento y purificación de los cuerpos proteicos se observó al microscopio . Las fracciones generadas durante la obtención de la pastilla que contiene los cuerpos proteicos (Fig. 2.1); así como las bandas del gradiente discontinuo donde se acumula el material que absorbe a 280 nm. (Fig. 2.2).

Las muestras para la observación microscópica se prepararon de la siguiente manera: se colocó una pequeña gota de la banda del gradiente en un portaobjetos, se hizo un frotis y se tizó con eosina al 1% durante 10 min. (15).

Las micrografías se muestran en la Fig. 2.3.

2.4.8 FRACCIONAMIENTO DE LA PROTEINA DE COTILEDON DE FRIJOL

La proteína tanto del cotiledón como la presente en los cuerpos proteicos aislados.

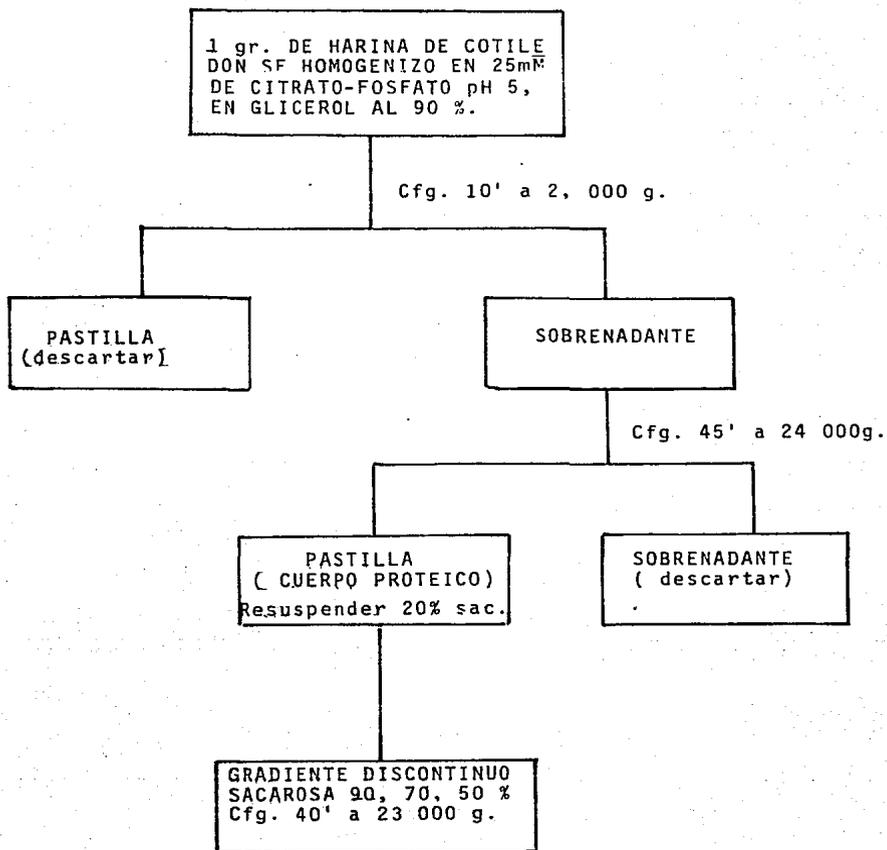


Fig. 2.1 DIAGRAMA DE LA METODOLOGIA EMPLEADA EN EL AISLAMIENTO DE LOS CUERPOS PROTEICOS DEL COTILEDON DE FRIJOL.

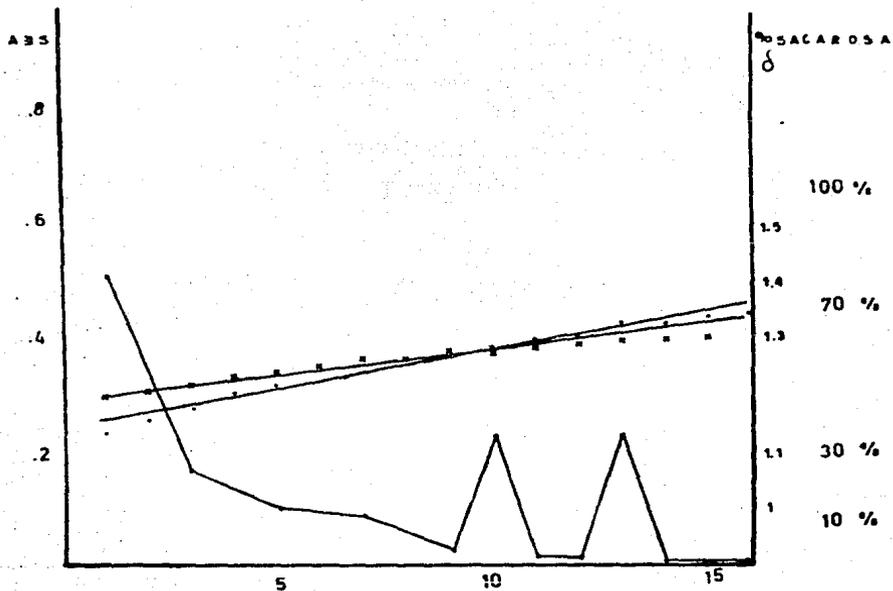
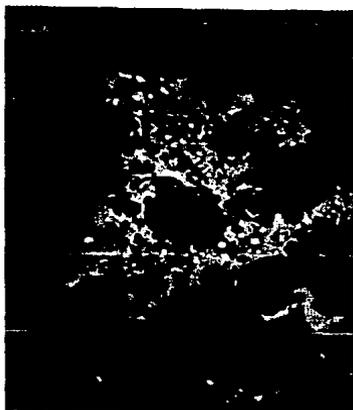


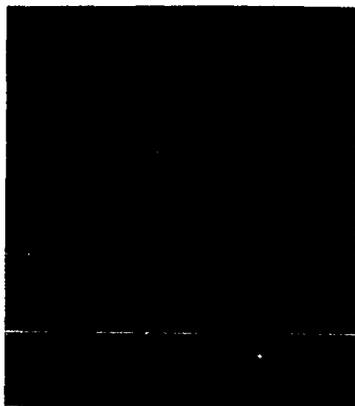
FIG. 2.2 DISTRIBUCION DE LOS CUERPOS PROTEICOS EN UN GRADIENTE DE SACAROSA

1. gr. de harina de cotiledón fué homogenizado en glicerol al 90% en 25 mM de citrato-fosfato pH 5.0. El homogenado se centrifugó a 2,000 g; el sobrenadante se centrifugó a 24,000 g. por 45 minutos.

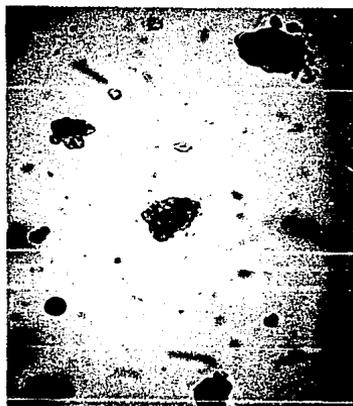
La pastilla constituyó la fracción cruda de cuerpos proteicos. Para purificarlos esta pastilla se fraccionó en un gradiente discontinuo de sacarosa y se centrifugó a 23,000 g. por 40 minutos. El gradiente se fraccionó en alícuotas de 1 ml.. A cada fracción se le determinó la absorción a 280 nm. y la densidad.



