

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**

**SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**"DETERMINACIÓN DE LOS PRINCIPALES POLISACÁRIDOS NO  
ALMIDONOSOS CAUSANTES DE FLATULENCIA EN EL FRIJOL COMÚN  
(*Phaseolus vulgaris*, L.).**

**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE UNA PECTINASA Y UNA CELULASA SOBRE SU  
DIGESTIBILIDAD Y ACEPTABILIDAD"**

**Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de  
Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos,  
para optar al grado de *Magister Scientae***

**Floribeth Víquez Rodríguez**

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

1999

## DEDICATORIA

*A mis hijos, Jorge Arturo, Alejandro y Mariana  
A mi esposo, Jorge Eduardo  
A mi mamá  
A Xinia*

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi reconocimiento sincero a la Universidad de Costa Rica, institución que me ha acogido por más de 20 años, para la que guardo un especial cariño y gratitud. Una vez más, me ha permitido disfrutar de una beca que hizo posible la realización de esta nueva meta en mi vida. Al CITA, en la persona de su directora general, M.Sc. Gisela Kopper, por el apoyo brindado. A mi directora de tesis, Dra. Ana Ruth Bonilla, por su orientación y guía. Al M.Sc. Carlos Herrera, asesor, profesor y amigo, por sus enseñanzas e incondicionalidad de siempre. A la Dra. Leda Muñoz, quien a pesar de sus múltiples ocupaciones, quiso formar parte del grupo asesor. A mis amigos del Laboratorio de Química del CITA: Celina Sánchez, Gerardo Solís, Alonso Contreras, Marielos Torres y Mónica Lois, por hacer más gratas las largas horas de trabajo en el laboratorio. A mis dos muy apreciadas amigas Jacqueline Aiello y Yanine Chan, compañeras de estudio de la Maestría. A Rubén Gómez, Juan Francisco Víquez, Vera García, Juan Carlos Cordero, Juan Solano, José Valverde, Lorena Sánchez, Sandra Calderón, Nidia Gutiérrez, Martín Loría y Oscar Calderón, por contribuir de diversas maneras a que este proyecto llegara a un feliz término. El agradecimiento especial a Catalina García, Alejandro Leiva y Nuria Gutiérrez, por su desinteresado apoyo y disposición.

Gracias a Dios, porque sin merecerlo, me ha colmado de bendiciones y alegrías. A mi mamá, ejemplo constante de trabajo y dedicación, por sus oraciones y su gran amor. A mi papá, que me enseñó la importancia del estudio y del trabajo como medio de superación. A mis hermanos y hermanas, muy especialmente a Xinia, a quien nunca terminaré de agradecer el apoyo y el cariño que siempre ha tenido para conmigo, mi esposo y mis hijos. Gracias infinitas a mi familia, a mi esposo Jorge Eduardo, a mis hijos Jorge Arturo, Alejandro y Mariana, las personas más importantes en mi vida y la razón para estar eternamente agradecida con Dios. Los quiero mucho.

## **RECONOCIMIENTO**

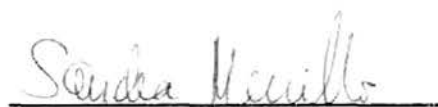
Esta investigación forma parte del Programa “Bean/Cowpea Collaborative Research Support Program” (CRSP) financiado por la Agencia Internacional para el Desarrollo (USAID) Grant N° DAN-G-SS-86-0008-88.



Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de *Magister Scientiae*

Aprobado por los siguientes Miembros del Tribunal

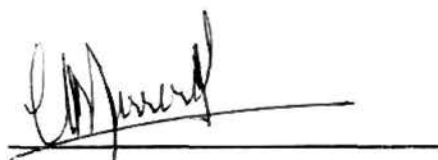
Dra. Sandra Murillo González  
*Representante de la Decana  
del Sistema de Estudios de Posgrado*



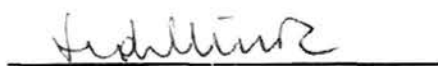
Dra. Ana Ruth Bonilla Leiva  
*Directora*



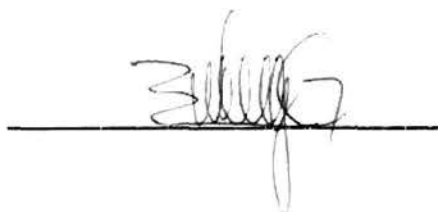
M. Sc. Carlos Herrera Ramírez  
*Asesor*



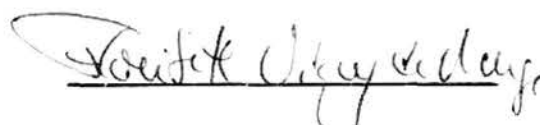
Dra. Leda Muñoz García  
*Asesora*



M. Sc. Eric Wong González  
*Director del Programa de Posgrado  
en Ciencia de Alimentos*



Lic. Floribeth Víquez Rodríguez  
*Candidata*



## INDICE GENERAL

<b>DEDICATORIA</b>	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>iii</b>
<b>RECONOCIMIENTO</b>	<b>iv</b>
<b>MIEMBROS DEL TRIBUNAL</b>	<b>v</b>
<b>INDICE GENERAL</b>	<b>vi</b>
<b>INDICE DE CUADROS</b>	<b>viii</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>x</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
<b>III. MARCO TEÓRICO</b>	<b>4</b>
3.1 Valor nutricional de las leguminosas	4
3.2 Factores que limitan la digestibilidad y aceptación de las leguminosas	4
3.3 Procesos que mejoran la digestibilidad del frijol y eliminan problemas asociados con la flatulencia	9
3.4 Polisacáridos no almidonosos (PNA)	14
3.5 Efectos fisiológicos de la fibra dietética	16
3.6 La celulosa y la pectina como sustratos de fermentación colónica	18
3.7 Uso de enzimas comerciales para hidrolizar la celulosa y la pectina en frijol	20
<b>IV. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>21</b>
4.1 Composición química en muestras de frijol entero crudo	21
4.1.1 Procedencia de los frijoles	21
4.1.2 Medición del tamaño de los frijoles	21
4.1.3 Preparación de las muestras de frijol para el análisis de composición química	21
4.1.4 Composición química	22
4.1.4.1 Determinación del contenido (% m/m) de sólidos y de humedad	22

4.1.4.2	Determinación del contenido (% m/m) de proteína	22
4.1.4.3	Determinación del contenido (% m/m) de grasa	22
4.1.4.4	Determinación del contenido (% m/m) de cenizas	23
4.1.4.5	Determinación del contenido (% m/m) de carbohidratos	23
4.2	Determinación de la digestibilidad <i>in vitro</i> en muestras de frijol cocido	23
4.2.1	Preparación de las muestras de frijol cocido	23
4.2.2	Determinación del contenido (% m/m) de residuo indigerible (R.I)	24
4.3	Determinación del contenido (% m/m) de pectina en el R.I.	24
4.4	Determinación del contenido (% m/m) de celulosa en el R.I.	24
4.5	Determinación del efecto de la enzima pectinolítica Pectinex Ultra SPL sobre la digestibilidad <i>in vitro</i> del frijol (variedades Chirripó y Brunca)	25
4.6	Determinación del efecto de la enzima pectinolítica Pectinex Ultra SPL sobre la aceptabilidad del frijol (variedades Chirripó y Brunca)	26
4.7	Determinación del efecto de la enzima Validase sobre la digestibilidad <i>in vitro</i> del frijol (variedades Chirripó y Brunca)	26
4.8	Determinación del efecto de la enzima Validase sobre la aceptabilidad del frijol (variedades Chirripó y Brunca)	26
4.9.1	Análisis estadístico del efecto de las enzimas sobre la digestibilidad <i>In vitro</i> de los frijoles	27
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>28</b>
5.1	Tamaño, tasa de absorción de agua y composición química de los frijoles	28
5.2	Digestibilidad <i>in vitro</i>	31
5.3	Contenido de pectinas en el residuo indigerible	31
5.4	Contenido de celulosa en el residuo indigerible	33
5.5	Actividad de la enzima Pectinex Ultra SPL y efecto de la concentración de pectinasa sobre la digestibilidad <i>in vitro</i> y aceptabilidad del frijol	34
5.6	Efecto de la concentración de Validase sobre la digestibilidad <i>in vitro</i> y aceptabilidad del frijol	35
5.7	Análisis general de la acción hidrolítica de las enzimas y posibles efectos inhibitorios	37
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>42</b>
<b>VII.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>44</b>
<b>VIII.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>45</b>
<b>APÉNDICE 1.</b>	<b>MÉTODOS DE ANÁLISIS</b>	<b>54</b>
<b>APÉNDICE 2.</b>	<b>CUADROS DE RESULTADOS</b>	<b>69</b>

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Tamaño promedio de los frijoles ( <i>Phaseolus vulgaris L.</i> )	28
<b>Cuadro 2.</b>	Tasa de absorción de agua de los frijoles ( <i>Phaseolus vulgaris L.</i> ) después de 16 h de remojo en una relación 1:3	29
<b>Cuadro 3.</b>	Composición química (% m/m) del frijol negro (base seca)	30
<b>Cuadro 4.</b>	Composición química (% m/m) del frijol rojo (base seca)	30
<b>Cuadro 5.</b>	Residuo indigerible (% m/m) en frijoles ( <i>Phaseolus vulgaris L.</i> ) negros y rojos (base seca)	31
<b>Cuadro 6.</b>	Contenido de pectina presente en el residuo indigerible de frijol negro y frijol rojo (base seca)	32
<b>Cuadro 7.</b>	Contenido de celulosa presente en el residuo indigerible de frijol negro y frijol rojo (base seca)	33
<b>Cuadro 8.</b>	Análisis sensorial para los frijoles negro y rojo tratados con Pectinex	35
<b>Cuadro 9.</b>	Análisis sensorial para los frijoles negro y rojo tratados con Validase	37

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Efecto de Pectinex sobre la digestibilidad <i>in vitro</i> del frijol	35
<b>Figura 2.</b> Efecto de Validase sobre la digestibilidad <i>in vitro</i> del frijol	37

## RESUMEN

Se determinó la composición química de dos variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), una variedad negra (Brunca) y una variedad roja (Chirripó). Se determinó el contenido de residuo indigerible mediante un estudio de digestibilidad *in vitro* y se analizó el contenido de celulosa y pectina presentes en el residuo indigerible. Se analizó además, el efecto de la adición de una celulasa y una pectinasa sobre la digestibilidad *in vitro* y la aceptación general del frijol. Desde el punto de vista de tamaño, las dos variedades analizadas son similares ( $p > 0,05$ ). Los frijoles negros tienen una tasa de absorción de agua mayor que los rojos ( $p < 0,05$ ), un mayor contenido de proteínas, un menor contenido de carbohidratos y un menor contenido de grasa en comparación con los rojos ( $p < 0,05$ ). Ambos presentaron contenidos de cenizas similares ( $p > 0,05$ ). El frijol negro presenta un contenido de residuo indigerible de 59,1% y el rojo de 59,8% ( $p > 0,05$ ) y de celulosa entre un 13,0 y un 11,7% m/m ( $p > 0,05$ ). Los frijoles rojos tienen más pectina (5,2% m/m) que los negros (4,4% m/m) ( $p < 0,05$ ). El empleo de una pectinasa a una concentración de 1,0 % m/m incrementó la digestibilidad *in vitro* de ambas variedades de frijol, entre un 12 y un 13%. El incremento en digestibilidad fue proporcional a la concentración de enzima. Sensorialmente, los frijoles fueron evaluados con una calificación menor que el frijol sin tratamiento ( $p < 0,05$ ). Al emplear un 1,0 % m/m de celulasa, se obtuvo un incremento en la digestibilidad *in vitro* del frijol rojo cercano al 12% y menor al 5% en el frijol negro ( $p < 0,05$ ). Los porcentajes de aceptación con celulasa fueron altos y ligeramente mayores al frijol sin tratamiento ( $p > 0,05$ ). Los resultados de esta investigación permitirán desarrollar alternativas industriales para lograr un mayor grado de digestibilidad del frijol, reducir significativamente la flatulencia y los efectos nocivos a la salud humana asociados a ella, y mejorar la aceptabilidad en las poblaciones donde los frijoles son parte de la cultura y tradición alimentaria.

## I. INTRODUCCIÓN

Las leguminosas, entre ellas los frijoles, constituyen una fuente importante de proteínas y calorías; contribuyen con un 15 a un 25% de la ingesta diaria de estos nutrientes, en la mayoría de los países del área centroamericana. Es un producto que tradicionalmente ha estado en la dieta de los costarricenses; es consumido por el 96,7% de los hogares (Ministerio de Salud, 1996), con un consumo promedio de 52,6 g *per cápita* por día (CITA, 1999). Son un recurso barato de fibra dietética, además de que son bajos en grasa y altos en carbohidratos complejos (Chau & Cheung, 1997; Gustafsson & Sandberg, 1995; Tovar, 1994; Cuauhtemoc, 1993; Marques *et al.*, 1993; Hughes, 1991; Reddy *et al.*, 1984).

No obstante su alto valor alimenticio, la digestibilidad de las leguminosas se ve afectada por la presencia de factores antinutricionales: inhibidores de tripsina, de  $\alpha$ -amilasa y hemaglutininas, fitatos y taninos. La aceptación de las leguminosas está también restringida por la presencia de compuestos que causan flatulencia, entre ellos, el almidón resistente, los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (rafinosa, estaquiosa y verbascosa) y los componentes de la fibra dietética (Carmona *et al.*, 1996; Occeña *et al.*, 1996 a, b; Tovar, 1994; Annison & Topping, 1994; Borejszo & Khan, 1992; Carmona *et al.*, 1991; Nnana & Phillips, 1990; Englyst & Cummings, 1990; Nanna & Phillips, 1990; Englyst & Hudson, 1987; Tomkinson, 1986; Ready *et al.*, 1984; Fleming, 1981; Bressani & Elías, s.f.).

El sistema digestivo humano carece de las enzimas capaces de hidrolizar cierto tipo de compuestos que están presentes en las leguminosas, entre ellos, carbohidratos complejos como la celulosa y la pectina, los cuales al no ser digeridos ni absorbidos por el organismo, pasan al intestino grueso, donde son fermentados por las bacterias colónicas allí presentes, produciendo grandes cantidades de gas, diarrea y dolores abdominales. Esto no sólo provoca una menor utilización de los nutrientes sino que también restringe la aceptación y el

consumo de los frijoles (Occeña *et al.*, 1996 a, b; Tovar, 1994; Borejszo & Khan, 1992; Nanna & Phillips, 1990; Tomkinson, 1986; Reddy *et al.*, 1984; Fleming, 1981).

En virtud de lo anterior y ante la escasa información acerca de los polisacáridos no almidonosos (PNA) que causan flatulencia en el frijol común costarricense (*Phaseolus vulgaris*, L.), se plantearon como objetivos fundamentales de este estudio, en primer lugar la cuantificación de dos de los principales PNA, celulosa y pectina, presentes en dos variedades de frijol común consumidas en el país (una variedad roja y una variedad negra). En segundo lugar, la determinación del efecto de la adición de dos enzimas comerciales, una pectinasa y una celulasa, sobre la digestibilidad *in vitro* y la aceptación del frijol.

Dada su importancia en la dieta costarricense, este esfuerzo, cuyo propósito es mejorar la digestibilidad y aceptabilidad del frijol, redundará en mayores beneficios nutricionales, particularmente en aquellos sectores tales como niños de corta edad, vegetarianos y cierto grupo de adultos mayores, cuya fuente primordial de proteína y de hierro son las leguminosas. Asimismo, la industria podrá disponer de un tratamiento que podría ser incorporado a los distintos procesos productivos, permitiendo que los consecuentes beneficios sean accesibles a la población en general.



## II. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Cuantificar los principales polisacáridos no almidonosos (celulosa y pectina) causantes de flatulencia en dos variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y determinar el efecto de la adición de una pectinasa y una celulasa comerciales sobre su digestibilidad y aceptabilidad.

### 2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Analizar la composición química (sólidos totales, humedad, proteína, grasa, cenizas y carbohidratos totales) de dos variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) consumidas en Costa Rica: la variedad Chirripó (roja) y la variedad Brunca (negra).

2.2.2 Conducir un estudio de digestibilidad *in vitro* para determinar el contenido de residuo indigerible.

2.2.3 Determinar el contenido de celulosa y pectina presentes en el residuo indigerible.

2.2.4 Determinar el efecto de la concentración de una pectinasa y una celulasa sobre la digestibilidad *in vitro*.

2.2.5 Con la concentración de enzima seleccionada, determinar la aceptación general del producto para cada variedad y cada enzima estudiada.

### III. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Valor nutricional de las leguminosas

Las leguminosas constituyen un alimento básico y tradicional en la dieta de muchos países, incluyendo la India, México, África, Centro y Suramérica (CITA, 1999; Gustafsson & Sandberg, 1995; Cuauhtemoc, 1993; Reddy *et al.*, 1984; Bressani & Elías, s.f.).

Desde el punto de vista nutricional, los frijoles son una fuente importante de nutrientes, principalmente proteínas. Contienen una alta proporción de carbohidratos, siendo el almidón el más abundante. Son también fuente de fósforo, hierro y ciertas vitaminas hidrosolubles. Contienen además, cantidades apreciables de fibra y poca cantidad de grasa (Navarrete, 1999; Gustafsson & Sandberg, 1995; Cuauhtemoc, 1993; Marques *et al.*, 1993; Borejszo & Khan, 1992; Reddy *et al.*, 1984; Bressani & Elías, s.f.). Contrario a las fuentes de proteína y de hierro de origen animal, los frijoles son una fuente relativamente barata de estos nutrientes (Gustafsson & Sandberg, 1995; Cuauhtemoc, 1993).