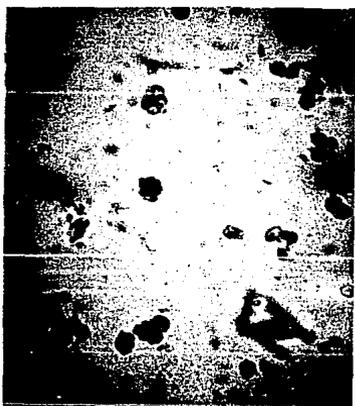
A



B



C



D

Fig. 2.3 Micrografías del material presente en las diversas fracciones generadas durante la obtención y purificación de los cuerpos proteicos.

A) Amiloplastos pastilla de 2,000 g.

B) Cuerpos proteicos (frijol control) material acumulado en la banda de 1.29-1.30 g/c.c. en el gradiente discontinuo de sacarosa.

C) Pared celular e impurezas.- material acumulado en la banda de 1.25-1.29 g/c.c. en el gradiente discontinuo de sacarosa.

D) Cuerpos proteicos (frijol duro). Material acumulado en la banda de 1.29-1.30 g/c.c. en el gradiente discontinuo de sacarosa.

Se fraccionaron de acuerdo a su solubilidad en soluciones salinas de diferente fuerza iónica (Osborne 1924) mezclas de solventes e hidróxido de sodio. Utilizando esta metodología se obtienen cuatro grupos de proteínas que a continuación se mencionan:

Globulinas: proteínas solubles en soluciones salinas.

Albúminas: proteínas solubles en etanol.

Prolaminas: proteínas solubles en etanol.

Proteínas solubles en hidróxido de sodio.

Se ha reportado que la eficiencia de extracción de las globulinas y albúminas es variable dependiendo del pH y fuerza iónica del amortiguador utilizando en la extracción, por lo que se determinaron las condiciones en las cuales se obtenía un mejor rendimiento de estas proteínas. Se utilizaron amortiguadores de diferente pH y fuerza iónica variable; la fuerza iónica se ajustó con cloruro de sodio a diferentes concentraciones. En la tabla 2.1 se muestran los resultados de estos experimentos. El amortiguador con el que se extrajo una mayor cantidad de proteína fue Tris-HCl 50 mM pH 8.0 conteniendo 0.3 M de NaCl.

El fraccionamiento de proteínas se efectuó de la siguiente manera: un gramo de harina del cotiledón de frijol se homogenizó en 15 ml. de amortiguador de extracción durante 3 horas mediante agitación a 4°C.

La muestra después de la homogenización se centrifugó a 35 000 g. durante 30 minutos.

El sobrenadante que se obtuvo de esta centrifugación se dializó durante 3 horas con agua bidestilada, las muestras se centrifugaron a 35 000 g. durante 30 minutos, en la pastilla se obtienen las globulinas en el sobrenadante las albúminas.

Tabla 2.1 EFECTO DEL pH Y LA CONCENTRACION IONICA EN LA CANTIDAD DE PROTEINA EXTRAIDA DEL COTILEDON DE FRIJOL

NaCl (M)	Proteína extraída (mg. / g. de cotiledón)	
	pH	
	3.5 (a)	8.0 (b)
0.1	24	65
0.3	28	72
0.5	32	60

a) Glicina 50 mM p H 3.5

b) Tris-HCl 50 mM pH 8.0

La primeras se resuspenden en una solución de NaCl 0.1 M. La pastilla inicial se resuspendió en una solución de etanol 50% mediante agitación a 4°C durante 30 minutos, luego se centrifugó a 77 000 g. durante 30 minutos.

La pastilla nuevamente se extrae de la manera antes mencionada y se centrifuga, los sobrenadantes se juntan y guardan en refrigeración. En esta fracción se extraen las prolaminas.

La pastilla se extrae con hidróxido de sodio 0.5 M durante 15 horas mediante agitación a 4°C se centrifuga a 77 000 g. durante 30 minutos. La pastilla se descarta y el sobrenadante se guarda donde quedan las proteínas solubles en hidróxido de sodio. (Fig. 2.4).

A cada una de las muestras se les cuantificó proteína por el método de Lowry o el de Peterson.

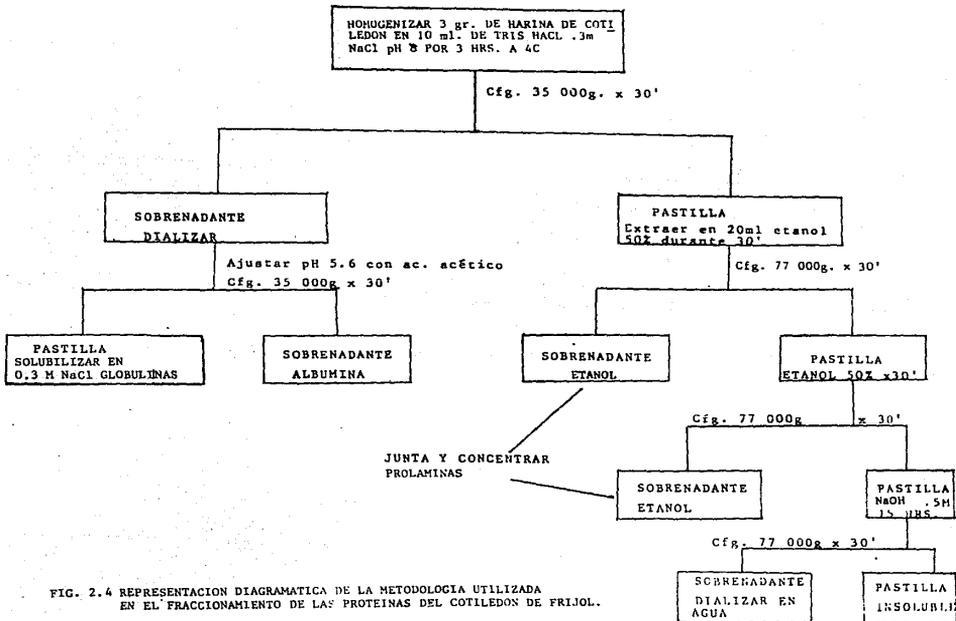
2.4.9 CUANTIFICACION DE LA PROTEINA DE COTILEDON DE FRIJOL

Para determinar la cantidad de proteína extraída del cotiledón se utilizó el método de Lowry y col (18). Mientras que la de los cuerpos proteicos se cuantificó utilizando la metodología descrita por Peterson (24).

Método de Lowry:

Se prepararon los siguientes reactivos:

- A) 2 % de Carbonato de Sodio en 0.1 N de Hidróxido de sodio.
- B) 0.5 % de sulfato de cobre pentahidratado en 1 % de tartrato de sodio potasio.



C) 50 ml. de la solución A y 1 ml. de la solución B, esta solución se prepara al momento.

D) Reactivo de Folin Ciocalteus y agua bidestilada en partes iguales (1:1).

Para la realización de la curva patrón se tomaron alícuotas de la solución patrón de suero albúmina de 0 a 500 microgramos y se llevaron a un volumen final de 1 ml. se les agregaron 5 ml. de la solución C se dejaron reposar durante 10 min. y se le adicionaron 0.5 ml. de la solución D se deja reposar 3 minutos y se leen en el espectrofotómetro a 750 nm (Fig. 2.5). Para determinar la proteína del frijol, se tomó una alícuota de la fracción correspondiente y se trató de la misma forma que para la curva patrón.

Método de Peterson:

Se utilizaron los siguientes reactivos:

A) Partes iguales de hidróxido de sodio 0.8 N, SDS 10 %, agua bidestilada y solución de cobre-tartrato-carbonato (2% de tartrato de sodio potasio, 10 % de carbonato de cobre, 0.1 % de sulfato de cobre pentahidratado).

B) Folin Ciocalteus 1 parte del reactivo por 5 de agua (1:6).

Para la curva patrón se tomaron alícuotas de la solución patrón de suero albúmina de bovino conteniendo de 0 a 100 microgramos y se llevan a un volumen final de 1 ml. A estas muestras se le agrega 1 ml. del reactivo A y se deja reposar durante 10 minutos luego se le adiciona 1 ml. del reactivo B, se deja reposar durante 30 minutos y se leen a 750 nm en el espectrofotómetro. Para la determinación de la proteína de frijol se hizo de forma similar. (Fig. 2.6)

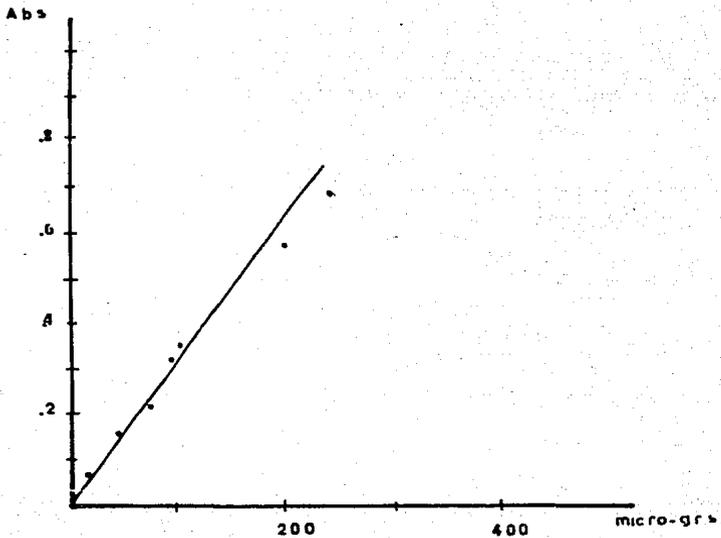


FIG. 2.5 CURVA PATRON CON SUERO-ALBUMINA DE BOVINO POR EL METODO DE LOWRY.

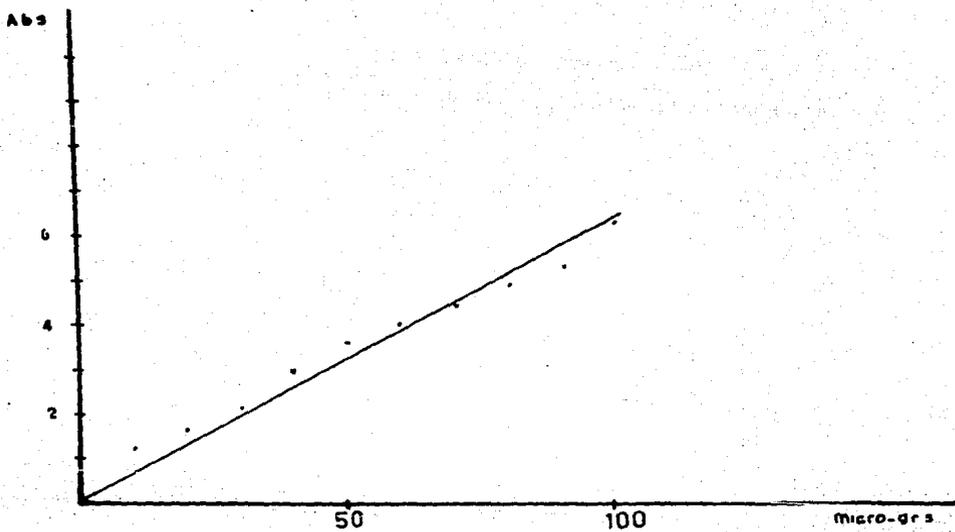


FIG. 2.6 CURVA PATRON DE SUERO-ALBUMINA DE BOVINO POR EL METODO DE PETERSON.

2.4.10 CARACTERIZACION DE LA PROTEINA DE FRIJOL

Las proteínas contenidas en la fracción de globulinas, albúminas y cuerpos proteicos aislados se reportaron en geles de poliacrilamida (17). Se prepararon geles planos en placas de 15 mm. de espesor. La concentraciones finales de los componentes de los geles fueron: Para el gel concentrador acrilamida al 5%, Bisacrilamida 0.26 M, Tris 0.125 M pH 6.8, SDS 0.1%. Para el gel separador la mezcla consistió de acrilamida al 10% ó al 15%, Bisacrilamida al 0.26 M, Tris 0.375 M pH 8.8, SDS 0.1%. Se adicionó además 100 microlitros de persulfato de amonio al 12.5% y 50 microlitros de TEMED al 10% por cada 10 ml. de mezcla, para catalizar la polimerización del gel. Los geles se corrieron a temperatura ambiente en una solución amortiguadora electrolítica de Tris 0.025 M pH 8.3, glicina 0.192 M, SDS 0.1% a 3 mA por carril por 12 horas.

La muestra de proteína para la electroforesis se preparó tomando una alícuota de cada una de las fracciones (20-30 microgramos), se les adicionó un volumen igual de una solución 2x que contenía 6 M de urea, 1% de SDS, 0.625 M de Tris pH 6.8, 1 mM de mercaptoetanol, 0.001% de bromofenol y 0.4 N de hidróxido de sodio. Posteriormente la muestra se calentó a 100°C por un minuto y se aplicó al gel. El peso molecular de las bandas en los patrones electroforéticos se determinó por comparación con proteínas de peso molecular conocido. (Fig. 2.7 y Fig. 2.8)

2.4.11 AISLAMIENTO Y DETERMINACION DE FITINA.

Un gramo de la harina de frijol deslipidizado se homogeniza en ácido clorhídrico 2 N mediante agitación a 4° C durante 1 hora. La pastilla se desecha y en el sobrenadante se encuentra el ácido fítico.