#### 3.2 Factores que limitan la digestibilidad y aceptación de las leguminosas

Existen factores adversos que limitan la digestibilidad de las leguminosas y como consecuencia, afectan también su aceptabilidad; por un lado, la presencia de factores antinutricionales y por otro, su composición en oligosacáridos, polisacáridos complejos y otros compuestos, que causan flatulencia (Navarrete, 1999; Carmona *et al.*, 1996; Carmona *et al.*, 1991; Nnana & Phillips, 1990; Bressani & Elías, s.f.; Reddy *et al.*, 1984; Fleming, 1981).

La digestibilidad del almidón de las leguminosas se ve afectada por la forma estructural de la pared celular y la presencia de factores antinutricionales: inhibidores de  $\alpha$ -amilasa, hemaglutininas, fitatos y taninos (Chau & Cheung, 1997). Después de los cereales, los frijoles comunes (*Phaseolus vulgaris*) son fuentes naturales de inhibidores de  $\alpha$ -amilasa, los cuales en el caso del frijol, se reportan como glicoproteínas, que se inactivan con el tratamiento térmico (Berre Anton *et al.*, 1997; Carmona *et al.*, 1996; Borieso & Khan, 1992; Lajolo *et al.*, 1991). Se ha propuesto que los inhibidores pueden ser una reserva de proteína o una defensa endógena contra insectos o reguladores metabólicos y han sido recomendados, por algunos autores, en el control de dietas y el tratamiento de pacientes diabéticos, ya que disminuyen la hidrólisis del almidón en el intestino y como consecuencia reducen la concentración de glucosa e insulina sérica, además de que aumentan el metabolismo de los ácidos grasos no esterificados del tejido adiposo (Lajolo *et al.*, 1991).

Los fitatos (hexafosfato de inositol) representan un grupo de compuestos que tienen una influencia negativa en las propiedades nutricionales de varios alimentos. En la naturaleza se encuentran gran cantidad de inositoles polifosforilados (Jiménez, 1996) como fitina, fitato o ácido fítico (ácido mio-inositol hexafosfórico). Al pH fisiológico, la molécula de fitato está cargada negativamente y forma quelatos con varios elementos minerales como hierro, zinc, magnesio y calcio, formando complejos insolubles que no son absorbibles (Ockenden *et al.*, 1997; Gustaffson & Sandberg, 1995; Sandberg & Svanberg, 1991). Los frijoles contienen cantidades importantes de fitatos; la cantidad de ácido fítico se encuentra entre 0,54 y 1,58% (Gustaffson & Sandberg, 1995). Jiménez (1996) encontró que el frijol crudo de la variedad Talamanca (negro) contiene 0,34% de ácido fítico, el cual se mantiene constante durante el remojo, pero disminuye con el proceso de germinación. Los fitatos también inhiben la acción de la pepsina sobre las proteínas (Vaintraub & Bulmaga, 1991).

Los taninos son polímeros ricos en compuestos fenólicos que se encuentran presentes en las hojas, madera, flores y semillas de plantas como frijol. El tipo de taninos presentes en el frijol son los taninos condensados (proantocianidinas), los cuales son polímeros flavonoides solubles en agua, con uniones carbono carbono unidos a monómeros individuales de flavonoides (Jiménez, 1996). Al igual que los fitatos, los taninos limitan la biodisponibilidad de los minerales; no se destruyen con el tratamiento térmico y son capaces de formar complejos con la proteína, interfiriendo con la digestibilidad del frijol (biodisponibilidad de los carbohidratos y proteínas), con la utilización de macronutrientes (Carmona *et al.*, 1996) y la biodisponibilidad de vitaminas y minerales (King Thom *et al.*, 1998). Los polifenoles también tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad de la fitasa (Gustafsson & Sandberg, 1995).

La lignina es un polímero complejo basado en unidades de fenilpropano (derivados de los alcoholes fenólicos sinapol, coumarol, coniferol y cinamol), por lo tanto no es un polisacárido (Asp & Gurr, 1994; Asp & Johansson, 1984). Normalmente está asociada al resto de los componentes estructurales de la pared celular y es altamente resistente a la digestión, por lo que muchos autores incluyen a la lignina dentro de la fibra dietética. La lignina puede interactuar con componentes polisacáridos e inhibir también la acción de ciertas enzimas (Sewalt *et al.*, 1997).

Otro factor que afecta la digestibilidad del frijol es la baja solubilidad y digestibilidad de las proteínas, la cual impide la hidratación de la molécula proteica y protege a los enlaces peptídicos del ataque enzimático (Marques *et al.*, 1993; Bressani & Elias, s.f.). La digestibilidad de la proteína de las leguminosas está limitada no sólo por la estructura proteínica, sino también por la presencia de factores antinutricionales tales como inhibidores de tripsina, fitatos y taninos (Chau & Cheung, 1997). Los fitatos inhiben la acción de la pepsina sobre las proteínas; siendo esta inhibición máxima a pH de 2 a 3. La actividad inhibitoria se manifiesta

cuando el fitato está enlazado a un sustrato protéico (Vaintraub & Bulmaga, 1991). Características propias del individuo también afectan la digestibilidad protéica, como por ejemplo, su capacidad para hidrolizar este tipo de compuestos debido a un tiempo de reacción insuficiente o al paso muy rápido a través del intestino.

La flatulencia es una de las principales restricciones que tiene el consumo de leguminosas. Los compuestos más importantes causantes de flatulencia en frijol son el almidón resistente, los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (rafinosa, estaquiosa y verbascosa) y los componentes de la fibra dietética (Occeña *et al.*, 1996 a y b; Tovar, 1994; Annison & Topping, 1994; Borejszo & Khan, 1992; Englyst & Cummings, 1990; Nanna & Phillips, 1990; Englyst & Hudson, 1987; Tomkinson, 1986; Ready *et al.*, 1984; Fleming, 1981).

Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa no son digeridos por el hombre porque la mucosa intestinal carece de la enzima hidrolítica  $\alpha$ -1,6-galactosidasa y son incapaces de pasar a través de la pared intestinal. Estos azúcares son metabolizados por la microflora del tracto intestinal bajo, produciendo grandes cantidades de dióxido de carbono e hidrógeno, metano en menor proporción y ácidos grasos volátiles (Occeña *et al.*, 1996 a y b; Tovar, 1994; Borejszo & Khan, 1992; Nanna & Phillips, 1990; Tomkinson, 1986; Fleming, 1981).

Los productos finales de la fermentación colónica influyen en la fisiología del intestino grueso y del metabolismo hepático (Tovar, 1994; Fleming, 1991). El grado de fermentación y el rango y naturaleza de los productos formados depende de los tipos de fibra consumidos. Los ácidos grasos de cadena corta: acético, propiónico y butírico producidos, reducen el pH y alteran el balance de microorganismos en el colon. El ácido butírico aparentemente es usado como fuente energética por las células del colon; mientras que los ácidos propiónico y acético son absorbidos en la sangre y pueden ser utilizados por el hígado y otros

tejidos como precursores de lípidos y azúcares, respectivamente; o pueden ser usados directamente como energía. En pequeñas cantidades, los gases producidos por la fermentación colónica (hidrógeno, dióxido de carbono y metano) pueden ser absorbidos en la circulación y expiran en los pulmones. En grandes cantidades, sin embargo, pueden causar flatulencia, dolor intestinal, diarrea, etc. (Tovar, 1994; Cummings, 1991; Fleming, 1991).

Se sabe que una cantidad importante del almidón escapa a la digestión; entre un 10% y un 15% del almidón de las leguminosas no se digiere ni absorbe en el intestino delgado (Navarrete, 1999; Tovar, 1994) e ingresa al intestino grueso, donde junto con los  $\alpha$ -galactósidos es fermentado por la microflora colónica. El almidón resistente, no digerido, consiste básicamente en amilosa retrogradada (que resiste el ataque enzimático y que se produce después de enfriar el almidón que ha sido calentado) y almidón físicamente inaccesible (Navarrete, 1999; Melito, 1998; Tovar, 1994; Holm *et al.*, 1987). El almidón resistente es fermentable en grado variable en el intestino grueso y contribuye por tanto, junto con los oligosacáridos, en la producción de flatulencia (Tovar, 1994).

Se ha comprobado que aún después de eliminar los oligosacáridos, todavía se produce flatulencia en cantidades apreciables (Reddy *et al.*, 1984; Fleming, 1981), por lo que se presume que, además de las proteínas indigeribles, el almidón resistente y los azúcares de la familia de la rafinosa, existen otros compuestos que también causan problemas de flatulencia. Entre ellos, han sido sugeridos ciertos componentes de la fibra dietética, denominados por Englyst y Cummings (1990) como los polisacáridos no almidonosos (PNA).

### 3.3 Procesos que mejoran la digestibilidad del frijol y eliminan problemas asociados a la flatulencia

La mayoría de los factores antinutricionales son destruidos, al menos parcialmente, durante la cocción (Carmona *et al.*, 1996). Otros procesos que mejoran la digestibilidad del frijol son: el cocimiento a presión o autoclavado, la extrusión, el tostado, la germinación, la selección genética, la fermentación y los tratamientos alcalinos y enzimáticos, entre otros (Rodríguez-Burger *et al.*, 1998; Chau & Cheung, 1997; Occeña *et al.*, 1996 a y b; Gustafsson & Sandberg, 1995; Jyothi & Sumathi, 1995; Barampama & Simard, 1995; Bonilla & Rodríguez, 1995; Shekib, 1994; Occeña, 1994; Sambudi, 1994; Marques *et al.*, 1993; Abia *et al.*, 1993; Borejszo & Khan, 1992; Sandberg & Svanberg, 1991; Nanna & Phillips, 1990; Li *et al.*, 1990).

El incremento en la digestibilidad debido al remojo, posterior eliminación del agua de remojo y tratamiento térmico, puede atribuirse no sólo a la eliminación de azúcares solubles con el agua de remojo, sino también debido a que la mayoría de los factores antifisiológicos son termolábiles y se eliminan con el tratamiento térmico (inhibidores de tripsina, inhibidores de amilasa pancreática, hemaglutininas y lectinas) (Navarrete, 1999; Rodríguez-Burger *et al.*, 1998; Cuahtemoc, 1993; Bonilla *et al.*, 1991; Jaffé, 1977).

Según Chau & Cheung (1997), el decrecimiento en los niveles de antinutrientes durante el tratamiento térmico se debe a la degradación térmica y desnaturalización de los mismos, así como también a la formación de complejos insolubles, y parcialmente, a un efecto de remoción durante la hidratación. El decrecimiento de los factores antinutricionales produce una mayor digestibilidad de la proteína y del almidón. Además, el hinchamiento de los gránulos del almidón al disociarse y romperse, el rompimiento de la estructura proteica, así como la desintegración física de la semilla y la activación de algunas enzimas hidrolíticas



endógenas, hacen el sustrato más accesible al sitio activo para la hidrólisis, con lo que se obtiene una mayor digestibilidad (Navarrete, 1999; Chau & Cheung, 1997; Barampama & Simard, 1995; Annison & Topping, 1994; Cuantemoc, 1993; Bonilla *et al.*, 1991; Tomkinson, 1986; Jaffé, 1977). Occaña (1994) señala que la gelatinización del almidón por sí sola no es el único factor que interfiere en el incremento de la digestibilidad del almidón. Al realizar una preincubación con pepsina, encontró que parte del almidón se encuentra encapsulado en la matriz de la proteína, la que al desintegrarse libera el almidón gelatinizado, el cual es hidrolizado por la  $\alpha$ -amilasa. Chau & Cheung (1997) encontraron que la digestibilidad *in vitro* del almidón es mayor que la digestibilidad *in vitro* de la proteína, debido en primer lugar a que las globulinas (proteínas de almacenamiento mayoritariamente presentes en las leguminosas), son intrínsecamente más resistentes a la proteólisis y en segundo lugar, al embebimiento y ruptura de los gránulos de almidón y a la activación de algunas enzimas hidrolíticas endógenas como la amilasa y la fosforilasa.

Periago *et al.* (1997) al estudiar los efectos de los métodos de cocción doméstico e industriales sobre el contenido de polisacáridos no almidonosos (PNA) y la digestibilidad *in vitro* del almidón en garbanzos, concluyeron que la optimización del tiempo y condiciones de cocción, así como también los métodos empleados en su determinación, son muy importantes cuando se quiere usar las leguminosas para mejorar el manejo de dietas. Estos autores encontraron que el tratamiento térmico produce un incremento tanto en los PNA totales como en los PNA solubles y el almidón lentamente digerible, pero produce una reducción en la fracción de PNA insoluble y del almidón resistente (AR), mostrando valores más altos de AR en los domésticos. Aparentemente, según ellos, algún material insoluble se depolimeriza y se vuelve soluble, como consecuencia del procesamiento. Concluyeron que los frijoles cocidos industrialmente tienen menos problemas de flatulencia.



Estos hallazgos están en contraposición con lo encontrado por Svandberg *et al.* (1997), quienes determinaron que los tratamientos térmicos severos (de microondas) solubilizan y degradan los polisacáridos no almidonosos solubles, especialmente las sustancias pécticas, debido a que las pectinas son sensibles a temperaturas elevadas en condiciones ligeramente ácidas y son degradadas a productos de bajo peso molecular a través de una reacción de  $\beta$ -eliminación. Según estos autores, los tratamientos térmicos severos también solubilizan la fibra dietética insoluble por rompimiento de los enlaces glicosídicos, con lo que el resultado final es un contenido menor de fibra dietética total.

Por otra parte, Marques *et al.* (1993), indican que el tratamiento térmico produce un incremento en la fracción de fibra insoluble, debido a la formación de complejos de esta fracción de la fibra con proteínas y aminoácidos.

Aún cuando algunos autores señalan que los taninos son resistentes al tratamiento térmico (Carmona *et al.*, 1996), tanto Bressani & Chon (1996) como Chau & Cheung (1997) encontraron que estos compuestos se reducen con la cocción, al igual que las catequinas, el almidón total y los azúcares totales. Li *et al.* (1993) encontraron que el remojo previo a la cocción decrece las actividades inhibitorias de la tripsina, quimiotripsina y  $\alpha$ -amilasa y que la combinación de ambos mejora significativamente la digestibilidad *in vitro* de la proteína de los frijoles.

El efecto del tratamiento térmico también se manifiesta sobre el contenido de fitatos. Gustafsson & Sandberg (1997) demostraron que el remojo y el tratamiento térmico logran activar las enzimas fitasas endógenas, reduciendo el contenido de fitatos.

Bressani *et al.* (1981) en un estudio sobre el efecto del tratamiento térmico sobre los inhibidores de tripsina y el contenido de taninos en muestras crudas de diferente coloración, encontraron que los frijoles rojos presentaron el mayor contenido de taninos, seguido de los negros y por último los blancos. Sin embargo, la concentración de taninos en frijoles negros y rojos cocidos fue muy similar, lo cual sugiere la activación de algunas enzimas endógenas que favorecen la eliminación de estos compuestos. Resultados similares fueron reportados por Mendoza *et al.* (1990) en un estudio de 20 cultivares de frijol. Estos autores encontraron que los frijoles rojos crudos presentan un mayor contenido de taninos en comparación con los negros, sin embargo, éstos se reducen con la cocción, permaneciendo un contenido mayor de taninos en los frijoles negros cocidos que en los rojos.

Las diferencias en los efectos del tratamiento térmico sobre los diferentes componentes, encontradas por los distintos autores, pone de manifiesto la importancia indiscutible de definir para cada variedad, las condiciones y tiempos de tratamiento térmico.

La germinación mejora la digestibilidad, reduce los niveles de fitatos, taninos, los inhibidores de tripsina y de  $\alpha$ -amilasa y los problemas asociados a la flatulencia (Chau & Cheung, 1997; Bonilla & Rodríguez, 1995; Khalil & Mansour, 1995). En un estudio desarrollado por Rodríguez (1994), se determinó que la digestibilidad *in vitro* del frijol germinado es mayor que la del frijol cocido. La misma autora encontró que el engrudo con un 50% de frijol con 72 horas de germinación es más digerible que el frijol cocido tradicional.

Los polifenoles también son reducidos con el remojo (Gustafsson & Sandberg, 1995). Estos autores encontraron que la adición de tanasa reduce los fitatos en un 49%, mientras que el remojo activa la fitasa intrínseca de las leguminosas,

reduciendo el contenido de fitatos hasta en un 98% (dependiendo del tiempo de remojo). El uso de fitasas también permite la reducción de fitatos, con lo que se incrementa la solubilidad del hierro (Sandberg & Svanberg, 1991). Las fitasas hidrolizan el fitato a mio-inositol y fosfato inorgánico (Gustafsson & Sandberg, 1995).

Sambudi (1994) encontró que el remojo del frijol en soluciones alcalinas (polvo de hornear y carbonato ácido de sodio) producía frijoles más suaves; probablemente por la reducción de los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  y el incremento en los niveles de  $\text{K}^{+1}$  y  $\text{Na}^{+1}$ . Además, las disoluciones alcalinas pueden reaccionar con diferentes compuestos con grupos fenólicos y carboxílicos para formar las sales correspondientes, aumentando por lo consiguiente su solubilidad y reduciendo el nivel de compuestos como los taninos (Jyothi & Sumathi, 1995). El color de los frijoles tratados con soluciones alcalinas es más oscuro y los niveles de aminoácidos esenciales menores (Sambudi, 1994). El empleo de carbonato de sodio, tanto a bajas como a altas temperaturas, es eficiente en la eliminación de fitatos (Jyothi & Sumathi, 1995). Se ha comprobado también que la retención de niacina y riboflavina es mayor en frijoles tratados con hidróxido de sodio (Jyothi & Sumathi, 1995).