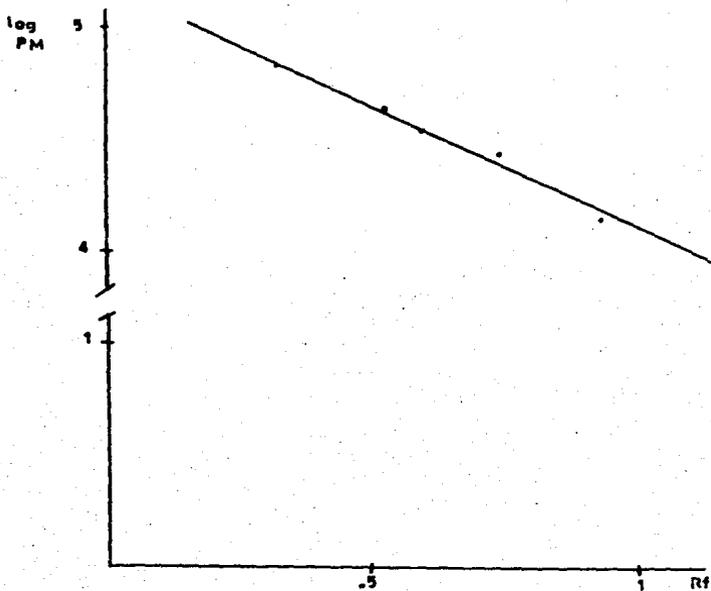


Fig. 2.7 Calibración de geles de acrilamida al 10 % con proteínas de peso molecular conocido.

Los geles se prepararon como se describió en metodología. En cada carril se corrieron 10 microgramos de una de las siguientes proteínas: Albúmina de Bovino 66,000 ; Albúmina de huevo 45,000; Gliceraldehído 3-fosfato 36,000; Anhidrasa carbónica 29,000 y Lactoalbúmina 14,200. La posición de las proteínas en el gel se hicieron visibles por tinción con azul de coomassie . Se calculó el factor de corrimiento (Rf) para cada proteína y se graficó contra el logaritmo de su peso molecular.

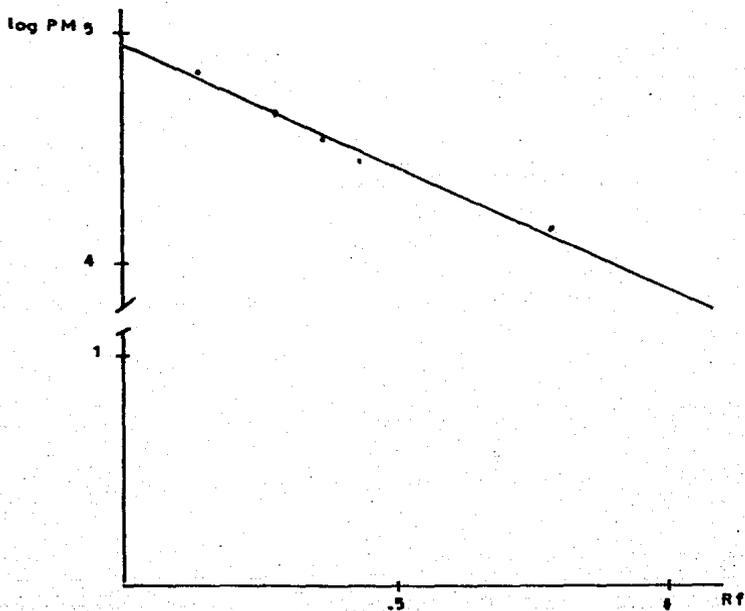


Fig. 2.8 Calibración de geles de acrilamida al 15 % con proteínas de peso molecular conocido . Los datos para la gráfica - se obtuvieron de la forma descrita en la fig. 2.7

La fitina del extracto anterior se cuantificó de acuerdo al método de Haug y Lantzch (13). Se prepararon las siguientes soluciones:

Solución férrica 0.02 g. de sulfato de amonio férrico en 100 ml. de ácido clorhídrico 0.2 N.

Solución 2,2' Bipyridina disuelta en 1 ml. de ácido tioglicólico aforar a 100 ml. con agua bidestilada.

A 0.5 ml. del extracto conteniendo a la fitina se le agregó 1 ml. de la solución férrica se calentó por 30 minutos en baño de agua hirviendo. Los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 2 000 g. por 15 min.. Se tomó 1 ml. del sobrenadante y se le agregó 1.5 ml. de la solución de 2,2' bipyridina. El color desarrollado se lee a 519 nm. en el espectrofómetro, la cantidad de fitina en cada muestra se calcula en una curva patrón preparada con la sal de sodio del ácido fitico. (Fig. 2.9)

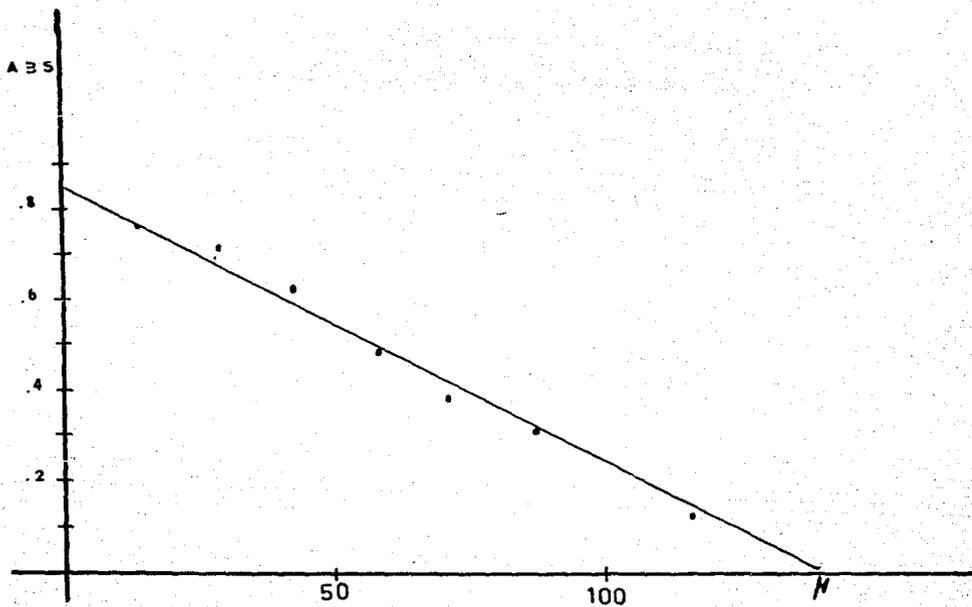


FIG. 2.9 CURVA PATRON DE FITINA CON ACIDO FITICO.

3. RESULTADOS

3.1 OBTENCION DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

Para determinar las causas bioquímicas que conducen al endurecimiento del frijol se requiere contar con material biológico homogéneo en cuanto a carga genética e historial agronómico y que además presente diferente grado de dureza lo que permitirá en forma clara establecer una relación causa-efecto. Esto es, entre más duro es el frijol (mayor será el tiempo de cocción) y por tanto se encontrará más afectado el evento bioquímico responsable del fenómeno.

Una forma de obtener el frijol con las características antes mencionadas es almacenando el grano de una misma variedad, en condiciones de envejecimiento acelerado (alta humedad relativa y alta temperatura) (8). Esta metodología se utilizó en el desarrollo de este trabajo como estrategia para obtener frijol con diferente grado de dureza.

3.2 VALORACION DEL GRADO DE DUREZA

Para valorar el grado de dureza del frijol almacenado en 75% de humedad relativa y 41 °C lo que se hizo fue determinar el tiempo de cocción que presentaba el grano después de haber sido almacenado por diversos periodos de tiempo. Se encontró que a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento aumenta el tiempo que el grano requiere para cocerse (Tabla 3.1). De los resultados anteriores se concluye que el grado de dureza del frijol variedad Ojo de Cabra aumenta al aumentar el tiempo de almacenamiento en las condiciones aquí descritas. En este trabajo el grado de dureza se expresó como la diferencia entre el tiempo de cocción (h) que requiere el

Tabla 3.1 EFECTO DEL PERIODO DE ALMACENAMIENTO EN EL TIEMPO DE COCCION Y EL GRADO DE DUREZA DEL GRANO DE FRIJOL

Periodo de Almacenamiento (a)	Contenido de Humedad de la semilla (b)	Tiempo de Cocción (h) (c)	Grado de Dureza (d)
0	10.5	3:00	0
7	13.5	4:00	I
14	14.5	6:00	III
21	14.6	7:00	IV
30	14.9	7:00	IV

+

- a) 41°C y 75 % de humedad relativa.
- b) Promedio de cuatro repeticiones cada una.
- c) Efectuada en la forma descrita en metodología.
- d) Unidades arbitrarias expresadas como la diferencia entre el tiempo de cocción (h) del grano después de almacenado y el control.

frijol almacenado por diversos periodos de tiempo y el requerido por el frijol control, por ejemplo, el frijol almacenado por 7 días a 41° C y 75 % de humedad relativa requiere de 4 horas para su cocción mientras que el control requiere de 3 horas, por lo que el frijol almacenado por 7 días en las condiciones aquí descritas tiene grado de dureza I (Tabla 3.1). Algunos autores han reportado que la invasión por hongos contribuye a la pérdida de calidad de la semilla (8), por lo que se decidió investigar si la micoflora del grano contribuía en el fenómeno de endurecimiento del frijol, se encontró que el frijol almacenado en las condiciones antes descritas no presenta ataque de hongos a pesar de que el contenido de humedad del grano en estas condiciones es relativamente alto.

3.1.3 CINÉTICA DE IMBIBICION

El endurecimiento del frijol resulta de un aumento del tiempo requerido para su suavización (21), esto podría deberse a una disminución en su capacidad de hidratación. Para demostrar si este factor participaba en el proceso de endurecimiento se determinó la cinética de imbibición para el grano a 26 °C. (Fig.3 .1) , puede observarse que la capacidad de hidratación del grano duro es la misma que la del control y que además la capacidad de captación de agua es independiente del tiempo que estuvo almacenado.

A las 72 horas de imbibición la diferencias en peso fresco que presenta el control con respecto al endurecido se deben únicamente a que este último ha perdido su capacidad de germinación .

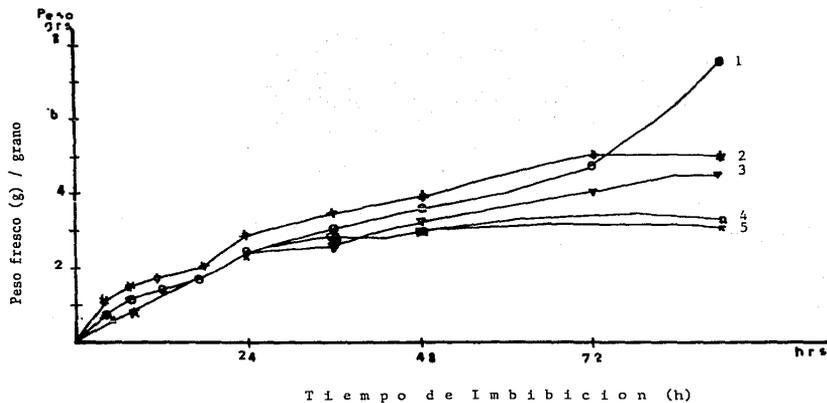


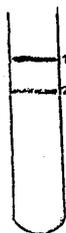
FIG. 3.1 CINÉTICA DE IMBIBICIÓN DE FRIJOL ALMACENADO POR DIFERENTES PERIODOS DE TIEMPO. CONTROL (1); 7 DIAS (2); 14 DIAS (3); 21 DIAS (4); 30 DIAS (5). LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO FUERON 41°C y 75 % DE HUMEDAD RELATIVA. LA IMBIBICIÓN SE REALIZÓ A 28° C EN LA FORMA DESCRITA EN LA METODOLOGÍA.

3.4 AISLAMIENTO Y CUANTIFICACION DE CUERPOS PROTEICOS

Las células del cotiledón del frijol son ricas en cuerpos proteicos por lo que su citoplasma muestra una apariencia granulosa cuando se observa al microscopio electrónico (33). Se ha reportado que en frijol duro esta granulación disminuye (33), lo cual sugiere que los cuerpos proteicos se destruyen. En este trabajo se exploró la posibilidad de que durante el fenómeno de endurecimiento del grano los cuerpos proteicos se lisen, con lo cual se disminuirá la granulación citoplasmática. Estos organelos se aislaron por ultracentrifugación en gradientes discontinuos de sacarosa su identificación se realizó por microscopía (ver metodología) y por sus características de densidad, la cual es de 1.29-1.30 (37). En los gradientes de sacarosa discontinua se puede observar que el material sedimenta en dos bandas muy bien definidas y que independientemente del tiempo de almacenamiento la densidad a la que aparecen las bandas es similar (Tabla 3.2). La densidad de una de las bandas (segunda) coincide con la reportada para cuerpos proteicos y se concluyó que en esta banda sedimentaban los cuerpos proteicos.

La cantidad de cuerpos proteicos aislados de los cotiledones de frijol almacenado por diversos períodos de tiempo se evaluó cuantificando la proteína presente en la banda de densidad 1.29-1.30 del gradiente de sacarosa. En la tabla 3.3 se muestran los resultados. La cantidad de cuerpos proteicos disminuye a medida que el tiempo de almacenamiento aumenta, lo cual sugiere que las condiciones de almacenamiento en las que se produce el fenómeno de endurecimiento del frijol, inducen la lisis de los cuerpos proteicos.

Tabla 3.2 DENSIDAD Y PORCENTAJE DE SACAROSA DE LAS BANDAS OBTENIDAS DURANTE LA PURIFICACION DE LOS CUERPOS PROTEICOS AISLADOS DE FRIJOL ALMACENADO POR DIFERENTE PERIODO DE TIEMPO.



Tiempo de almacenamiento (a)	1a. Banda		2a. Banda	
	% Sacarosa (b)	Densidad (c)	% Sacarosa	Densidad
Control	50.5	1.232322	63.0	1.304267
7	53.0	1.246234	62.5	1.301274
14	54.5	1.254697	62.6	1.301871
21	52.5	1.243433	61.0	1.292354
30	51.0	1.230585	60.0	1.286456

- a) 41°C y 75 % de humedad relativa.
 b) Porcentaje en peso.
 c) g/c.c. a 25°C.

Tabla 3.3 EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN LA CANTIDAD DE CUERPOS PROTEICOS AISLADOS DE COTILEDON DE FRIJOL.

Tiempo de almacenamiento (días) ^a	Proteína total en la banda 1.29-1.30 mg/g de cotiledón. ^b
Control	1083
14	800
21	648
30	540

a) 75 % de humedad relativa y 41°C.

b) Proteína extraídas con NaOH 0.5 M de los cuerpos proteicos aislados de cotiledón de frijol, en gradiente discontinuo de sacarosa.