La adición de tanasa (tanin-acil hidrolasa, EC 3.1.1.20) favorece la reducción de fitatos (Gustafsson & Sandberg, 1995) y se ha sugerido que puede ser usada para remover taninos (Barthomeuf *et al.*, 1994).

Los problemas de la flatulencia se reducen eliminando los sustratos de la fermentación. La rafinosa, estaquiosa y verbascosa son solubles en agua (Barampana & Simard, 1995; Tomkinson, 1986), por lo que en su mayoría, estos pueden ser eliminados mediante el remojo y posterior eliminación del agua de remojo.

Otros tratamientos como la germinación, la fermentación, la extrusión y los tratamientos enzimáticos, causan una reducción de los oligosacáridos (Occeña *et al.*, 1996 b; Borieso & Khan, 1992) y una mayor hidrólisis del almidón

La presencia de componentes no almidonosos, como proteínas, lípidos, celulosa, hemicelulosa y oligosacáridos de la familia de la rafinosa también pueden bloquear la hidrólisis del almidón (Navarrete, 1999; Melito, 1998; Tomkinson, 1986), de manera que una reducción en los primeros permitirá mejorar la hidrólisis del almidón.

### **3.4 Polisacáridos no almidonosos (PNA)**

Aún cuando desde el punto de vista cuantitativo los carbohidratos constituyen el componente principal de las leguminosas, la mayoría de los estudios nutricionales se han enfocado principalmente sobre sus proteínas (Tovar, 1994). Esto debido a una idea errada preconcebida de que los carbohidratos eran fácilmente digeribles y a un menor impacto de estos en la salud, comparados con las proteínas. Hoy se reconoce que el papel de los carbohidratos ha sido por mucho tiempo subestimado y se sabe que existen diferentes tipos y grados de digestibilidad de los mismos (rápidamente digeribles, lentamente digeribles e indigeribles) (Melito, 1998).

Los estudios sobre fibra dietética han avanzado con más lentitud que los estudios sobre otros componentes polisacáridos, probablemente por la falta de definición sobre qué se entiende por fibra dietética y las técnicas empleadas en su medición (Englyst & Cummings, 1990). Se sabe que la fibra dietética consiste en un grupo complejo de sustancias que difieren en su estructura química y morfológica y en su efecto fisiológico (Hernández *et al.*, 1992). Existe todavía mucha argumentación sobre cómo debe definirse la fibra dietética. Las opiniones se pueden agrupar fundamentalmente en dos líneas: una define a la fibra dietética

desde el punto de vista estructural, para lo cual toma en cuenta los orígenes de la fibra dietética en las paredes celulares de las plantas y define por tanto a la fibra dietética como los polisacáridos no almidonosos. La segunda definición está basada en los efectos fisiológicos y nutricionales de la fibra dietética, y se enfoca en la inhabilidad de la fibra dietética de ser absorbida, por lo que en esta segunda línea la definición incluiría a los polisacáridos y la lignina, que no pueden ser digeridos por las enzimas del intestino delgado (Gurr & Asp, 1994). Ninguna de las dos definiciones son mutuamente excluyentes y la tendencia a inclinarse por una u otra depende de los objetivos del investigador.

Hughes (1991) clasifica los componentes de la fibra dietética en: soluble e insoluble; estructural y no estructural. La porción insoluble está compuesta por celulosa, hemicelulosa insoluble y lignina; mientras que la pectina, la hemicelulosa soluble y otros polisacáridos como las gomas y mucilagos constituyen la porción soluble. No siempre los componentes solubles e insolubles son fáciles de distinguir; ciertos componentes parcialmente solubles también existen y no pueden categorizarse como fibra dietética soluble o insoluble. Los frijoles contienen entre un 3 y un 7% de fibra dietética soluble y un 13% de fibra dietética insoluble (Occeña *et al.*, 1996 b; Pak *et al.*, 1990; Acevedo & Bressani, 1990).

La fibra dietética estructural está íntimamente relacionada con el mantenimiento de la estructura celular y no puede ser fácilmente separada de los otros componentes celulares; mientras que la fibra dietética no estructural se encuentra típicamente entre las células, o son excretadas por ellas y por eso son fáciles de extraer y de aislar. La fibra estructural incluye la lignina, la celulosa y la hemicelulosa insolubles y otros no polisacáridos como la lignina. La no estructural incluye la pectina, la hemicelulosa soluble, las gomas y mucilagos (Occeña *et al.*, 1990; Lanza & Butrum, 1986).

### 3.5 Efectos fisiológicos de la fibra dietética

Hace varias décadas, se introdujo la hipótesis de que las dietas modernas bajas en fibra dietética podrían ser un factor importante en el desarrollo de ciertos padecimientos y enfermedades degenerativas características de sociedades industrializadas. El interés sobre los beneficios de la fibra ha evolucionado y actualmente el enfoque está dirigido hacia el funcionamiento correcto del sistema digestivo y su efecto protector sobre algunos tipos de cáncer como el de colon y el de mama, enfermedades cardiovasculares y el tratamiento de la diabetes entre los más importantes (Kellogg's, 1997; Kritchevsky, 1997; Pietinen *et al.*, 1996; Mata, 1995; Mejía *et al.*, 1989).

Cabe destacar que los diferentes tipos de fibra, de distintos orígenes, tienen diferentes efectos fisiológicos. El efecto depende de la historia natural del desorden clínico, del tipo de fibra, de su forma en la sangre, de las circunstancias personales del individuo, su estilo de vida, así como también del consumo de grasa y la actividad física, entre otros (Kellogg's, 1997; Gurr & Asp, 1994; Eastwood, 1994; Cummings, 1992; Nattall, 1992; Rose, 1992; Schweizer & Edwards, 1991).

Desde el punto de vista fisiológico, se sabe que la fracción de fibra dietética soluble en agua (pectinas, gomas, mucilagos y algunas hemicelulosas) disminuye el colesterol sérico y el riesgo de enfermedades coronarias; así como también tiene efectos beneficiosos sobre el tratamiento de la Diabetes mellitus. La fibra dietética insoluble (celulosa y algunas hemicelulosas) acelera el tránsito intestinal, aumenta el volumen de las heces, desacelera la hidrólisis del almidón, retrasa la absorción de glucosa y es efectiva en la reducción del cáncer de colon y otros tipos de cáncer (Kellogg's, 1997; Eastwood, 1993; Mora & Uribe, 1993; Anderson, 1993; Frati Munari, 1993; Hernández *et al.*, 1991; Kritchevsky, 1991;

Nuttal, 1991; Rose, 1991).

La utilización de la glucosa por el tejido depende de la secreción de la hormona insulina en la sangre. Si se produce más glucosa de la necesaria, se debe producir más insulina, por lo que los niveles de hormona producidos aumenta, condición que a menudo se asocia con obesidad, concentraciones altas de triglicéridos en la sangre e hipertensión (Gurr & Asp, 1994; Tovar, 1994). Estos autores señalan que el consumo de fibra soluble como pectinas y gomas, aumenta la viscosidad y limita el incremento de glucosa e insulina en la sangre, lo cual resulta efectivo en el control de la Diabetes mellitus. El efecto depende del consumo de una determinada cantidad mínima de fibra soluble. Las pectinas y otras fibras solubles también reducen la concentración de colesterol. Aparentemente, estos tipos de fibra ligan los ácidos biliares, reduciendo su reabsorción y obligando a emplear más colesterol en la producción de ácidos biliares. Se requiere también de un consumo mínimo de fibra soluble para obtener tal efecto. El consumo de grasa y el ejercicio físico tienen una influencia importante en el efecto final obtenido y en la cantidad ideal recomendada. La mayoría de las recomendaciones del consumo de fibra es de 20 a 40 g/día en personas adultas (Kellogg's, 1997), aunque depende también del tipo de fibra consumida y de los otros alimentos que se ingieran con ella.

Aparentemente, algunos productos de la fermentación de la fibra, tales como el ácido butírico, inhiben el desarrollo de células tumorosas, inhibición que se potencializa por el pH bajo que resulta de la producción de ácidos grasos de cadena corta (Gurr & Asp, 1994).

Una de las hipótesis que concierne al desarrollo de cáncer en el colon o el recto es que excesivas cantidades de ácidos biliares en el intestino grueso, en individuos susceptibles, son convertidas en sustancias que ayudan en la transformación de



células normales en células cancerosas, de manera que la reducción de los ácidos biliares por ligamento con componentes de la fibra, contribuyen en la prevención de ciertos tipos de cáncer (Gurr & Asp, 1994).

### **3.6 La celulosa y la pectina como sustratos de fermentación colónica**

En las plantas, la mayoría de los polisacáridos están asociados en una estructura compleja de la pared celular (Gurr & Asp, 1994).

Los frijoles constituyen una fuente de fibra de naturaleza estructural, difíciles de aislar o extraer, ya que están íntimamente relacionados con el mantenimiento de la estructura celular y no pueden separarse fácilmente de los otros componentes celulares (Hughes, J. 1991).

Las enzimas que digieren los polisacáridos en el intestino delgado humano son específicas para el tipo de estructura química presente en el almidón y son incapaces de digerir los polisacáridos no almidonosos (Gurr & Asp, 1994).

La celulosa y la pectina forman parte de los polisacáridos no almidonosos presentes en semillas de frijol. Se trata de polisacáridos complejos, los cuales difieren no sólo por el número de monosacáridos que se encuentran unidos en la molécula, sino también por los diferentes tipos de monómeros presentes en la misma, el orden en la cadena polimérica, la presencia de ramificaciones y los tipos de enlaces entre cada unidad de monosacáridos.

La celulosa es el mayor polisacárido estructural de la pared celular de las plantas. Es un polímero lineal que consiste exclusivamente de unidades de glucosa, alrededor de 10 000 unidades, unidas por enlaces  $\beta$  1-4. Las moléculas lineales de celulosa están empaquetadas muy juntas en largas filas, estabilizadas por



atracciones químicas entre las cadenas, lo que la hace una estructura muy insoluble (Gurr & Asp, 1994).

Las pectinas son polímeros que se encuentran combinados con la celulosa en las paredes celulares. Se trata de un polisacárido lineal del ácido D-galacturónico, unido por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1.4 espaciados por unidades de azúcar ramnosa, aunque también pueden contener como cadena lateral otros sacáridos tales como arabinosa y galactosa. Las unidades de ácido galacturónico están presentes parcialmente como ácido libre o como metil ésteres; el ácido libre puede ionizarse y mezclarse con minerales como calcio y magnesio. Las pectinas se caracterizan por su solubilidad en agua caliente y la formación de geles al enfriarse (Gurr & Asp, 1994). Cuando están presentes en la pared celular son más o menos insolubles debido a la formación de complejos con calcio. Pueden solubilizarse con agentes quelantes tales como el oxalato de amonio o el EDTA.

Se ha comprobado que la mayoría de las pectinas, gomas y hemicelulosas, son altamente fermentables por bacterias colónicas, la celulosa es fermentable en menor proporción, mientras que la lignina y las cenizas no son fermentables (Gurr & Asp, 1994; Tomkinson, 1986). Este último autor determinó que las pectinas, gomas y xilanos, producen un volumen de gas mucho mayor durante la fermentación. La velocidad de fermentación de la celulosa fue mucho más lenta que la de la pectina, la hemicelulosa y las gomas. Dicho autor concluyó que la producción de gas no es función de un único componente sino de la combinación de muchos factores y que cada componente en particular tiene diferentes grados de fermentabilidad y produce diferentes cantidades de gas.

### **3.7 Uso de enzimas comerciales para hidrolizar la celulosa y la pectina en frijol**

No existen referencias en la literatura sobre el uso de pectinasas y/o celulasas comerciales, con el propósito de mejorar la digestibilidad del frijol. La eliminación y/o reducción de dos de los más importantes sustratos de fermentación colónica permitirá reducir los problemas asociados a la flatulencia, además de mejorar la digestibilidad general del frijol, pues los compuestos que resultan de dicha hidrólisis sí son absorbidos en el nivel del intestino delgado.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Composición química en muestras de frijol entero crudo**

#### **4.1.1 Procedencia de los frijoles**

Los frijoles utilizados en este estudio corresponden a las variedades Chirripó (rojos) y Brunca (negros). ambos proceden de la Estación Experimental Fabio Baudrit de la Universidad de Costa Rica, ubicada en la Garita de Alajuela.

#### **4.1.2 Medición del tamaño de los frijoles**

Se tomaron al azar 16 frijoles de cada variedad y utilizando un Vernier, se midió tanto el largo como el ancho. Se calculó el análisis de varianza (ANDEVA) al 95% de confiabilidad.

#### **4.1.3 Preparación de las muestras de frijol para el análisis de composición química**

Un lote de frijoles de 46 kg por variedad, cosechados en enero de 1998, fueron tratados en la planta piloto del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), donde se seleccionaron mediante cuarteos consecutivos en una mesa de selección, hasta obtener una muestra de 2 kg. Estos frijoles fueron empacados en bolsas de polietileno de alta densidad y se introdujeron en un balde de plástico de 20 galones, el cual se selló herméticamente y se mantuvo en refrigeración a 5°C hasta su análisis. Con el propósito de obtener una muestra homogénea, se tomaron 200 g de frijoles enteros, se seleccionaron y se hicieron pasar a través de un molino (Cienceware Micro Mill, Belt Art Products, New Jersey) dotado de un sistema de enfriamiento para no degradar los componentes del frijol. A la muestra molida se le determinó la composición química.

#### **4.1.4 Composición química**

La descripción completa de los métodos de análisis de las determinaciones que se realizaron se mencionan a continuación y se detallan en el Apéndice 1.

##### ***4.1.4.1 Determinación del contenido (% m/m) de sólidos y de humedad***

Se usó el método AOAC 925.09, 1990, modificado por el laboratorio de Química del CITA en enero de 1996. El método consistió en medir la pérdida de masa debida a la evaporación de agua en una estufa al vacío. El vacío permitió trabajar a temperaturas menores de 100 °C y evitar la descomposición de determinados productos. Se pesó una determinada cantidad de muestra y se secó en una estufa al vacío a 98 °C, hasta alcanzar peso constante.

##### ***4.1.4.2 Determinación del contenido (% m/m) de proteína***

El contenido de nitrógeno se determinó siguiendo el método de Kjeldahl (referencia 920.87 del AOAC, 1990, modificado por el CITA en febrero de 1996). Consistió en la destrucción oxidativa de las sustancias orgánicas de la muestra mediante la utilización de ácido sulfúrico concentrado hirviendo, con la consiguiente reducción del nitrógeno orgánico a amonio. El amonio se destiló, previa adición de un álcali no volátil y fue retenido en ácido sulfúrico normalizado. Se tituló el ácido sobrante utilizando una solución valorada de NaOH.

##### ***4.1.4.3 Determinación del contenido (% m/m) de grasa***

Se utilizó la referencia 920.87 del método del AOAC, 1990, modificado por el CITA en 1996. El método consistió en una hidrólisis ácida con ácido clorhídrico (2+3), para extraer todos los componentes lipídicos presentes en la muestra (libres y combinados), los cuales se extrajeron luego con un solvente poco polar (éter de petróleo) en un extractor.

#### **4.1.4.4 Determinación del contenido (% m/m) de cenizas**

Se utilizó el método 923.03 del AOAC, 1990, modificado por el CITA en febrero de 1996. El método consistió en la medición de la masa del residuo inorgánico que queda después de quemar la muestra a temperaturas entre los 500 y 600 °C. Las sales orgánicas se descomponen durante la incineración, perdiéndose la parte carbonatada. El metal de esas sales forma óxidos o reacciona con otros aniones de la matriz.

#### **4.1.4.5 Determinación del contenido (% m/m) de carbohidratos**

Se calculó por diferencia. Al 100% se le restó el contenido de proteínas, cenizas y grasa.

### **4.2 Determinación de la digestibilidad *in vitro* en muestras de frijol cocido**

#### **4.2.1 Preparación de las muestras de frijol cocido**

Se trabajaron por triplicado muestras de frijol rojo (variedad Chirripò) y Brunca (variedad negra). Se remojó el frijol durante 16 h, utilizando una relación 1:3, frijol:agua. Posteriormente se eliminó el agua de remojo, en la que se solubilizaron los mono y disacáridos y los oligosacáridos solubles. Los frijoles se sometieron luego a cocción en una olla de presión (15 lb/plg<sup>2</sup>) durante 5 min a partir del momento en que se alcanza la presión, utilizando una relación 1:1, frijol: agua. Se hizo uso de un homogeneizador de alta velocidad para obtener una pasta fina, la cual fue deshidratada en una estufa de convección a 85 °C, durante 16 h. El análisis del contenido (% m/m) de residuo indigerible se realizó a las muestras de frijol cocido, secas y morterizadas.

#### **4.2.2 Determinación del contenido (% m/m) de residuo indigerible (R.I.)**

El objetivo de la digestibilidad *in vitro* fue simular la digestión humana del almidón y de la proteína y obtener los componentes del residuo indigerible, entre los que se encontraban los principales polisacáridos no almidonosos causantes de flatulencia. Se hizo una combinación de los métodos descritos por Tomkinson (1986) y Kohn *et al.* (1971), utilizando las enzimas pepsina, para la digestión de la proteína y pancreatina, que es una mezcla de amilasa, proteasa y lipasa, para la hidrólisis del almidón, proteína y lípidos.