3.5 FRACCIONAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LA PROTEINA DE COTILEDON Y DE LOS CUERPOS PROTEICOS.

Como se mencionó en la introducción, los estudios de microscopía electrónica han demostrado que cuando el frijol se cuece la pared celular pierde su rigidez y las células se separan unas de otras. (16). Sin embargo, la pared celular aislada del frijol remojado no se separa aún cuando se hiervan en condiciones en las que se cuece el grano completo (26) esto sugiere que durante el proceso de la cocción también participan componentes del protoplasto. De los componentes intracelulares se ha sugerido que la estructura de los cuerpos proteicos se modifica durante el proceso de endurecimiento (33,34). Esto podría deberse a que el almacenamiento del grano en condiciones adversas induce un cambio cuantitativo o cualitativo de sus componentes. Para estudiar la participación de los componentes del cuerpo proteico (7,12,19,23,37) en el proceso de endurecimiento, lo que se hizo fue aislar cuerpos proteicos del cotiledón de frijol con diferente grado de dureza y analizar su contenido proteico mayoritario (albúminas y globulinas). En la Tabla 3.4 se muestra el efecto que el tiempo de almacenamiento del frijol en condiciones adversas tiene sobre el contenido de globulinas y albúminas de estos organelos. Puede observarse que a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento (aumento en el grado de dureza), disminuye el contenido de globulinas. A su vez la cantidad de albúminas permanecen casi constantes o con una ligera tendencia a disminuir a medida que el proceso de endurecimiento progresa. En la fig. 3.2 se muestra el patrón de péptidos resultante, de la electroforesis de los cuerpos proteicos aislados de cotiledón de frijol almacenado por diversos periodos de tiempo.

Tabla 3.4 EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN EL CONTENIDO DE ALBUMINAS Y GLOBULINAS DE LOS CUERPOS PROTEICOS AISLADOS DE COTILEDON DE FRIJOL.

Tiempo de almacenamiento a	Grado de dureza b	g. de proteina/g. de cotiledón c		
		Globulinas	Albúminas	G/A
Control	0	679.12	287.79	2.35
14	III	171.42	229.32	0.747
21	IV	162.12	259.39	0.625
30	IV	104.23	199.74	0.521

a) 75 % de humedad relativa y 41°C.

b) Igual que en Tabla 3.1

c) Cuerpos Proteicos aislados se extrajeron con Tris-HCl 50 mM pH 8.0 y 0.3 M de NaCl. La proteina solubilizada se dializó contra agua y se centrifugó a 35 000 g. x 30 min.. Las albúminas presentes en la fracción soluble y las globulinas colectadas en la pastilla fueron cuantificadas por Peterson.

d) Resultado de dividir el contenido de globulinas de los cuerpos proteicos entre el de albúminas para cada tratamiento.

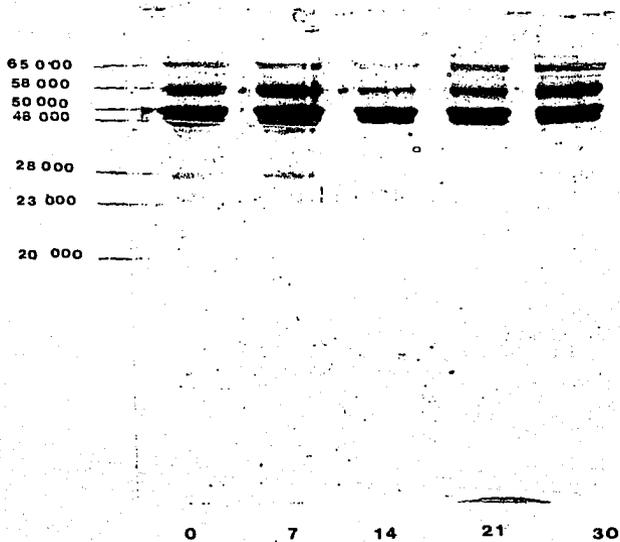


Fig. 3.2

Cuerpos Proteicos de frijol de diferente calidad en gel de Acrilamida-SDS al 15 % en el esquema se indican los pesos moleculares a los que corresponde cada banda y los números en la parte inferior indican el tiempo de almacenamiento a 41°C y 75 % de humedad relativa.

El número, proporción y peso molecular de cada uno de los péptidos del control es similar a los de los cuerpos proteicos aislados de granos con diversos grados de dureza. Este resultado no coincide con el patrón electroforético que se esperaría de un sistema donde la solubilidad de sus proteínas es diferente. Para resolver la aparente contradicción de estos resultados, se decidió fraccionar las proteínas totales del cotiledón y examinar el patrón electroforético de la fracción de albúminas y globulinas. La estrategia detrás de este experimento fué suponer que los cambios fisicoquímicos de las proteínas del cuerpo proteico inducidos por el almacenamiento deberían reflejarse en la proteína total del cotiledón.

Los patrones electroforéticos (Fig. 3. 3) para las albúminas extraídas del cotiledón de frijol con diferente grado de dureza es similar en todos los casos analizados, sin embargo, el patrón obtenido del frijol endurecido muestra una mayor cantidad de proteína en la banda de 76 000 daltons la cual probablemente se forma por la unión de tipo covalente entre algunos de los péptidos ya que apesar de aplicarle SDS esta banda persiste. (Fig.3.3)

Durante el almacenamiento el contenido proteico total del cotiledón no varía en forma significativa (Fig. 3.4) aún cuando la proporción de las diferentes clases de proteína varía en forma importante. (Tabla 3.5)

Por ejemplo en el cotiledón del frijol control aproximadamente 72 % de la proteína total son globulinas y 19 % albúminas mientras que a los 7 días de almacenamiento en condiciones adversas solo el 39 % son globulinas y han aumentado en forma considerable las albúminas y las proteínas solubles en hidróxido de sodio. El máximo cambio se presenta a los 14 días de endurecimiento, tiempos más largos de almacenamiento no modifican estos componentes en forma importante (Tabla 3.5)

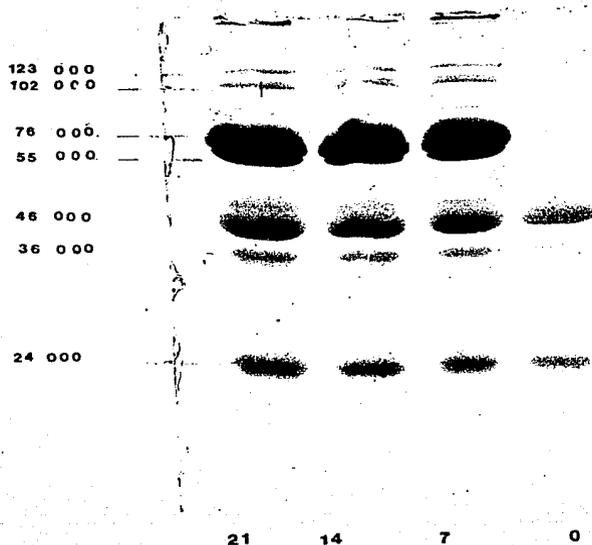
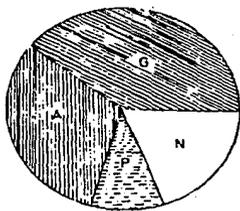
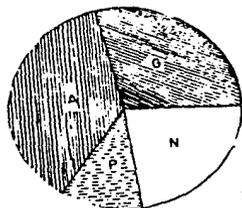


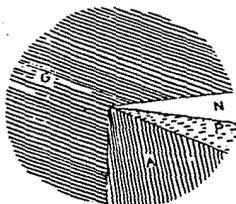
Fig. 3.3 Patrón de Albúminas de cotiledón de frijol, en gel de Acrilamida-SDS al 10 %, en donde se muestran los pesos moleculares de cada péptido. Los números en la parte inferior indican el tiempo de almacenamiento a 41°C y 75 % de humedad relativa.