#### **4.3 Determinación del contenido (% m/m) de pectina en el residuo indigerible**

Las pectinas fueron extraídas con agua caliente y oxalato de amonio como agente quelante. Posteriormente se utilizó un ácido fuerte para la hidrólisis de la pectina a sus ácidos urónicos; con el calentamiento en presencia de un ácido fuerte, se llevó a cabo una reacción de deshidratación produciéndose carboximetilfurfural. Mediante la aplicación de un compuesto fenólico en un medio fuertemente ácido, se produjo la condensación del grupo carbonilo del carboximetilfurfural, desarrollándose un complejo coloreado que se leyó espectrofotométricamente. Se hizo uso de una curva patrón de ácido galacturónico para determinar el contenido de pectinas presentes en el residuo indigerible (Tomkinson, 1986).

#### **4.4 Determinación del contenido (% m/m) de celulosa en el residuo indigerible**

Las celulosas fueron extraídas siguiendo el método descrito por Tomkinson (1986). Se trataron primero con ácido sulfúrico al 5% v/v en un baño a ebullición para disolver las hemicelulosas y gomas, las cuales se descartaron por filtración. El residuo se trató con ácido sulfúrico al 72% para disolver la celulosa, la cual fue hidrolizada a glucosa mediante la adición de ácido sulfúrico concentrado. La adición en caliente de ácido sulfúrico produjo la deshidratación de la celulosa a

hidroximetilfurfural, el cual desarrolló un complejo coloreado con el fenol. Se hizo uso de una curva patrón de glucosa para determinar el contenido de celulosa presente en el residuo indigerible.

#### **4.5 Determinación del efecto de la enzima pectinolítica Pectinex Ultra SPL sobre la digestibilidad *in vitro* del frijol (variedades Chirripó y Brunca)**

Para medir el efecto de la enzima pectinolítica Pectinex Ultra SPL, se trabajó con un engrudo de frijol tratado bajo las mismas condiciones de remojo y cocción descritas anteriormente. El engrudo presentó un contenido de sólidos entre 74-77% y un pH de 6,3-6,4. La temperatura usada fue la recomendada por la casa distribuidora (40 °C) y se mantuvo un tiempo de acción de 60 min. Se determinó la actividad de la enzima (apartado 10 del Apéndice) como la reducción de la viscosidad relativa por unidad de tiempo, de 4,5/min. Se pesaron 100 g de este engrudo y se le adicionó la enzima. Se probaron tres diferentes concentraciones de la enzima: 0,25%, 0,5% y 1,0% m/m. Concluido el tiempo de acción enzimática, se inactivó la enzima mediante la adición de HCl concentrado hasta un pH de 1,9-2,0. Se deshidrataron las muestras en una estufa de convección a 85 °C, durante toda la noche. Se enfrió y se molieron las muestras en un molino (Cienceware Micro Mill, Belt Art Products, New Jersey). Posteriormente se pasaron a través de una malla de 40 mesh, para obtener una muestra homogénea y se les determinó el contenido de residuo indigerible mediante un estudio de la digestibilidad *in vitro*, por el método descrito. A excepción de la adición de la enzima, el frijol sin tratamiento (control) fue mantenido durante 60 min en un baño a 40 °C, tratado con HCl hasta bajar el pH a 1,9-2,0 y deshidratado y molido bajo las mismas condiciones.

Se seleccionó la concentración de enzima que logró la mayor digestibilidad *in vitro* del frijol (el menor contenido de residuo indigerible). Esta concentración fue usada posteriormente para medir el efecto sobre la calidad y el agrado general.

#### **4.6 Determinación del efecto de la enzima Pectinex Ultra SPL sobre la aceptabilidad del frijol (variedades Chirripó y Brunca)**

Con la concentración de enzima seleccionada en la etapa anterior, se prepararon muestras de frijol molido de la siguiente manera: 1 kg de frijoles remojados se cocinaron con 1 kg de agua, 40 g de cebolla, 40 g de chile dulce, 3 g de ajo y 5 g de culantro. Una vez cocidos, se molieron en un molino de martillos (Fitz Mill, Fitz Patrick) empleando una malla de 0.33 plg. Se dividieron en dos fracciones de 1 kg cada una. Una de ellas fue el control (sin enzima) y la otra se trató con 1,0% m/m de Pectinex. Ambas muestras se colocaron en un baño a 40 °C durante 1 h. Posteriormente se calentaron a 90 °C por 10 min para inactivar la enzima adicionada. Se les adicionaron 6 g de sal, 3 g de azúcar y 25 g de grasa (margarina) y se sometieron a la evaluación sensorial por parte de panelistas entrenados. Los jueces, 24 en total, evaluaron las muestras según el agrado general y la calidad general, utilizando una escala hedónica estructurada de 150 puntos. Los resultados se analizaron mediante un análisis de ANDEVA al 95% de confiabilidad.

#### **4.7 Determinación del efecto de la enzima Validase sobre la digestibilidad *in vitro* del frijol (variedades Chirripó y Brunca)**

Para medir el efecto de la enzima Validase TRL, se trabajó de la misma manera que con la enzima Pectinex (Apartado 4.5).

#### **4.8 Determinación del efecto de la enzima Validase sobre la aceptabilidad del frijol (variedades Chirripó y Brunca)**

Con la concentración de enzima seleccionada en la etapa anterior, se efectuó el panel de degustación de la misma manera descrita para Pectinex en el apartado 4.6.



#### 4.9 Análisis estadístico del efecto de las enzimas sobre la digestibilidad *in vitro* de los frijoles

Para el análisis estadístico de los datos, se utilizó el paquete estadístico SPSS. Se calculó el ANDEVA al 95% de confianza. La actividad de las enzimas Pectinex Ultra SPL y Validase TRL se analizaron mediante el siguiente modelo:

$$y_{ij} = \mu + \beta x_{ij} + \alpha z_i + \delta v_j + \varepsilon_{ij} + \theta z v$$

donde  $y_{ij}$  = contenido de residuo indigerible (% m/m)

$\mu$  = media general

$x$  = concentración (% m/m) de enzima empleada

$z$  = enzima

$v$  = variedad

$\beta$  = efecto de la concentración

$\alpha$  = efecto de la enzima

$\delta$  = efecto de la variedad

$\varepsilon_{ij}$  = el error

$\theta$  = la interacción enzima:variedad

## V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 5.1 Tamaño, tasa de absorción de agua y composición química de los frijoles

Las dos variedades de frijol analizadas en este estudio mostraron tamaños muy similares (Cuadro 1), obteniéndose en promedio 10,9 mm de largo y 6,88 mm de ancho para los negros y 10,5 mm de largo y 6,7 mm de ancho para los rojos ( $p > 0,05$ ).

**Cuadro 1. Tamaño promedio\* de los frijoles (*Phaseolus vulgaris* L.)**

	Frijol negro		Frijol Rojo	
	Largo	Ancho	Largo	Ancho
Media, mm	10,9	6,88	10,5	6,7
Desviación estándar	0,7	0,37	0,8	0,5
Error	0,2	0,09	0,2	0,1
Intervalo de confianza al 95%	10,5 - 11,3	6,69 - 7,08	10,1 - 10,9	6,4 - 7,0

\* n= 17

Los frijoles negros presentaron una tasa de absorción de agua mayor (2,095) en comparación con los rojos cuya tasa de absorción fue de 1,95 ( $p < 0,05$ ) (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Tasa de absorción de agua de los frijoles (*Phaseolus vulgaris* L.) después de 16 h de remojo en una relación 1:3**

Frijol	n	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza para la media *
Negro	12	2,095	0,024	0,007	2,080 - 2,110
Rojo	12	1,95	0,05	0,01	1,92 - 1,99

\* al 95 % de confianza

En un estudio desarrollado por Sambudi (1994), se encontró que los frijoles más pequeños son más duros de cocer, ya que tienen niveles más altos de calcio y magnesio y menores niveles de absorción de agua. Según Bressani *et al.* (1981), un frijol de mayor tamaño tiene tasas de absorción de agua menores y un menor contenido de proteínas, ya que acumula más carbohidratos. En este estudio se encontró que efectivamente, los frijoles con mayor contenido de proteínas, son los que presentan tasas de absorción de agua mayores. No se pudo establecer la relación con respecto al tamaño, pues si bien es cierto los frijoles negros son ligeramente más grandes (Cuadro 1), las diferencias encontradas no son significativas ( $p > 0,05$ ).

La composición química del frijol (*Phaseolus vulgaris*) se presenta en los Cuadros 3 y 4. Las dos variedades analizadas (Brunca y Chirripó) difieren en su contenido de proteínas ( $p < 0,05$ ). Los frijoles negros (Brunca) presentan un contenido de proteínas de 24,4%, mientras que el contenido de proteínas en los rojos (Chirripó) fue de 21,8%. Los negros tienen a su vez una menor cantidad de carbohidratos, 69,8% contra un 71,3% presentes en los rojos ( $p < 0,05$ ). El contenido de cenizas en ambas variedades es muy similar ( $p > 0,05$ ), no así el contenido de grasa, el cual fue menor para los negros. 1,83% contra un 2,95% presente en el rojo ( $p < 0,05$ ). La composición química es muy similar a la encontrada por Moro *et al.* (1997) y Occeña *et al.* (1994) en otro tipo de leguminosas.

**Cuadro 3. Composición química (% m/m) del frijol negro (base seca)**

	Sólidos totales	Humedad	Proteína	Grasa	Ceniza	Carbohidratos totales
Media, % m/m	86,58	13,42	24,4	1,83	3,910	69,8
Desviación estándar	0,14	0,14	0,3	0,23	0,014	0,2
Error	0,05	0,05	0,1	0,09	0,005	0,2
Intervalo confianza	86,48	13,32	24,2	1,62	3,898	69,6
al 95%	86,68	13,52	24,7	2,05	3,922	70,1
n	10	10	8	8	8	6

**Cuadro 4. Composición química (% m/m) del frijol rojo (base seca)**

	Sólidos totales	Humedad	Proteína	Grasa	Ceniza	Carbohidratos totales
Media, % m/m	87,37	12,63	21,8	2,95	3,86	71,3
Desviación estándar	0,22	0,22	0,3	0,25	0,20	0,4
Error	0,07	0,07	0,1	0,09	0,07	0,2
Intervalo confianza	87,22	12,47	21,5	2,74	3,69	70,9
al 95%	87,53	12,79	22,0	3,16	4,02	71,8
n	10	10	8	8	8	6

## 5.2 Digestibilidad *in vitro*

El contenido de residuo indigerible (R.I.) presente en frijoles negros y rojos fue muy similar ( $p > 0,05$ ). Los frijoles negros tienen en promedio un contenido de R.I. de 59,1% y los rojos de 59,8% (Cuadro 5). Navarrete (1999) encontró valores semejantes de R.I. en frijol negro de la misma variedad (Brunca), tratado bajo condiciones similares. Sin embargo, estos valores difieren con respecto a los valores encontrados por otros autores (Tomkinson, 1986; Bressani *et al.*, 1981). Las diferencias en los valores de R.I. obtenidos por los diferentes autores se deben a varios factores: las diferencias implícitas en cada variedad, el método y enzimas empleadas en el análisis, el tamaño de partícula y la preparación de la muestra, entre otros (Navarrete, 1999; Melito, 1998; Occeña, 1994; Tomkinson, 1986; Kon *et al.*, 1971).

**Cuadro 5. Residuo indigerible (% m/m) en frijoles (*Phaseolus vulgaris* L.) negros y rojos \* (base seca)**

Variedad de frijol	n	Media % m/m	Desviación estandar	Error estandar	Limites de confianza (95%)
Negro	13	59.1	1,5	0,4	58.1 - 60.0
Rojo	14	59.8	2.3	0,6	58.4 - 61,1

\*muestras cocidas, secas y morterizadas

## 5.3 Contenido de pectina en el residuo indigerible

El ámbito lineal de la curva de ácido galacturónico empleada en la determinación de pectina es de 10 a 40 ppm ( $r^2 = 0,9997$ ) (Figura 1A del Apéndice) y es una curva de tipo homocedástica (Figura 2A del Apéndice). El límite de detección y de cuantificación para pectina, calculado como se describe en el apartado 7 del Apéndice 1, es de 1,146  $\mu\text{g/mL}$  y 3.821  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. En el ensayo de repetitividad, la desviación estándar relativa fue de 3,8% para el frijol negro y de

5.8% para el frijol rojo. El porcentaje total de recuperación para el frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) fue de 73,2% (Apéndice 1).

Los frijoles rojos tienen un mayor contenido de pectinas que los negros ( $p < 0.05$ ); los valores correspondientes son de 5,22 para rojos y de 4,37% para los negros (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Contenido de pectina\* presentes en el residuo indigerible de frijol negro y frijol rojo (base seca)**

Variedad de frijol	n	Media % m/m	Desviación estándar	Error estándar	Limites de confianza (95%)
Negro	9	4,37	0,12	0,04	4,23 - 4,49
Rojo	10	5,22	0,22	0,07	5,00 - 5,44

\* recalculados según el porcentaje de recuperación de 73,2%

Los valores de fibra soluble reportados por otros autores están entre un 3 y un 7% (Occeña *et al.*, 1996; Acevedo & Bressani, 1990; Pak *et al.*, 1990). Según Walters *et al.* (1992) y Asp & Johansson (1984), los diferentes métodos de análisis, las diferencias en los métodos de extracción y la cantidad de muestra, afectan la precisión y exactitud del análisis y conducen por consiguiente, a diferencias en las cantidades de fibra soluble e insoluble encontradas. La fibra soluble no se compone exclusivamente de pectina, incluye además a otros polisacáridos como gomas, mucílagos y ciertas hemicelulosas, que no fueron cuantificadas en este estudio.

Según Gurr & Asp (1994) y Tomkinson (1986), las pectinas son altamente fermentables por las bacterias colónicas, por lo que es de esperar que los frijoles rojos produzcan más gas por fermentación de pectinas que los negros.

#### 5.4 Contenido de celulosa en el residuo indigerible

El ámbito lineal de la curva de glucosa empleada en la determinación de celulosa es de 10 a 50 ppm ( $r^2 = 0,9992$ ) (Figura 3A del Apéndice). La curva es de tipo homocedástica (Figura 4A del Apéndice). El límite de detección y de cuantificación para celulosa por este método es de 0,0255  $\mu\text{g/mL}$  y 0,085  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (apartado 9 del Apéndice 1).

El contenido de celulosa presente en el residuo indigerible en frijoles negros es de 13,0% y en los rojos de 11,7% (Cuadro 7) ( $p > 0,05$ ). Estos valores son muy similares a los encontrados por Tomkinson (1986) de 11,8 a 13,8% y por Occeña *et al.* (1996) de 13%.

**Cuadro 7. Contenido de celulosa presente en el residuo indigerible de frijol negro y frijol rojo (base seca)**

Variedad de frijol	n	Media % m/m	Desviación estándar	Error estándar	Límites de confianza (95%)
Negro	6	13,0	1,6	0,7	11,3 - 14,7
Rojo	6	11,7	1,4	0,6	10,2 - 13,2

Según Tomkinson (1986) las pectinas presentes en frijol *Phaseolus vulgaris* son fermentables en alrededor del 85%, mientras que las celulosas lo son en aproximadamente un 60%. De acuerdo con los resultados obtenidos, la celulosa contribuiría alrededor de 2 veces más a la formación de flatulencia que las pectinas.

### 5.5 Actividad de la enzima Pectinex Ultra SPL y efecto de la concentración de pectinasa sobre la digestibilidad *in vitro* y aceptabilidad del frijol

Se determinó una actividad para la pectinasa equivalente a la reducción de viscosidad de 4.5/min. (Apartado 10, Apéndice 1, Figura 5A).

Al analizar el efecto de adición de la enzima Pectinex, se determinó que no existe un efecto debido a la variedad ( $p > 0.05$ ), pero sí debido a la concentración de enzima utilizada ( $p < 0.05$ ). A mayor concentración de enzima, se obtiene una reducción mayor en el contenido de residuo indigerible obtenido, lo que implica una mejora en la digestibilidad *in vitro*. Al emplear un 1.0% m/m de pectinasa (Pectinex Ultra SPL) se obtuvo un incremento en la digestibilidad *in vitro* del frijol entre un 12 y un 13% en ambas variedades (Figura 1, Cuadro A42 del Apéndice). El coeficiente de correlación de Pearson es de  $-0.832$ . Del análisis de regresión múltiple se obtiene la ecuación que mide el efecto de la concentración de la pectinasa sobre el contenido de residuo indigerible obtenido ( $R^2 = 69\%$ ) como sigue:

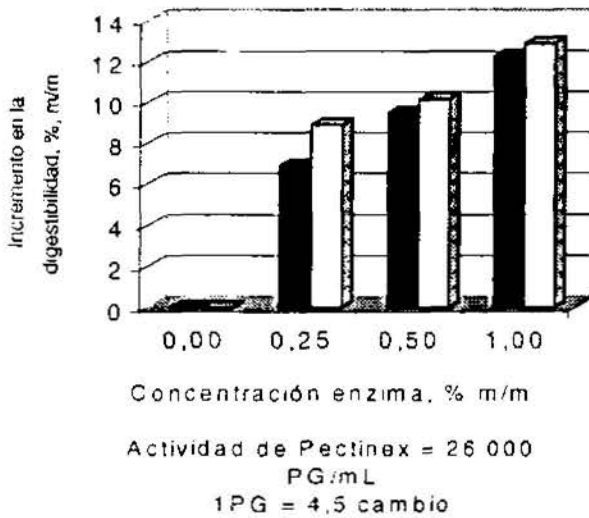
$$\text{R.I. (\% m/m)} = 38.84 - 4.58 \times \text{concentración} + \varepsilon_{ij}$$

La adición de Pectinex mejora sustancialmente la digestibilidad *in vitro* del frijol y elimina compuestos fermentables, disminuyendo por tanto problemas asociados con la flatulencia.

La adición de Pectinex, a la concentración de enzima seleccionada (1.0% m/m) mostró una aceptación mayor para el frijol sin tratamiento (control), tanto en frijoles negros como en rojos ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 8). Esto se debe principalmente a que la pectinasa produce cambios sensibles en el producto, lo cual fue negativamente evaluado por los jueces, quienes encontraron una textura arenosa poco agradable.



Figura 1. Efecto de Pectinex sobre la digestibilidad *in vitro* del frijol



Cuadro 8. Análisis sensorial para los frijoles negro y rojo tratados con Pectinex

	Frijol negro		Frijol rojo	
	Sin enzima <sup>a</sup>	Con Pectinex <sup>b</sup>	Sin enzima <sup>a</sup>	Con Pectinex <sup>b</sup>
Agrado general, %	80,31	60,33	79,61	52,67
Calidad general, %	Sin enzima*	Con Pectinex*	Sin enzima*	Con Pectinex*
	72,39	53,42	75,69	47,22

<sup>ab</sup> son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

### 5.6 Efecto de la concentración de Validase sobre la digestibilidad *in vitro* y aceptabilidad del frijol

Un 1,0% de celulasa permite una mayor digestibilidad *in vitro* en el frijol rojo (alrededor de un 12%), mientras que en el negro los valores obtenidos fueron

significativamente menores (cerca de un 5%), indistintamente de la concentración de enzima empleada (Figura 2, Cuadro A43 del Apéndice 2).

La reducción del contenido de residuo indigerible al utilizar la enzima Validase es diferente según la variedad y según la concentración de enzima empleada ( $p < 0.05$ ). Se encontró que el modelo con interacción explica mejor el efecto de la celulasa ( $R^2 = 61\%$ ). La ecuación obtenida en este caso es la siguiente:

$$\text{R.I. (\% m/m)} = 39,53 - 1,57 \times \text{concentración} + 0,35 \times \text{vari} - 3,06 \times \text{inter.} + \varepsilon_{ij}$$

Si el frijol es negro,  $\text{vari} = 0$  e  $\text{inter} = 0$ ; con lo que:

$$\text{R.I. (\% m/m)} = 39,53 - 1,57 \times \text{concentración}$$

Si el frijol es rojo, entonces  $\text{vari} = 1$  e  $\text{inter} = 1 \times \text{concentración}$ , con lo que la ecuación que resulta es:

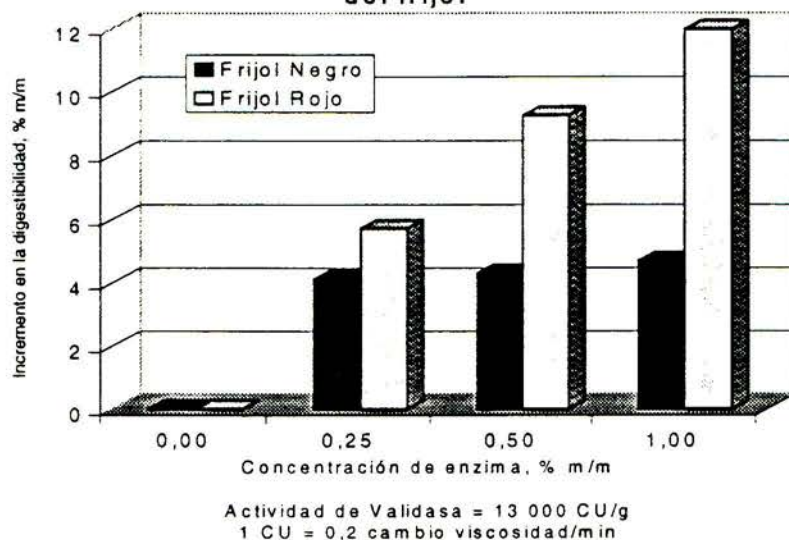
$$\text{R.I. (\% m/m)} = 39,53 - 1,57 \times \text{conc} + 0,35 - 3,06 \times \text{conc.}$$

$$\text{R.I. (\% m/m)} = 39,88 - 4,63 \times \text{conc.}$$

No se encontraron diferencias significativas en el frijol tratado con 1,0% m/m de Validase y el frijol sin tratamiento ( $p > 0.05$ ).

Al hidrolizar la celulosa se produce glucosa, con lo que se obtiene un sabor residual "dulcete", que resulta muy agradable al gusto del panelista. La textura no se modifica como en el caso de la pectinasa, por lo que los atributos sensoriales, en general, fueron evaluados con una calificación mayor para los frijoles tratados con celulasa que para los tratados con pectinasa.

**Figura 2. Efecto de Validase sobre la digestibilidad *in vitro* del frijol**



**Cuadro 9. Análisis sensorial para los frijoles negro y rojo tratados con Validase**

	Frijol negro		Frijol rojo	
	Sin enzima <sup>a</sup>	Con Validase <sup>a</sup>	Sin enzima <sup>a</sup>	Con Validase <sup>a</sup>
Agrado general, %	76,94	83,75	76,19	73,19
Calidad general, %	73,08	80,50	68,86	71,44

<sup>a</sup> no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### 5.7 Análisis general de la acción hidrolítica de las enzimas y posibles efectos inhibitorios

La mejora general en la digestibilidad *in vitro* del frijol se debe principalmente a la hidrólisis de celulosa y pectina, a compuestos más sencillos, los cuales sí son absorbidos y digeridos por las enzimas digestivas. Ambas enzimas poseen

además actividad hemicelulásica, lo que posiblemente también contribuyó en el incremento de la digestibilidad *in vitro*. La remoción de celulosa y pectina (componentes que bloquean la hidrólisis del almidón) libera el almidón ocluido, permitiendo así una mayor hidrólisis del mismo y por ende una mejora en la digestibilidad *in vitro* general. La acidificación de las muestras a un pH cercano a 2 y posterior desecación, favorece la hidrólisis de los enlaces glucosídicos de la celulosa y la pectina, lo cual produce una mejora en la digestibilidad. Sin embargo, esto no afecta el valor de incremento en la digestibilidad *in vitro* que aquí se reporta, por cuanto el mismo fue medido comparado contra un control (frijol sin enzima) tratado exactamente igual que el frijol con enzima.

El mayor efecto inhibitorio encontrado para la celulasa (Validase) en frijoles negros es probable que ocurra como consecuencia de su mayor contenido de proteína (24,4% m/m) y posiblemente también de taninos. No se tienen datos del contenido de fitatos y de taninos para las dos variedades estudiadas; sin embargo, según Mendoza *et al.* (1990), los frijoles negros cocidos tienen más taninos que los frijoles rojos. Los taninos inhiben significativamente la acción enzimática e interfieren con las enzimas digestivas (Carmona *et al.*, 1996). Por otra parte, la proteína es capaz de formar complejos tanto con taninos como con fitatos, los cuales son inhibitorios de la acción enzimática. La reducción en la digestibilidad *in vitro* ocurre como consecuencia de la formación de complejos tanto con la proteína del frijol como con la enzima Validase. En el primer caso, la proteína no está disponible para la hidrólisis por parte de las enzimas pepsina y pancreatina adicionadas en la digestibilidad *in vitro*. En el segundo caso, la acción hidrolítica de Validase se ve afectada por estar formando complejos con taninos y fitatos. Por razones propias de las enzimas, el efecto inhibitorio de estos complejos no fue tan evidente para la pectinasa. Aún cuando no se encontraron diferencias significativas sobre la digestibilidad *in vitro* al adicionar pectinasa, sí se observó una mayor digestibilidad *in vitro* en el frijol rojo (Figura 2). Las enzimas son muy específicas y selectivas en su modo de acción e inhibición, de manera que no es

extrañar que ocurra un comportamiento diferente entre una y otra, dependiendo del sustrato y de las condiciones de acción.

Otros autores también mencionan el efecto inhibitorio de los taninos sobre diversos tipos de enzimas. Boettger *et al.* (1996) determinaron que las pectinesterasas en papas son inhibidas por la presencia de taninos. Sewalt *et al.* (1997) encontraron que los taninos son capaces de inhibir la acción de la celulasa, tanto por interacción con el sustrato como con la enzima. Heredia *et al.* (1990) en un estudio con aceitunas, encontraron que la celulasa es fuertemente inhibida por polifenoles.

Gómez *et al.* (1997) señalan que la digestibilidad *in vitro* de la proteína en frijoles está directamente relacionada con la razón proteína/celulosa. Dichos autores encontraron que de las fracciones de carbohidratos presentes en frijoles negros, la celulosa es la que presenta una mayor interacción con la proteína (18,02%), seguida de la lignina con un 3,08% y de la hemicelulosa con un 0,09%. En este estudio se determinó el mismo valor para la relación proteína/celulosa en ambas variedades (1.9), por lo que no es posible sacar conclusiones a partir de esta relación.

Li *et al.* (1993) estudiaron la relación entre la actividad inhibitoria de la  $\alpha$ -amilasa y los fitatos en proteínas de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) y encontraron que el fitato libre no tiene actividad inhibitoria  $\alpha$ -amilasa pero sí es inhibitorio cuando está en combinación con las proteínas. Según Gustafsson & Sandberg (1997), esta inhibición puede deberse tanto a la presencia de un inhibidor  $\alpha$ -amilasa proteináceo, como a la formación de un complejo fitato-proteína que tiene una alta actividad inhibitoria. No se tienen datos del contenido de fitatos presentes en las dos variedades estudiadas, pero dado el mayor contenido de proteína en los frijoles negros es de esperar que el efecto inhibitorio debido a la posible formación

de estos complejos (proteína-fitatos) sea mayor en los frijoles negros. Al igual que los taninos, los fitatos limitan la biodisponibilidad de los minerales y son capaces de formar complejos con la proteína, interfiriendo con la digestibilidad del frijol (biodisponibilidad de los carbohidratos), la utilización de macronutrientes (Carmona *et al.*, 1996) y la biodisponibilidad de vitaminas y minerales (King Thom *et al.*, 1998). Los taninos también tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad fitasa por lo que es probable que un mayor contenido de estos compuestos en los frijoles negros cocidos también afecte la acción de la fitasa endógena que se activa con el remojo y la cocción (Gustafsson & Sandberg, 1997).

Stolle *et al.* (1997) al estudiar el efecto del tratamiento térmico en frijoles verdes, encontraron que por debajo del punto isoeléctrico de la proteína, al cual la proteína es catiónica y la pectina aniónica, se forman complejos proteína-pectina que podrían inhibir a la enzima. Los frijoles negros tienen más proteína, pero los rojos tiene más pectina, por lo que es de esperar que el efecto inhibitorio debido a la posible formación de complejos de este tipo sea muy similar en ambos frijoles, al adicionar pectinasa.

Sewalt *et al.* (1997) encontraron que la hidrólisis enzimática de la celulosa es reducida por la presencia de lignina y sugieren que el efecto inhibitorio se debe tanto a interacciones con el sustrato como con la enzima. Es importante determinar el contenido de lignina presente en cada variedad, con el fin de establecer su posible relación sobre la digestibilidad de ambas variedades, que justifiquen las diferencias encontradas.

El uso de enzimas exógenas (Pectinex Ultra SPL y Validase TRL, al 1.0% m/m) tiene varios efectos beneficiosos: hidroliza compuestos complejos (celulosa y pectina) a compuestos más sencillos, metabolizables, eliminando así problemas asociados a la flatulencia e incrementando la digestibilidad *in vitro* del frijol en alrededor de un 12 a un 13%, a excepción de la celulasa en frijol negro, donde el



incremento fue menor.

Existe una ventaja en la adición de una sola enzima, ya sea celulasa o pectinasa y es que permite mantener el polisacárido no hidrolizado (pectina o celulosa, respectivamente) prácticamente intacto, con lo que permanecen también los atributos que desde el punto de vista fisiológico se le atribuyen a estos compuestos. En el caso de las pectinas, un aumento de la viscosidad, disminución del colesterol sérico y del riesgo de enfermedades coronarias, así como también efectos beneficiosos sobre el tratamiento de la Diabetes mellitus. En el caso de la celulosa, la aceleración del tránsito intestinal, el aumento en el volumen de las heces, desaceleración de la hidrólisis del almidón y consiguiente retraso en la absorción de glucosa, además de su potencial efecto beneficioso en el tratamiento de diferentes tipos de cánceres. Se debe recordar, sin embargo, que los diferentes tipos de fibras tienen diferentes efectos fisiológicos y éstos dependen de muchos factores: del origen y tipo de fibra, de la historia natural del desorden clínico, del consumo de otros alimentos, de las circunstancias personales del individuo, su estilo de vida, así como también del consumo de grasa, el consumo de alcohol, la actividad física, etc. (Kellogg's, 1997; Gurr & Asp, 1994; Eastwood, 1994; Cummings, 1992; Nattall, 1992; Rose, 1992; Schweizer & Edwards, 1991).

## VI. CONCLUSIONES

1. Los tamaños de las dos variedades de frijol *Phaseolus vulgaris* estudiadas, la negra (Brunca) y la roja (Chirripó), fueron muy similares ( $p > 0,05$ ); no así la absorción de agua, la cual fue mayor para los frijoles negros ( $p < 0,05$ ).
2. Los frijoles negros presentaron un mayor contenido de proteínas y un menor contenido de grasa y de carbohidratos que los rojos ( $p < 0,05$ ). El contenido de cenizas fue muy similar en ambas variedades ( $p > 0,05$ ).
3. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el contenido de residuo indigerible presente en las dos variedades de frijol. Se obtuvieron en promedio, un 59,14% de RI para el frijol negro y un 59,8% m/m para el rojo ( $p > 0,05$ ).
4. El porcentaje de recuperación de pectinas para los frijoles *Phaseolus vulgaris* en general, por el método analizado, fue de 73,2%.
5. Los frijoles rojos presentaron un mayor contenido de pectina que los negros ( $p < 0,05$ ). Los valores de pectina obtenidos en el residuo indigerible, recalculados según el porcentaje de recuperación, fueron 5,22% m/m para los rojos y 4,37% m/m para los negros. Se esperaría obtener entonces más problemas de flatulencia por el contenido de pectinas en los rojos que en los negros.
6. Los frijoles negros presentaron un contenido de celulosa de 13,0% m/m y de 11,7% m/m para los rojos ( $p > 0,05$ ).
7. Una mayor concentración de enzima Pectinex produce un mayor incremento



en la digestibilidad *in vitro* del frijol en ambas variedades. Se obtuvo un incremento de alrededor de un 12,3 y un 12,9%, en el frijol negro y rojo, respectivamente. Sin embargo, desde el punto de vista organoléptico, se obtuvo un porcentaje de agrado y aceptación general mayor para los frijoles sin tratamiento enzimático.

8. La adición de celulasa permite una mejora en la digestibilidad *in vitro* de los frijoles rojos cercana al 12%. Los valores obtenidos fueron significativamente menores (menos del 5%) para el negro, indistintamente de la concentración de enzima usada ( $p < 0.05$ ).
9. No se encontraron diferencias significativas en el agrado y calidad general ( $p > 0.05$ ) en los frijoles tratados con celulasa y los frijoles sin enzima, en ambas variedades.
10. La celulasa presenta una inhibición mayor en el frijol negro, posiblemente debido a su mayor contenido de proteína y de taninos y a la posible formación de complejos proteína-taninos, inhibitorios de la acción enzimática.
11. Debido a la importancia del consumo de frijoles en la población costarricense, el incremento en la digestibilidad *in vitro* del frijol aquí obtenido, redundará en beneficios nutricionales, particularmente importantes en sectores tales como niños de corta edad, vegetarianos y cierto grupo de adultos mayores, cuya fuente primordial de proteína y de hierro son las leguminosas.
12. La industria, podrá disponer de un tratamiento que podría ser incorporado a los distintos procesos productivos, permitiendo que los consecuentes beneficios sean accesibles a la población en general.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Es importante verificar para el frijol rojo las condiciones y tiempo del tratamiento térmico que aseguren la eliminación de factores antifisiológicos y una textura adecuada en el producto final.
2. Los diferentes métodos de análisis repercuten significativamente en los resultados obtenidos. Se recomienda corroborar los valores de pectina y celulosa utilizando cromatografía de gas y comparar los resultados con los aquí obtenidos mediante el método colorimétrico descrito.
3. En pruebas preliminares se pudo observar que el agrado y aceptación general de los frijoles tratados con pectinasa pueden mejorarse sustancialmente mediante la condimentación de los mismos, por lo que se recomiendan más ensayos con el propósito de lograr una mayor aceptación de los panelistas.
4. Se recomienda determinar el contenido de compuestos fenólicos, fitatos y lignina presentes en ambas variedades, así como el contenido de proteína presente en el residuo indigerible, para verificar si existe relación entre el contenido de estos compuestos y las diferencias encontradas en la acción inhibitoria de ambas enzimas con frijol rojo y frijol negro.
5. Se recomienda determinar el efecto de varios tratamientos para reducir el contenido de fitatos, taninos y lignina y medir su efecto sobre la digestibilidad *in vitro*, la utilización de macronutrientes y la absorción de hierro. Se sugiere ensayar:
  - i) el uso de carbonato y bicarbonato de sodio para la eliminación de taninos y fitatos y la medición del efecto sobre las características sensoriales.
  - ii) el uso de una tanasa exógena para la eliminación de taninos y fitatos.
  - iii) la adición de compuestos nitrogenados para contrarrestar el efecto de la lignina.