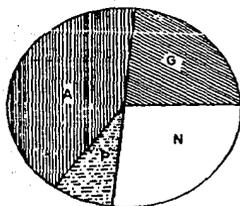
7



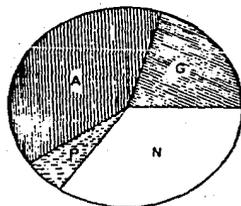
14



C



21



30

FIG. 3.4 PORCENTAJE DE LA PROTEINA EN COTILEDON DE FRIJOL DE DIFERENTE CALIDAD.

En el pie de figura se indican: (C) Control; (7) 7 días; (14) 14 días; (21) 21 días; (30) 30 días en 75 % de humedad relativa y 41 °C. . Al interior de cada figura: (G) Globulinas; (A) Albúminas; (P) Prolaminas; (N) Proteínas solubles en Hidróxido de sodio.

Tabla 3.5 EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN LA PROPORCION DE LOS COMPONENTES PROTEICOS DEL COTILEDON.

Tiempo de (a) almacenamiento	0		7		14		21		30	
Componentes Proteicos (c)	mg. de Proteinas / gr. de cotiledón (b)									
Globulinas	42.14	72.40%	21.36	39.22%	12.34	23.36%	18.02	28.79%	11.31	21.15%
Albumina	11.25	19.32%	16.89	31.01%	21.99	41.63%	23.18	37.03%	20.43	38.83%
Prolamina	2.17	3.72%	5.43	9.97%	3.99	7.55%	7.11	11.35%	5.45	10.35%
Soln. NaOH	2.64	4.53%	10.78	19.79%	14.50	27.45%	14.28	22.81%	15.60	29.65%
TOTAL mg.	58.20		54.46		52.82		62.59		52.61	

a) Condiciones de almacenamiento 41°C y 75 % de Humedad relativa.

b) Determinada por Lowry.

c) 1 gr. de harina de cotiledón fue sometido al fraccionamiento proteico descrito en la metodología.

3.6 DETERMINACION DE FITINA

La participación de la fitina en el proceso del endurecimiento del frijol también fue estudiada en este trabajo, se encuentra localizada en los cuerpos proteicos (4,10,23,27), sin embargo la cuatificación de este metabolito se realizó en el cotiledón debido a que el rendimiento de los cuerpos proteicos era muy bajo. Los resultados muestran que a medida que el frijol se endurece el contenido de fitina del grano también disminuye. (Tabla 3.6).

Tabla 3.6

CUANTIFICACION DE FITINA EN COTILEDON DE FRIJOL
DE DIFERENTE GRADO DE DUREZA.

Grado de dureza (a)	mgs. de fitina / gr. de cotiledón (b)
Control	7.45
I	3.51
III	2.05
IV	0.87

a) Igual que tabla III.1

b) Promedio de 2 determinaciones independientes realizadas por duplicado cada una.

4. D I S C U S I O N

Micrografías electrónicas de las células del cotiledón de frijol muestran que el citoplasma posee una apariencia granulada (16,26). debida muy probablemente a la gran cantidad de cuerpos proteicos que posee este tejido de reserva (14,16). En el frijol endurecido se ha observado que esta apariencia granulada del citoplasma desaparece (26). Probablemente porque los cuerpos proteicos han perdido su integridad. En este trabajo se demuestra que ha medida que el frijol se endurece disminuye la cantidad de material recuperado del cotiledón con características de cuerpo proteico (densidad 1.29-1.30) (Tabla 3.2).

La observación de este material al microscopio de luz muestra que la integridad de estos organelos se preserva aún cuando ya han perdido su forma redondeada y se encuentran formando acúmulos (Fig.2 .3). Esta tendencia a asociarse va acompañada de cambios en la proporción de la clase mayoritaria de proteínas (albúminas y globulinas) que los constituyen (Tabla 3.3) .

Sin embargo, el número y tipo de polipéptidos presentes en el cuerpo proteico no ha variado (Fig.3 . 2) ya que se obtiene un patrón similar cuando estos organelos se someten a electroforesis desnaturalizante independientemente del grado de dureza que presente el frijol, utilizado para su aislamiento.

Se ha reportado que el calentamiento de las globulinas del frijol soya en solución induce la formación de grandes agregados moleculares por interacción iónica y de puentes disulfuro entre la subunidad de la conglicina (7s) y las subunidades básicas de la glicilina (11s) (10,29,32) Las condiciones ambientales (Humedad relativa y temperatura

alta) en las cuales se establece el fenómeno del endurecimiento del frijol tenderían a favorecer la disociación de las globulinas en subunidades con lo cual se favorecería la interacción entre ellas para la formación de agregados similares a los descritos para el frijol soya (30,32). Una interacción de este tipo cambiaría la solubilidad de los péptidos involucrados sin alterar su identidad electroforética en un sistema desnaturalizante. Otra evidencia que apoya esta interpretación es la presencia de una nueva banda proteica (76 000 daltons) en el patrón electroforético de la fracción de albúminas cuando estas se aíslan de frijol duro, pero que no está presente en el control (Fig. 3.3).

El peso molecular de este nuevo polipéptido es similar al que resultaría de la interacción entre algunas subunidades de la fracción G1 con las de la G2 aunque en este caso la unión parece ser covalente. Una posibilidad es que la interacción entre las subunidades de las globulinas sea de tipo no covalente mientras se encuentran dentro del cuerpo proteico y una vez que este se destruye, factores presentes en el citoplasma induzcan el entrecruzamiento covalente entre ellos. El fenómeno del endurecimiento induce cambios cualitativos en la proteína del cotiledón del frijol (Tabla 3.5) y cuantitativos en la reserva de fosfato (7,11,20,35) (Tabla 3.6). El contenido de fitina disminuye a medida que aumenta el tiempo de cocción requerido por el grano para su suavización.

Integrando estos resultados a los ya existentes en la literatura, el fenómeno del endurecimiento del frijol se puede explicar a través del siguiente modelo. El tiempo requerido por el grano de frijol para suavizarse durante el proceso de la cocción depende de la velocidad de movilización de los iones divalentes, calcio y magnesio principalmente, presentes en la lamela media lo que permite que esta se solubilice y las células del cotiledón se separen. Durante la movilización los iones viajan hacia el interior de las células del cotiledón donde son quelados por las proteínas de reserva y fitina.

En el fenómeno de endurecimiento la capacidad de quelación del protoplasto disminuye (menor contenido de fitina y cambios fisicoquímicos de las proteínas), con lo cual la redistribución iónica necesaria para que el grano se suavice durante la cocción, se realiza más lentamente, lo que se refleja en un aumento de los tiempos de cocción requeridos para que se complete el proceso.