## VIII. REFERENCIAS

- Abia, R., Buchanan, C.J., Saura-Calixto, F. & Eastwood, M.A. 1993. Structural changes during the retrogradation of legumes starches modify the *in vitro* fermentation. *J. Agr. Food Chem.* 41 (11): 1856-1863.
- Acevedo, E., Velázquez-Coronado, L. & Bressani, R. 1994. Changes in dietary fiber content and its composition as affected by processing of black beans (*Phaseolus vulgaris* L. Tamazulapa variety). *Plant Foods Human Nutr.* 46 (2): 139-145.
- Acevedo, E. & Bressani, R. 1990. Contenido de fibra dietética y digestibilidad del nitrógeno en alimentos centroamericanos: Guatemala. *Arch. Lat. Nutr.* 40 (3): 439-451.
- American Association of Official Analytical Chemists. 1984. *Official Methods of Analysis*, 14<sup>th</sup> ed. AOAC, Washington, D.C.
- Annison, G. & Topping, D.L. 1994. Nutritional role of resistant starch: chemical structure and physiological function. *Annu. Rev. Nutr.* 14: 297-320.
- Asp, N.G. & Johansson, C.G. 1984. Dietary fibre analysis. *Nutr. Abstr. Rev. Clin. Nutr.* 54:735-752.
- Asp, N., Johansson, C., Hallmer, H. & Siljestrom, M. 1983. Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. *J. Agric. Food Chem.* 31:476.
- Asp, N.G. & Johansson, C.G. 1981. Techniques for measuring dietary fiber; principal aims of methods and a comparison of results obtained by different techniques. In *The analysis of dietary fiber in food*. James, W.P.T. & Theander, O. eds. Marcel Dekker, New York.
- Aw-Bhat, K.M., Gaikwad, J.S. & Maleshwari, R. 1993. Purification and characterization of an extracellular beta glucosidase from the thermophilic fungus, *Sporotrichum thermophile* and its influence on cellulase activity. *J. Gnl. Microb.* 139 (11): 2825-2832.
- Barampama, Z. & Simard, R.E. 1995. Effects of soaking, cooking and fermentation on composition, *in vitro* starch digestibility and nutritive value of common beans. *Plant Foods Human Nutr.* 48 (4): 349-365.

- Barthomeuf, C. Regeat, F. & Pourrat, H. 1994. Production, purification and characterization of a tannase from *Aspergillus niger* LCF 8. *J. Ferm. Bioeng.* 77 (3): 320-323.
- Berre-Anton, V.I. Bompard-Gilles, C., Payan, F. & Rouge, P. 1997. Characterization and functional properties of alpha amylase inhibitor (Alpha AI) from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Biochem. Biophys. Acta.* 134(1): 31-40.
- Boettger, A. R., Roesner, R. & Pieper, H.J. 1996. Inhibition of pectinesterases and reduction of methanol content in crude alcohols from potatoes. *Deutsche Lebensmittel Rundschau.* 92 (6): 188-192.
- Bonilla, A.R. & Rodríguez, A. 1995. Enhanced *in vitro* starch digestibility of cooked beans by the addition of germinated beans (*Phaseolus vulgaris*). IFT Annual Meeting.
- Bonilla, A.R., Calzada, C. & Cooke, R. 1991. Efectos de la cocción tradicional sobre los factores antinutricionales de los frijoles negros (*Phaseolus vulgaris*) de Costa Rica. *Arch. Lat. Nutr.* 41 (4): 609-619.
- Borejszo, Z. & Khan, K. 1992. Reduction of flatulence-causing sugars by high temperature extrusion of pinto bean high starch fractions. *J. Food Sci.* 57 (3) 771-772, 777.
- Bressani, R. & Chon, C. 1996. Effects of altitude above sea level on the cooking time and nutritional value of common beans. *Plant Foods Human Nutr.* 49 (1): 53-61.
- Bressani, R., Elías, L.G. & de España, M.E. 1981. Posibles relaciones entre medidas físicas, químicas y nutricionales en frijol común (*Phaseolus vulgaris*). *Arch. Lat. Nutr.* 31 (3): 551-570.
- Bressani, R. & Elías, L.G. s.f. Nutritional value of legume crops for humans and animals. INCAP. Guatemala. 135-155.
- Carmona, A., Bourgud, L., Borge, G. & Levy Benshimol, A. 1996. Effect of black bean tannins on *in vitro* carbohydrate digestion and absorption. *J. Nutr. Biochem.* 7 (8):445-450.
- Carmona, A., Seidl, D.S. & Jaffe, W.G. 1991. Comparison of extraction methods and assay procedures for the determination of the apparent tannin content of common beans. *J. Sci. Agr.* 56 (3): 291-301.

- Cuauhtemoc, M. & Paredes, L. 1993. Hard to cook phenomenon in common beans. A review. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 33(3): 227.
- Chau, C.F. & Cheung, P.C. K. 1997. Effect of various processing methods on antinutrients and *in vitro* digestibility of protein and starch of two chinese indigenous legume seed. *J. Agric. Food Chem.* 45 (12):4773-4776.
- CITA. 1999. Estudio de prefactibilidad para la instalación de una planta para el procesamiento del frijol molido fortificado con hierro en Costa Rica. CITA, Universidad de Costa Rica. 175 p.
- Cummings, J. 1992. Consecuencias metabólicas e implicaciones en la salud de la composición de polisacáridos en la dieta. In *Memoria del Simposio Internacional sobre Fibra Dietética*. Int. Nacl. Nutr. Salvador Zubirán, México.
- Eastwood, M. 1994. Nuevos avances sobre la fibra, la función gastrointestinal y las enfermedades. In *Memoria del IV Simposio Internacional sobre Fibra Dietética*. Inst. Nacl. Nutr. Salvador Zubirán, México.
- Englyst, H.N. & Cummings, J.H. 1990. Non starch polysaccharides (dietary fiber) and resistant starch. In *New developments in dietary fiber*. Furda & Brine, eds. Plenum Press, New York. 205-225.
- Englyst, H.N. & Hudson, G.J. 1987. Colorimetric method for routine measurement of dietary fiber as the non-starch polysaccharides. A comparison with gas-liquid chromatography. *Food Chem.* 24:63-76.
- Englyst, H.N., Trowell, H., Southgate, D.A.T. & Cummings, J.H. 1987. Dietary fiber and resistant starch. *Amer. J. Clin. Nutr.* 46 (6):873-874.
- Excoffier, G.; Toussaint, B. & Vignon, M.R. 1991. Saccharification of steam exploded poplar wood. *Biotech. Bioeng.* 38 (11): 1308-1317.
- Fleming S.E. 1981. A study of relationships between flatus potential and carbohydrate distribution in legume seeds. *J. Food Sci.* 46: 794.
- Flint, S.I. & Camire, M.E. 1992. Recovery of lignin during non starch polysaccharide analysis. *Cereal Chem.* 69 (4): 444-447.
- Gomes, A.M., Méndez, M.H.M. & Derivi, S.C.N. 1997. *In vitro* digestibility of beans proteins interaction of amino acids with dietary fiber components. *Alimentos e Nutricao.* 8: 93-103.

- Gurr, M.I. & Asp, N.G. 1994. Dietary fibre. ILSI Europe Concise Monograph Series. ILSI Press. Washington, D.C. 23 p.
- Gustafsson, E.L. & Sandberg, A.S. 1995. Phytate reduction in brown beans (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Food Sci. 60 (1):149-152, 156.
- Hellendoorn, E. W. 1978. Fermentation as the principal cause of the physiological activity of indigestible food residue. In Topics in dietary fiber research. Plenum Press, New York. 127-167.
- Hellendoorn, E. W. 1972. Carbohydrate digestibility and flatulence activity of beans. In Nutritional aspects of common beans and other legume seed as animal and human foods". Arch. Latin. Nutr. Caracas, Venezuela. 261-271.
- Heredia, A., Fernández-Bolaños, J. & Guillen, R. 1990. Cellulase inhibition by polyphenols in olive fruits. Food Chem. 38 (1):69-73.
- Holloway, W.D., Tasman-Jones, C. & Maher, K. 1983. Pectin digestion in humans. Am. J. Clin. Nutr. 37:253.
- Holm, J., Asp, N.G. & Bjorck, I. 1987. Factors affecting enzymatic degradation of cereal starches *in vitro* and *in vivo*. In Cereals and Nutrition. European Conference on Food Science and Technology. Morton & Weinheim eds. New York.
- Hughes, J. 1991. Potential contribution of dry bean dietary fiber to health. Food Technol. 45(9):122-126.
- IFT. 1989. Dietary fiber: A scientific status summary by the Institute of Food Technologists. Office of Scientific Public Affairs, IFT. 133-139.
- Jiménez, L. 1996. Determinación de fitatos, taninos y hierro disponible en frijol crudo, germinado y remojado (*Phaseolus vulgaris*) variedad Talamanca. Tesis de Licenciatura en Tecnología de Alimentos. Facultad de Agronomía. Universidad de Costa Rica. San José.
- Joslyn, M.A. ed. 1970. Methods in food analysis. Physical, chemical and instrumental methods of analysis. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press. N.Y.
- Jyothi, V. & Sumathi, S. 1995. Effect of alkali treatments on the nutritive value of common beans (*Phaseolus vulgaris*). Plant Food Human Nutr. 48 (3): 193-200.

- Kamat, A.D. and Kulkarni, P.R. 1981. Dietary effect of non-starch polysaccharides of black gram (*Phaseolus mungo*). J. Food Sci. Technol. (India). 18:216-217.
- Kellogg's. 1997. Importancia de la fibra. *In* : Dieta y Salud. 7 (1): 1-16.
- Khalil, A.H. & Mansour, E.H. 1995. The effect of cooking, autoclaving and germination on the nutritional quality of faba beans. Food Chem. 54: 177-182.
- Kon, S., Wagner, J.R., Becker, R., Booth, A.N. & Robbins, D.J. 1971. Optimizing nutrient availability of legume food products. J. Food Sci. 36: 635-640.
- Kritchevsky, D. 1997. Cereal fiber and lipidemia. Cereal Foods World. 42 (2): 81-85.
- Kurtzman, R.H. & Halbrook, W.U. 1970. Polysaccharide from dry navy beans, *Phaseolus vulgaris*: Its isolation and stimulation of *Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol. 21:715-719.
- Lajolo, F.M., Filho, F.F. & Menezes, E.W. 1991. Amylase inhibitors in *Phaseolus vulgaris* Beans. Food Tech. 119-121.
- Li, Z., Alli, I & Kermasha, S. 1993. *In vitro* alpha-amylase inhibitor activity-phytate relationship in proteins from *Phaseolus* beans. Food Res. Internl. 26 (3): 195-201.
- Liener, I.E. 1978. Toxins in legumes: their possible nutritional significance in the diet of man. In Postharvest biology and biotechnology. Food Nutr. Press, Westport. 348-369.
- Mata, J. 1995. Fibra Dietaria, Hechos y Falacias. Alimentos y Salud. Grupo Numar. (1):1-4.
- Marqués, M.H.; CasaNova, S.; Fernandes, M.L. & Gomes, A.M. 1993. Insoluble dietary fiber of grain food legumes and protein digestibility. Arch. Lat. Nutr. 43 (1): 66-72.
- Mejía, L., Bourges, H. & Rosado, J.L., eds. 1989. Memorias del 2° Simposio Internacional sobre Fibra Dietética. Inst. Nacl. Nutr. Salvador Zubirán. México.



- Melito, C. 1998. Aislamiento, caracterización fisicoquímica, susceptibilidad a la hidrólisis enzimática y generación de almidón resistente de almidones nativos, pregelatinizados y entrecruzados de arroz (*Oryza sativa*), apio (*Arracacia xanthorrhiza*) y haba criolla (*Canavalia ensiformis*). Tesis Doctoral en Ciencias, Biología Celular, Universidad Central de Venezuela, Caracas. 304 p.
- Mendoza, C., Linares, S., Elías, L.G. & Bressani, R. 1990. Características tecnológicas y nutricionales de 20 cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris*). II Características químicas y nutricionales del grano. Turrialba. 40 (1):44-51.
- Ministerio de Salud, 1996. Encuesta Nacional de Nutrición. Ministerio de Salud, San José.
- Moneam, M.A. 1990. Effects of presoaking on faba bean enzyme inhibitors and polyphenols after cooking. J. Agric. Food Chem. 38 (7): 1479-1482.
- Monte, W.C. and Maga, J.A. 1980. Extraction and isolation of soluble and insoluble fiber fractions from the pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.) J. Agric. Food Chem. 28:1169.
- Moro, R., Cuesta, M.J., Fernández, M.T. & Vargas, A. 1997. Composition and nutritional value of Asturian beans. Alimentaria. 279: 23.
- Navarrete, K. 1999. Evaluación del efecto del tamaño de partícula y cocción antes y después de la molienda del frijol *Phaseolus vulgaris* variedad Brunca, sobre la digestibilidad *in vitro* del almidón. Tesis de Licenciatura en Tecnología de Alimentos, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica, San José.
- Nnanna, I.A. & Phillips, R.D. 1990. Protein and starch digestibility and flatulence potential of germinated cowpeas (*Vigna unguiculata*) J. Food Sci. 55(1): 151-153, 183.
- Nuttall, F.Q. 1992. La fibra dietética en el manejo de la diabetes y en la prevención de enfermedades cardiovasculares. In Memoria del simposio internacional sobre fibra dietética. Inst. Nacl. Nutr. Salvador Zubirán, México.
- Nyman, M. & Asp, N. 1982. Fermentation of dietary fibre components in the rat intestinal tract. Br. J. Nutr. 47: 357.



- Occeña, L.G. 1994. Processing strategies to improve dry bean (*Phaseolus vulgaris*) digestibility and food utilization. A dissertation for the degree of Doctor of Philosophy. Department of Food Science and Human Nutrition. Michigan State University. Michigan.
- Occeña, L.G., Uebersax, M.A. & Hosfield, G.L. 1996 a. Steam and hot water extractive pretreatments of whole bean (*Phaseolus vulgaris*) drum-dried meals. Department of Food Science and Human Nutrition. Michigan State University. Michigan.
- Occeña, L.G., Uebersax, M.A. & Hosfield, G.L. 1996 b. Evaluation of chemical and functional properties of drum-dried meals prepared from split beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Department of Food Science and Human Nutrition. Michigan State University. Michigan.
- Ockenden, I., Falk, D.E. & Lott, J.N.A. 1997. Stability of phytate in barley and beans during storage. *J. Agric. Food Chem.* 45 (5): 1673-1677.
- Olson, A.C., Gray, G.M., Gumbman, M.R., Sell, C.R. & Wagner, J.R. 1981. Flatulence causing factors in legumes. In *Antinutrients and natural toxicants in foods* (Ory, R.L.(Ed.)). Food Nutr. Press. Westport. 275-294.
- Pak, N., Ayala, C., Vera, G., Pennacchiotti, I. & Araya, H. 1990. Fibra dietética soluble e insoluble en cereales y leguminosas cultivadas en Chile. *Arch. Latin. Nutr.* 15 (1): 116-125.
- Periago, M.J.; Ros, G. & Casas, J.L. 1997. Non-starch polysaccharides and *in vitro* starch digestibility of raw and cooked chick peas. *J. Food Sci.* 62 (1): 93-96.
- Pietinem, P., Rimm, E.B., Korhonen, P. & Hartman, A. 1996. Intake of dietary fiber and risk of coronary heart disease in a Cohort of Finnish men. *Circulation.* 94 (11): 2720-2727.
- Prosky, L., Asp, N.G., Furda, I., DeVries, J.W., Schweizer, T.F. and Harland, B.F. 1985. Determination of total dietary fibre in foods and food products: collaborative study. *J. AOAC.* 68:677-679.
- Prosky, L., Asp, N.G., Schweizer, T.F., Devries, J.W. & Furda, I. 1988. Determination of insoluble, soluble and total dietary fibre in foods and food products: interlaboratory study. *J. AOAC.* 71:1017-1023.
- Prosky, L., Asp, N.G., Furda, I., DeVries, J.W., Schweizer, T.F. & Harland, B.F. 1984. Determination of total dietary fibre in foods, food products and total diets: interlaboratory study. *J. AOAC.* 67:1044-1052.

- Rackis, J.J. 1975. Oligosaccharides in food legumes: Alpha-galactosidase activity and flatus problem. In Physiological effects of food carbohydrates (Jeans and Hodge, J. (Ed.)). ACS Symp. Series N° 15. Am. Chem. Soc. Washington, D.C. p 207-222.
- Reddy, N.R., Pierson, M.D., Sathe, S.K. & Salunkhe, D.K. 1984. Chemical, nutritional and physiological aspects of dry bean carbohydrates. A review. *Food Chem.* 13:25.
- Rodríguez, A. 1994. Efecto de la adición de frijol germinado (*Phaseolus vulgaris*) sobre la digestibilidad *in vitro* del frijol cocido para las variedades Huetar y Talamanca. Tesis de Licenciatura en Tecnología de Alimentos. Facultad de Agronomía. Universidad de Costa Rica. San José.
- Rodríguez-Burger, A. P., Mason, A. & Nielsen, S. 1998. Use of fermented black beans combined with rice to develop a nutritious weaning food. *J. Agric. Food Chem.* 46 (12): 4806-4813.
- Rosado, J.L. 1990. Propiedades físicoquímicas de la fibra dietética y su efecto gastrointestinal. In Memorias del 2° Simposio Internacional sobre Fibra Dietética. Inst. Nacl. Nutr. Salvador Subirán. México. D.F. 26-33.
- Rose, D.P. 1992. La fibra y el cáncer: nuevos hallazgos. In Memoria del Simposio Internacional sobre Fibra Dietética. Inst. Nacl. Nutr. Salvador Zubirán. México.
- Sambudi, S.H.E. 1994. Quality characteristics of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* L.) seeds. Dissert. Abs. Internl. B. 55 (2):246.
- Sandberg, A.S. & Svanberg, U. 1991. Phytate hydrolysis by phytase in cereals: effects on *in vitro* estimation of iron availability. *J. Food Sci.* 56 (5) 1330-1333.
- Schweizer, T. & Edwards, C.A., eds. 1991. Dietary fibre -A component of food. nutritional function in health and disease. Springer-Verlag. London.
- Sewalt, V J.H.; Glasser, W. G. & Beauchemin, K.A. 1997. Lignin impact on fiber degradation. III. Reversal of inhibition of enzymic hydrolysis by chemical modification of lignin and by additives. *J. Agr. Food Chem.* 45 (5):1823-1828.
- Selvendran, R.R., Stevens, B.J.H. & Pont, Msdu. 1987. Dietary fiber: chemistry, analysis and properties. *Adv Food Research.* 31: 117-209.

- Shekib, L.A. 1994. *In vitro* digestibility and microscopic appearance of germinated legume starches and their effect on dietary protein utilization. *Food Chem.* 50 (1):59
- Socorro, M., Levy Benschimol, A. And Tovar, J. 1989. *In vitro* digestibility of cereal and legume (*Phaseolus vulgaris*) starches by bovine, porcine and human pancreatic alpha-amylases. Effect of dietary fiber. *Starch/Staerke.* 41(2): 69-71.
- Srisuma, N., Ruengsakulrach, S., Uebersax, M.A., Bennink, M. & Hammerschmidt, R. 1991. Cell wall polysaccharides of navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Agr. Food Chem.* 39:855-858.
- Stolle-Smits, T., Bukhuizen, J.G., Recourt, K., Voragen, A.G.J. & Dikj C- van. 1997. Changes in pectic and hemicellulosic polymers of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) during industrial processing. *J. Agr. Food Chem.* 45 (12): 4790-4799.
- Stolle-Smits, T., Bukhuizen, J.G. & Dikj C- van. 1995. Cell wall dissolution during industrial processing of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agr. Food Chem.* 43 (9): 2480-2486.
- Svanberg, M., Suorttti, T. & Nyman, M. 1997. Physicochemical changes in dietary fiber of green beans after repeated microwave treatments. *J. Food Sci.* 62 (5): 1006-1010.
- Tovar, J. 1994. Bioavailability of carbohydrates in legumes. Digestible and indigestible fractions. *Arch. Lat. Nutr.* 44 (4-S):36 S- 40 S.
- Vaintraub, I.A. & Bulmaga, V.P. 1991. Effect of phytate on the *in vitro* activity of digestive proteinases. *J. Agr. Food Chem.* 39 (5): 859.
- Venkatesh, K.V.; Wankat, P.C. & Okos, M.R. 1994. Kinetics model for lactic acid production from cellulose by simultaneous fermentation and saccharification. *AIChE- Symposium. Series 90 (300):* 80-87.
- Vidal-Valverde, C. & Frias, J. 1991. Legume processing effects on dietary fiber components. *J. Food Sc.* 56 (5): 1350-1352.
- Wolters, M.G.E.; Verbeek, C. & Westerop, J.J.M. 1992. Comparison of different methods for determination of dietary fiber. *J. of AOAC Internl.* 75 (4): 626-634.
- Wu, Z. & Lee, YY. 1997. Inhibition of the enzymatic hydrolysis of cellulose by ethanol. *Biotech. Letters.* 19 (10): 977-979.

# APÉNDICES

## APENDICE 1

### MÉTODOS DE ANÁLISIS

#### 1. Determinación del contenido (% m/m) de sólidos y de humedad

##### 1.1 Determinación

1. Secar las cápsulas 98-100 °C. Ponerlas en el desecador hasta que alcancen la temperatura ambiente.
2. Pesar exactamente 2,0 g de muestra y colocar en la estufa de vacío a 98 °C hasta peso constante.
3. Enfriar a temperatura ambiente en el desecador y pesar.

##### 1.2 Cálculo

$$\text{Contenido de sólidos totales (\% m/m)} = \frac{\text{masa de muestra seca}}{\text{masa de muestra húmeda}} \times 100$$

$$\text{Contenido de humedad} = 100 - \% \text{ de sólidos}$$

#### 2. Determinación del contenido (% m/m) de proteína

##### 2.1 Reactivos

Mezcla catalítica: pesar 90 g de sulfato de potasio anhidro y 3 g de sulfato de cobre (II) pentahidratado.

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado: grado reactivo, 96-97%.

NaOH 1+1: se prepara de la siguiente manera: a una parte de hidróxido de sodio grado reactivo (conteniendo menos de 5% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) se le añade una parte de agua y se agita hasta disolver completamente. Se guarda en un envase plástico con tapón de hule. Se deja en reposo alrededor de 10 días hasta que todo el

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  precipite.

Rojo de metilo: solución acuosa al 1%.

Ftalato ácido de potasio: Patrón primario (NIST estándar), con un tamaño de partícula que pase a través de un tamiz N° 100. Seque 2 h a 110 °C. Enfriar en un desecador conteniendo ácido sulfúrico. Para la estandarización del ftalato, pesar en un erlenmeyer a la décima de miligramo 0,80 g de ftalato ácido de potasio previamente seco. Añadir 50 mL de agua destilada libre de  $\text{CO}_2$ . Tapar y agitar suavemente hasta disolver. Determinar el volumen requerido por el blanco (agua destilada libre de  $\text{CO}_2$ ) para llegar al viraje a un color rosado tenue con fenoftaleína como indicador. Titular la solución de ftalato y restarle el volumen gastado en el blanco. Calcular la normalidad del NaOH como sigue:

$$\text{Normalidad del NaOH} = \frac{\text{g ftalato ác. de potasio}}{\text{mL de NaOH} \times 204,299} \times 1000$$

Solución estándar de NaOH 0,1 N: Añadir 54 mL de NaOH (1+1) y diluir a 10 L con agua libre de  $\text{CO}_2$ . Estandarizar contra ftalato ácido de potasio, usando fenoftaleína como indicador (1 g de fenoftaleína en 600 mL de etanol 95%).

Solución estándar de ácido sulfúrico 0,1 N: diluir 55 mL de ácido sulfúrico al 98% a 10 L. Estandarizar contra la solución estándar de NaOH.

Hidróxido de sodio al 50% aprox.: se toman 10 mL de una solución de NaOH al 50% y se lleva a 1 L con agua destilada.

## 2.2 Determinación

1. Pesar en un papel bajo en nitrógeno alrededor de 1 g de muestra en balanza analítica. Pase la muestra a un balón de Kjeldahl.
2. Agregar aproximadamente 15 g de mezcla catalítica y 25 mL de ácido sulfúrico concentrado.
3. Poner el balón en digestor Kjeldahl y calentar suavemente hasta que cese la espuma. Hervir hasta que la solución esté clara y de un color esmeralda.

Calentar 30 min más.

- Una vez que la solución esté fría, agregar aproximadamente 200 mL de agua destilada y unas perlas de ebullición.
- Preparar un erlenmeyer con 50 mL de ácido sulfúrico 0,1 N, mas 100 mL de agua destilada y unas gotas de rojo de metilo y disponerlos para recibir el destilado.
- Al balón Kjeldahl se le agregan aproximadamente 80 mL de hidróxido de sodio al 50%. La solución toma un color café negruzco. Inmediatamente después de agregado el NaOH, se coloca el balón en el equipo de destilación y se recoge el amoníaco desprendido. Destilar.
- Titular con NaOH 0,1 N.

### 2.3 Cálculos

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{[ (\text{mL} \times \text{N})_{\text{ácido}} - (\text{mL} \times \text{N})_{\text{NaOH}} ] \times 14.007 \times 100}{\text{masa de muestra (g)} \times 1000}$$

El porcentaje de proteína se calcula multiplicando el porcentaje de nitrógeno obtenido por 6,25.

## 3. Determinación del contenido (% m/m) de grasa

### 3.1 Reactivos

Acido clorhídrico 2+3: se toman 400 mL de HCl concentrado (36,5%) y se afora a 1L con agua destilada.

Eter de petróleo 40-60.

### 3.2 Determinación

- Se pesan 4 g de muestra homogénea en un beaker de 400 mL.

2. Se añaden 50 mL de HCl (2+3) y se coloca en un calentador a ebullición durante 15 min.
3. Filtrar a través de un papel Whatman N° 1.
4. Lavar con agua caliente para eliminar toda traza de ácido. Se realiza la prueba de nitrato de plata para garantizar la eliminación total del ácido.
5. Se coloca el filtro sobre un vidrio reloj y se seca en una estufa a 100 °C sin vacío, hasta que la muestra esté seca (aproximadamente 1 h).
6. Se añaden 100 mL de éter de petróleo y se coloca en el extractor Soxhlet.
7. El éter y el extracto se recogen en un balón previamente seco en estufa a 100 °C durante una h y pesado en balanza analítica tan pronto alcanza la temperatura ambiente.
8. El periodo de extracción es de 8 h a una velocidad de condensación de 2-3 gotas por segundo.
9. Evaporar la mayor parte del éter de petróleo en un evaporador rotatorio Soxhlet.
10. Secar el balón con la muestra a 100 °C hasta peso constante. Enfriar y pesar.

### 3.3 Cálculos

$$\text{Contenido de grasa (\% m/m)} = \frac{\text{masa de grasa}}{\text{masa de muestra}} \times 100$$

## 4. Determinación del contenido (% m/m) de cenizas

### 4.1 Determinación

1. Pesar exactamente 4 g de muestra bien homogeneizada en un crisol previamente incinerado, enfriado en un desecador y pesado tan pronto haya alcanzado la temperatura ambiente.
2. Calentar la muestra a 100 °C hasta que esté seca. Caliente sobre una llama hasta quemar la muestra.



3. Incinerar en la mufla a 550 °C hasta obtener cenizas blancas, grises o hasta que alcance peso constante (alrededor de 5:30 h).
4. Enfriar en el desecador y pesar tan pronto alcance la temperatura ambiente.

#### 4.2 Cálculos

$$\text{Contenido de cenizas} = \frac{\text{masa del residuo}}{\text{masa de muestra}} \times 100$$

#### 5. Determinación de la tasa de absorción de agua

Para determinar la tasa de absorción de agua, se pesan exactamente 200 g de frijol de cada variedad y se le agregan 600 g de agua destilada. Se dejan remojando durante 16 h. Se elimina el agua de remojo y se pesan los frijoles remojados. La tasa de absorción de agua se calcula como sigue:

$$\text{Tasa de absorción de agua} = \frac{\text{masa de frijoles enteros}}{\text{masa de frijoles remojados}} \times 100$$

#### 5. Determinación del contenido (% m/m) de residuo indigerible

##### 6.1 Reactivos

- **NaOH 0,5 M:** se toman 27 mL de una solución de NaOH 1+1 y se afora a 1 L con agua destilada.
- **HCl concentrado:** de concentración 38%, grado reactivo.
- **Solución amortiguadora de fosfatos 0,1 M, pH 6,8:** pesar 4,88 g de  $K_2HPO_4$  y 9,80 g de  $KH_2PO_4$  y aforar a 1 L con agua destilada. Ajustar el pH a 6,8 con NaOH 0,5 M.
- **Solución de pepsina de concentración 10 mg/mL:** pesar 1 gramo de pepsina y aforar a 100 mL con agua destilada.

- **Solución de pancreatina de concentración 10 mg/mL:** pesar 1 gramo de pancreatina y aforar a 100 mL con una disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 6.8.

## 6.2 Procedimiento

1. Se pesan por triplicado exactamente 2,55 g de muestra seca y se colocan en una botella de centrifuga de 250 mL. Se le agregan 90 mL de agua destilada y unos cristales de timol.
2. Se tapan y se colocan en un baño con agua a ebullición por 30 min para inactivar inhibidores e hidratar y gelatinizar el almidón.
3. Se enfría a temperatura ambiente y se le adicionan 5 mL de pepsina de concentración 10 mg/mL. Se ajusta el pH a 1,9 - 2,0 con HCl concentrado utilizando un pH-metro. Se coloca en un baño con agitación a 40 °C por 2 h.
4. Se remueven las muestras y se ajusta el pH a 6,8 usando NaOH 0.5 M.
5. Se agregan 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0,1 M (pH 6,8) conteniendo 10 mg/mL de pancreatina, la cual ha sido previamente filtrada a través de papel Whatman N° 41, para remover el material celular del páncreas.
6. Las muestras se colocan en un baño con agitación a 40 °C por 2 h.
7. Se enfría y se adicionan del volumen obtenido, 4 volúmenes de etanol a 60 °C y se deja reposar por 30 min para precipitar la fibra soluble.
8. Se centrifuga a 2000 rpm (336 RCF) durante 2-4 min. Se descarta el supernatante que contiene los aminoácidos y azúcares solubles.
9. El residuo que queda en la botella se seca durante toda la noche a 70 °C en estufa a vacío. Se enfría a temperatura ambiente y se pesa.
10. El residuo se saca del tubo con espátula, se morteriza y se guarda para su respectivo análisis.

### 6.3 Cálculos

$$\text{Residuo indigerible (\% m/m)} = \frac{(\text{masa botella + muestra}) - \text{masa de botella}}{\text{masa de muestra}} \times 100$$

## 7. Determinación del contenido (% m/m) de pectina en el residuo indigerible

Para la determinación de pectinas se construyeron 7 diferentes curvas patrón de ácido galacturónico, y a partir de éstas se determinó el ámbito lineal, los límites de confianza y la desviación estándar (D.E.). Se determinó la desviación estándar a concentración cero (D.E.<sub>{0}</sub>), a partir de 13 determinaciones diferentes del blanco de calibración, obteniéndose un valor de D.E.<sub>{0}</sub> de 0,3833. Los valores de LC (límite de detección) (LD) y de LC (límite de cuantificación) se calcularon a partir de la siguiente relación:

$$\text{Límite de detección (LD)} = 3 \times \text{D.E.}_{\{0\}}$$

$$\text{Límite de cuantificación (LC)} = 10 \times \text{D.E.}_{\{0\}}$$

### 7.1 Reactivos

- **Oxalato de amonio 0,5 M:** se pesan 35,525 gramos de oxalato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> monohidratado y se lleva a un L con agua destilada.
- **Reactivo de tetraborato de sodio:** se pesan 477 mg de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10 H<sub>2</sub>O y se lleva a 100 mL con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, lo que equivale a una concentración de 0,0125 M.
- **Solución de NaOH al 0,5%:** se preparó a partir de una solución de NaOH al 50%, se toman 10 mL de la solución y se lleva a 1 L.
- **Reactivo de meta-hidroxibifenil:** se pesan 150 mg de meta-hidroxibifenil en 100 mL de NaOH al 0,5%. Guardar tapado en el refrigerador.

## 7.2 Extracción

1. Se pesan de 10-11 mg de muestra (R1) y se colocan en un tubo de centrifuga de vidrio de 50 mL. Se agregan 5 mL de oxalato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ ) 0,5 M.
2. Se tapa y se coloca en un baño con agitación a  $90^\circ\text{C}$  por 2 h.
3. Se remueven los tubos y se centrifugan a 3000 rpm (755 RCF) por 15 min. El supernatante (que contiene la pectina) se decanta y se reserva.
4. El residuo se suspende de nuevo en 5 mL de 0,5 M de oxalato de amonio y se repite la extracción y centrifugación.
5. Se combinan los supernatantes y se repite la extracción y centrifugación 2 veces más. Se juntan los supernatantes y se ajusta el volumen a 25 mL y se rotula "supernatante de pectina", el cual se almacena a  $-4^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

## 7.3 Análisis

1. Se toman 600  $\mu\text{L}$  de muestra (supernatante) y se le agregan a un tubo que contiene 3,6 mL del reactivo de tetraborato ácido de sodio decahidratado.
2. Se mezcla vía vortex y se enfría en agua con hielo.
3. Se calienta el tubo a  $100^\circ\text{C}$  por 5 min y se enfría de nuevo con agua helada.
4. Se agregan 60  $\mu\text{L}$  (0,06 mL) de reactivo de meta-hidroxidifenil y se mezcla inmediatamente vía vortex. Después de 5 min a partir del momento que alcanza la temperatura ambiente, se lee la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-visible, UV-240).
5. Se construye un blanco reemplazando la solución de muestra con 600  $\mu\text{L}$  de oxalato de amonio (blanco de calibración). Se construye una curva patrón de ácido galacturónico a concentraciones de 10, 25 y 40  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 7.4 Cálculo

$$\text{Contenido de pectina (\% m/m)} = \frac{\frac{\mu\text{g/mL } \acute{\text{a}}\text{c. galacturónico} \times 25 \text{ mL} \times 0.9}{1000 \mu\text{g/mg}}}{\text{PM (mg)}} \times 100$$

PM = masa de muestra

#### 8. Validación del método de pectinas

Para la validación del método, se trabaja con dos muestras: una enriquecida (tratada exactamente como lo indica el método) y otra muestra sin enriquecer. La muestra enriquecida se trata de la siguiente manera: se pesa la mitad de la cantidad utilizada en la muestra sin enriquecer y se le adiciona una cantidad exactamente pesada de pectina pura (Sigma, P 7536). Se continúa el procedimiento tal y como lo indica el método. Para el cálculo se prosigue de la siguiente manera: con base en los mg de pectina recuperados en la muestra, se calculan los mg que se esperaría obtener en la muestra enriquecida (se utilizan los valores promedio). Luego, a los mg de pectina de la muestra enriquecida se le restan los que hipotéticamente corresponden a la muestra; la diferencia corresponde a los mg de pectina pura agregados. Se establece la relación con respecto a la cantidad de pectina pura original para calcular el porcentaje de recuperación.