5. CONCLUSIONES

- 1.- El frijol de la variedad Ojo de Cabra se endurece cuando se almacena en 75 % de humedad relativa y 41 °C. El grado de endurecimiento es medido como tiempo de cocción el cual es proporcional al tiempo de almacenamiento hasta llegar a un máximo a partir de aquí el tiempo de cocción permanece constante.
- 2.- El endurecimiento del frijol Ojo de Cabra durante el almacenamiento no es causado por hongos ni por diferencias en la capacidad de imbibición del grano (Fig. 3.1).
- 3.- La cantidad de cuerpos proteicos del cotiledón disminuye a medida que aumenta el grado de endurecimiento del grano (Tabla 3.3).
- 4.- Las proteínas del frijol se modifican en forma cualitativa durante el fenómeno del endurecimiento.
- 5.- El contenido de fitina del grano disminuye a medida que el frijol se endurece.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Abdelrahaman, A.A. y Hoseney, R.C. (1984) Basis for hardness in Pearl millet, Grain Sorgum, and Corn; Cereal Chemistry 61 : 232-235.
2. Burr, K.H., Kon, S. y Morris H.J. (1968) Cooking rates of Dry Beans as influenced by moisture content and temperature and time storage; Food Technology 22, 336-338.
3. Cleveland, W.D., Fischer, S.G., Kirschner, W.M. Laemli, U.K. (1977) Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. The Journal of Biological Chemistry 252 : 1102-1106.
4. Derbyshire, E., Wright, D.J. y Boutle, D. (1976) Legumin and Vicilin, storage proteins of legume seeds.; Phytochemistry 15:3-24.
5. Dreyer, D.L. y Campbell B.C. (1984) Association of the degree of methylation of intercellular pectin with plant resistance to aphids and with induction of aphid biotypes. Experientia 40; 224-225.
6. Ericson, C.M. y Chrispeels J.M. (1973) Isolation and characterization of glucoproteins from the cotyledons of Phaseolus aureus . Plant Physiology 52: 98-103.
7. Ergle, R.D. y Guinn G. (1959) Phosphorus compounds of cotton embryos and their changes during germination. Plant Physiology : 476-481.
8. Esquivel, F.R.M. (1984) Tesis Estudios sobre el endurecimiento de frijol almacenado. México, D.F. UNAM.
9. Ganesh K.K., Ventakaraman L.V., Jaya T.V. y Krishnamurthy K.S. (1978). Cooking characteristics of some germinated legumes: Changes in Phytins, Ca ++, Mg ++ and Pectins. Journal of Food Science 43: 85-88.

10. Graham, T.A. y Gunning B.E.S. (1970). Localization of Legumin and Vicilin in Bean cotyledon cells using fluorescent antibodies. *Nature* 228: 81-82.
11. Hall, R.J. y Hodges, K.T. (1966) Phosphorus metabolism of germinating oat seeds. *Plant Physiology* 41: 1459-1464.
12. Harris, N. and Chrispeels J. (1975). Histochemical and Biochemical Observations on Storage Protein Metabolism and Protein Body Autolysis in Cotyledons of Germinating Mung Bean. *Plant Physiology* 56: 292-299.
13. Haug, W. y Lantzsch, J.H. (1983) Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereal and cereal products. *Journal Science Food Agriculture* 34: 1423-1426.
14. Jackson G.M. y Variano-Marston E. (1981) Hard-to-cook phenomenon in beans: Effects of accelerated storage on water absorption and cooking time. *Journal of Food Science* 46:799-803.
15. Johanson S. (1979) *Plant Microtechnique*. Ed. Mc.Graw-Hill Book Company. II:26.
16. Jones, P.M.B. y Boutler D. (1983) The cause of reduced cooking rate in *Phaseolus vulgaris* following adverse storage conditions. *Journal of Food Science* 48: 623-649.
17. Laemmli, U.K., (1977) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4, *Nature*, 227:680-685.
18. Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, and R.J. Randall (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193:265-275.

19. Mader M. y Chrispeels M. (1984) Synthesis of an integral protein of the protein body membrane in Phaseolus vulgaris cotyledons. Planta 160: 330-340.
20. Mandal, N.C. y Biswas, B.B. (1970) Metabolism of inositol phosphates. Plant Physiology 45:4-7.
21. Molina, M.L., De la Fuente G. y Bressani R. (1975) Interrelationships between storage, soaking time, cooking time, nutritive value and other characteristics of the black bean (Phaseolus vulgaris). Journal of Food Science 40:587-591.
22. Morris, G.F.I., Thurman D.A. y Boutler D. (1970) The extraction and chemical composition of aleurone grains (Protein bodies) isolated from seeds of Vicia faba. Phytochemistry 9:1707-1714.
23. Pernollet, J.C. (1978) Protein bodies of seeds ultrastructure, biochemistry, biosynthesis and degradation. Phytochemistry, 17:1473-1480.
24. Peterson, L.G. (1977) A simplification of the assay method of Lowry et. al. which is more generally applicable. Analytical Biochemistry, 83: 346-356.
25. Plant, R.A. y Moore G.K. (1983) The protein, lipid and carbohydrate composition of protein bodies from Lupinus angustifolius seed. Phychemistry 22 : 2359-2363.
26. Rockland B.L. y Jones, T.F. (1974) Scanning electron microscope studies on dry beans. Journal of Food Science 39:342-346.
27. Romero, J., Sun, M., Mc. Leester, C., Bliss A. y Hall, C. (1975) Heritable variation in a polypeptide subunit of the major storage protein of the bean Phaseolus vulgaris. Plant Physiology 56: 776-777.

28. Rowland, G.G. y Gusta, L.V. (1977) Effects of soaking, seed moisture content temperature, and seed leakage on germination of faba bean (Vicia faba) and peas (Pisum sativum). Canadian Journal Plant Science 57: 401-406.
29. Sun, M.S. y Hall, C.T. (1975) Solubility characteristics of globulins from Phaseolus vulgaris seeds in regard to their isolation and characterization. Journal of Agriculture Food Chemistry 23 :184-189.
30. Tombs, M.P. (1967) Protein bodies of the soybean. Plant Physiology 42: 797-813.
31. Utsumi S., Damodaran S. and Kinsella J.E. (1984) Heat induced interactions between soybean proteins: Preferential Association of 11 S basic subunits and subunits 7 S. Journal Agriculture Food Chemistry. 32: 1406-1412.
33. Varriano-Marston E. y Jackson, M.G. (1981) Hard-to-cook phenomenon in beans: Structural changes during storage and imbibition. Journal of Food Science 46:1379-1385.
34. Varriano-Marston y De Omana E. (1979) Effects of sodium salt solutions on the chemical composition and morphology of black beans (Phaseolus vulgaris). Journal of Food Science 44 :531-536.
35. Williams, G.S. (1970) The role of phytic acid in the wheat grain. Plant Physiology 45: 376-381.

36. Winston, P.W. y Bates D.H. (1960) Saturated solutions for the control of humidity in biological research Ecology 41:232-237.

37. Weber, K. y Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The Journal of Biological Chemistry 244 :4406-4412.

38. Youle, J.R. y Huang, H.C. (1976) Protein bodies from the endosperm of castor bean. Plant Physiology 58: 703-709.