Sea "A" la muestra sin enriquecer; "B" la muestra enriquecida; "a" los mg de muestra pesados en "A"; "b" los mg de muestra pesados en "B"; "c" los mg de pectina pura (EEC de Sigma) agregados en la muestra "B"; "x" los mg de pectina recuperados en "A"; "y" los mg de pectina que se esperarían recuperar en "B" correspondientes a "b" mg de muestra pesados en "B" y "z" los mg de pectina totales recuperados en "B". Entonces  $z - y$  son los mg de pectina

correspondientes a la pectina agregada y el porcentaje de recuperación se calcula:

$$\text{Recuperación (\% m/m) de pectinas} = \frac{z - y}{c} \times 100$$

El porcentaje de recuperación de pectinas en frijol rojo fue de 71,6% y para negro de 74,8% (Cuadro A31). Estos porcentajes de recuperación son muy bajos y las posibles razones para esto se deben no sólo al proceso de extracción de la pectina (el cual es lento y tedioso) sino fundamentalmente a una cantidad muy pequeña de muestra utilizada en el análisis (10 a 12 mg de residuo indigerible), lo que sumado a la excasa cantidad de analito puro agregado (aproximadamente 200 µg de pectina pura) introduce mucho error en la determinación.

En promedio, se obtuvo un porcentaje de recuperación total de 73,2% (Cuadro A31), el cual puede ser utilizado para calcular el contenido de pectinas presentes en el residuo indigerible al 100% de recuperación, datos que se tabulan en el Cuadro 6 de Resultados.

## 9. Determinación del contenido (% m/m) de celulosa en el residuo indigerible

Para la determinación de celulosa se construyeron 7 diferentes curvas patrón de glucosa y a partir de éstas se determinó el ámbito lineal, los límites de confianza, la desviación estándar (D.E.) y los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) del método. De la curva de desviación estándar versus concentración se determina la desviación estándar a concentración cero y este valor se emplea en el cálculo de LD y LC. como sigue:

$$\text{Limite de detección (LD)} = 3 \times D.E._{0}$$

$D.E._{0}$  = desviación estándar a concentración cero

$$\text{Limite de cuantificación (LC)} = 10 \times D.E._{0}$$

## 9.1 Reactivos

- **Ácido sulfúrico al 5%:** se toman 52 mL de ácido sulfúrico concentrado de concentración 97% y se llevan a 1 L con agua destilada.
- **Ácido sulfúrico al 72%:** se toman 742 mL de ácido sulfúrico concentrado de concentración 96% y se llevan a 1 L con agua destilada.
- **Fenol al 5% p/v:** se pesan 5 gramos de fenol y se llevan a 100 mL con agua destilada.

## 9.2 Extracción

1. Al residuo remanente en el tubo de centrifuga se le agregan 10 mL de  $H_2SO_4$  al 5% (v/v) y se calienta la mezcla en un baño de agua a ebullición por 2 1/2 h.
2. Se remueve el tubo del baño y se enfría a temperatura ambiente.
3. Se filtra a través de un filtro de microfibra de vidrio Whatman 934 AH y el filtrado que contiene las hemicelulosas y gomas se descarta.
4. El filtro de microfibra de vidrio 934 AH, que contiene la celulosa, lignina y cenizas se remueve y se seca sobre vidrio reloj en un horno de convección a 90 °C toda la noche.
5. Se coloca el filtro en un tubo de centrifuga de vidrio y se agregan 2 mL de  $H_2SO_4$  al 72%, se agita con agitador de vidrio y se deja a 4 °C por 24 h. Se diluye rápidamente la muestra con aproximadamente 20 mL de agua destilada, se centrifuga a 3000 rpm (755 RCF) durante 15 m. Se lleva a 50 mL con agua destilada y se rotula como "supernatante de celulosa".

## 9.3 Determinación

1. La celulosa se mide usando el método de glucosa fenol: se pipetea 3 alícuotas de 0,5 mL (500  $\mu$ L) del eluyente en tubos de ensayo colorimétricos y se mezclan con 1 mL de fenol al 5% (p/v). Se agregan exactamente 2,5 mL de  $H_2SO_4$  concentrado en 5 s con un dispensador, de modo que el vapor del ácido caiga directamente perpendicular a la mitad de la superficie de la solución.

2. Se agita inmediatamente vía vortex durante 2 s. Se desarrolla el color dentro de los siguientes 30 min, el cual permanece estable por varias horas. Se lee la absorbancia a 480 nm contra un blanco (500  $\mu$ L de agua destilada y 1 mL de fenol al 5%).
3. Se construye una curva de glucosa con patrones de concentraciones de 10, 30 y 50  $\mu$ g/mL.

#### 9.4 Cálculo

$$\text{Contenido de pectina (\% m/m)} = \frac{\frac{\mu\text{g/mL glucosa} \times 50 \text{ mL} \times 0.9}{1000 \mu\text{g/mg}}}{\text{PM (mg)}} \times 100$$

PM = masa de muestra

### 10. Determinación de la actividad de la enzima Pectinex Ultra SPL

La enzima pectinolítica usada fue Pectinex Ultra SPL, (EC 3.1.1.11), de Novo Nordisk, Neumatt. Esta enzima posee actividad pectinolítica y un rango de actividad hemicelulásica. Tiene la capacidad de desintegrar las paredes celulares de plantas. Se trata de un líquido pardo, con una temperatura óptima de alrededor a los 40 °C y un pH óptimo cercano a 4.5.

Para determinar su actividad, se mide la reducción de la viscosidad relativa de una disolución de pectina comercial al 1,0% (m/v), haciendo uso de una concentración definida de Pectinex de 1,0 % (m/v). Cada dos min y hasta los 16 min se midió el cambio en la viscosidad de la solución de pectina tratada con la enzima. A los dos min, la solución presentó un cambio en la viscosidad relativa de alrededor del 80%, por lo que se escogió este tiempo para calcular la actividad de Pectinex.



Para el cálculo de la viscosidad, se emplea la siguiente fórmula:

$$\frac{\eta_1}{\eta_2} = \frac{s_1 t_1}{s_2 t_2}$$

donde  $\eta_1$  es la viscosidad de la disolución de pectina al 1,0%;  $\eta_2$  es la viscosidad del agua a 20 °C (1.0050 cP);  $s_1$  es la gravedad específica a 20 °C de la disolución de pectina al 1.0%,  $s_2$  es la viscosidad relativa del agua a 20 °C;  $t_1$  es el tiempo que tarda la disolución de pectina tratada con la enzima en recorrer el volumen del viscosímetro (tipo Ostwald), mantenido en un baño de agua a 40 °C y  $t_2$  el tiempo transcurrido por el agua en recorrer la misma distancia y bajo las mismas condiciones.

La gravedad específica del agua se determina de las tablas (Joslyn, 1970) y la de la disolución, usando un picnómetro a 20 °C. Para ello, se toma la masa del picnómetro seco (a 20 °C), la masa del picnómetro con agua destilada y la masa del picnómetro con la disolución, todos a 20 °C.

La gravedad específica se calcula como:

$$\frac{S_1}{S_2} = \frac{(\text{masa picnómetro más disolución}) - \text{masa picnómetro seco}}{(\text{masa picnómetro más agua}) - \text{masa picnómetro seco}}$$

## 11. Actividad enzimática de la Validase (celulasa)

La enzima celulolítica empleada en este estudio fue la Validase TRL, EC 3.2.1.4, (Valley Research Inc., IN); grado alimentario, en estado líquido; obtenida por fermentación controlada de *Trichoderma reesei*. Esta enzima hidroliza los enlaces  $\beta$ -1.4 glucosídicos de la celulosa, sus oligómeros y derivados (hemicelulosas y polímeros  $\beta$ -glucanos). Esta enzima presenta un rango óptimo de pH de 3,5 a 5,0.

pero es efectivo hasta pH 7,0. El rango óptimo de temperatura es de 45 a 60 °C; temperaturas superiores a los 60 °C rápidamente inactivan la enzima.

Se utiliza la actividad enzimática reportada por la casa distribuidora, (Valley Research Inc., IN) de 13000 CU/g; cada CU (una unidad viscosimétrica celulasa) equivale a la cantidad de actividad que produce un cambio en la fluidez relativa de uno en un sustrato definido de carboximetilcelulosa de sodio en cinco minutos bajo condiciones definidas de ensayo, de manera que una CU es igual a un cambio en la viscosidad relativa de 0,2/min.

## APÉNDICE 2

### CUADROS DE RESULTADOS

Cuadro A1. Tamaño de los frijoles

NEGRO		ROJO	
<i>Largo mm</i>	<i>Ancho mm</i>	<i>Largo mm</i>	<i>Ancho mm</i>
11,5	7,0	10,0	6,0
11,0	7,5	10,0	6,5
12,0	7,5	10,5	7,0
10,75	7,0	9,0	5,5
11,5	7,0	12,0	7,5
11,75	7,0	10,5	6,5
11,75	7,0	10,75	6,75
10,0	6,0	12,0	7,0
11,75	7,0	9,5	6,5
11,0	7,0	12,0	7,0
9,75	6,75	10,5	7,0
10,25	6,75	10,75	6,5
10,5	6,5	10,5	6,75
10,0	6,75	10,0	6,75
11,0	7,0	10,25	7,75
10,5	6,25	10,0	6,0
10,5	7,0	10,0	6,5

**Cuadro A2. Andeva para el tamaño de los frijoles \***

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	1	1.5460	1.5460	2,5466	0,1204
Dentro grupos	32	19.4265	0.6071		
Total	33	20.9724			

Al 95% de confianza

**Cuadro A3. Andeva para el ancho de los frijoles**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	1	0.3603	0.3603	1,6505	0,2081
Dentro grupos	32	6.9853	0.2183		
Total	33	7.3456			

Al 95% de confianza

**Cuadro A4. Absorción de agua \* para los frijoles rojos y los frijoles negros**

Frijol Negro	Frijol Rojo
2.11	1.94
2.11	2.07
2.09	2.02
2.13	1.92
2.07	1.93
2.06	1.90
2.08	1.91
2.11	1.94
2.13	1.92
2.07	1.95
2.10	1.95
2.08	1.99

\* calculada como la masa de frijol remojado (16 h)/masa frijol entero

**Cuadro A5. Andeva para absorción de agua de los frijoles**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	1	0,1203	0,1203	79,5066	0,0000
Dentro grupos	22	0,0333	0,0015		
Total	23	0,1536			

Al 95 % de confianza

**Cuadro A6. Límites de confianza para humedad del frijol negro**

Repetición	n	Media estándar	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%
1	2	13,27	0,08	0,06	12,52 14,02
2	3	13,37	0,16	0,09	12,99 13,76
3	3	13,56	0,09	0,05	13,34 13,79
4	2	13,42	0,06	0,04	12,92 13,93
Total	10	13,42	0,14	0,05	13,32 13,52

**Cuadro A7. Límites de confianza para humedad del frijol rojo**

Repetición	n	Media estándar	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%
1	2	12,38	0,12	0,09	11,29 13,47
2	3	12,50	0,06	0,03	12,36 12,64
3	3	12,8	0,2	0,1	12,3 13,3
4	2	12,79	0,09	0,07	11,94 13,64
Total	10	12,63	0,22	0,07	12,47 12,78

**Cuadro A8. Análisis de varianza para la determinación de humedad en frijol negro**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	3	0,1116	0,0372	2,9747	0,1186
Dentro grupos	6	0,0751	0,0125		
Total	9	0,1867			

**Cuadro A9. Análisis de varianza para la determinación de humedad en frijol rojo**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	3	0,3221	0,1074	6,1291	0,0294
Dentro grupos	6	0,1051	0,0175		
Total	9	0,472			

**Cuadro A10. Límites de confianza para el contenido de sólidos totales del frijol negro**

Repetición	n	Media estándar	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%
1	2	86,73	0,08	0,06	85,98 87,48
2	3	86,63	0,15	0,09	86,24 87,01
3	3	86,44	0,09	0,05	86,21 86,67
4	2	86,58	0,06	0,04	86,07 87,08
Total	10	86,58	0,14	0,05	86,48 86,68

**Cuadro A11. Límites de confianza para el contenido de sólidos totales del frijol rojo**

Repetición	n	Media estándar	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%
1	2	87,62	0,12	0,09	85,53 88,71
2	3	87,50	0,06	0,03	87,36 87,64
3	3	87,2	0,2	0,1	86,7 87,7
4	2	87,21	0,09	0,07	86,36 88,06
Total	10	87,37	0,22	0,07	87,22 87,53

**Cuadro A12. Análisis de varianza para la determinación de sólidos totales en frijol negro**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	3	0,1114	0,0371	2,9765	0,1185
Dentro grupos	6	0,0749	0,0125		
Total	9	0,1863			

**Cuadro A13. análisis de varianza para la determinación de sólidos totales en frijol rojo**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	3	0,3220	0,1063	6,1184	0,0295
Dentro grupos	6	0,1052	0,0175		
Total	9	0,4272			

**Cuadro A14. Contenido de proteína en frijol negro  
(% m/m base seca)**

Repetición	n	Media estándar	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%	
1	2	24.8343	0,0004	0,0003	24,8303	24,8338
2	3	24.25	0,07	0,04	24,07	24,43
3	3	24,3	0,3	0,2	23,6	25,0
Total	8	24,4	0,3	0,1	24,2	24,7

**Cuadro A15. Contenido de proteína en frijol rojo  
(% m/m base seca)**

Repetición	n	Media estándar	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%	
1	2	21,9	0,4	0,3	18,0	25,9
2	3	21,5	0,2	0,1	21,0	22,1
3	3	21,9	0,2	0,1	21,3	22,4
Total	8	21,8	0,3	0,1	21,5	22,0

**Cuadro A16. Análisis de varianza para la determinación de proteínas en frijol  
*Phaseolus vulgaris* (% m/m base seca)**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	1	10,8464	10,8464	150,3334	0,0003
Dentro grupos	4	0,2886	0,0721		
Total	5	11,1349			



**Cuadro A17. Contenido de grasa en frijol negro (% m/m base seca)**

Repetición	n	Media estándar	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%
1	2	2,10	0,02	0,01	1,96 2,24
2	3	1,85	0,08	0,05	1,66 2,05
3	2	1,54	0,03	0,03	1,23 1,85
Total	7	1,83	0,23	0,09	1,62 2,05

**Cuadro A18. Contenido de grasa en frijol rojo (% m/m base seca)**

Repetición	n	Media estándar	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%
1	3	3,11	0,05	0,03	2,98 3,23
2	3	3,06	0,02	0,01	3,02 3,11
3	2	2,55	0,02	0,02	2,36 2,74
Total	8	2,95	0,25	0,09	2,74 3,16

**Cuadro A19. Análisis de varianza para la determinación de grasa en frijol *Phaseolus vulgaris* (% m/m base seca)**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	1	1,7367	1,7367	19,8327	0,0112
Dentro grupos	4	0,3503	0,0876		
Total	5	2,0869			

**Cuadro A20. Contenido de cenizas en frijol negro  
(% m/m base seca)**

Repetición	n	Media estándar	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%	
1	2	3,9005	0,0011	0,0008	3,8910	3,9101
2	3	3,903	0,002	0,001	3,898	3,908
3	3	3,924	0,016	0,009	3,884	3,964
Total	8	3,910	0,014	0,005	3,898	3,922

**Cuadro A21. Contenido de cenizas en frijol rojo  
(% m/m base seca)**

Repetición	n	Media estándar	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%	
1	2	3,78	0,08	0,06	3,06	4,51
2	3	3,76	0,02	0,01	3,72	3,81
3	3	4,0	0,3	0,2	3,3	4,7
Total	8	3,86	0,20	0,07	3,69	4,02

**Cuadro A22. Análisis de varianza para la determinación de cenizas en frijol  
*Phaseolus vulgaris* (% m/m base seca)**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	1	0,0056	0,0056	0,6762	0,4571
Dentro grupos	4	0,0330	0,0083		
Total	5	0,0386			

**Cuadro A23. Contenido de carbohidratos en frijol negro  
(% m/m base seca)**

Repetición	n	Media estándar	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%
1	2	69,71	0,03	0,02	69,44 69,99
2	3	69,9	0,2	0,1	69,4 70,5
Total	5	69,84	0,20	0,09	69,59 70,09

**Cuadro A24. Contenido de carbohidratos en frijol rojo  
(% m/m base seca)**

Repetición	n	Media estándar	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95 %
1	3	71,6	0,2	0,1	71,0 72,1
2	3	71,1	0,5	0,3	69,9 72,3
total	6	71,3	0,4	0,2	70,9 71,8

**Cuadro A25. Análisis de varianza para la determinación de carbohidratos en frijol *Phaseolus vulgaris* (% m/m base seca)**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	1	2,2967	2,2967	31,3059	0,0305
Dentro grupos	2	0,1467	0,0734		
Total	3	2,4435			

**Cuadro A26. Datos para la determinación del contenido de residuo indigerible para el frijol negro (% m/m base seca)**

Repetición	Muestra seca	Residuo Indigerible	Residuo Indigerible % m/m
1.1	2,5147	1,5044	59,82
1.2	2,5250	1,4932	59,14
1.3	2,5072	1,4943	59,60
2.1	2,5225	1,5374	60,95
2.2	2,5251	1,5621	61,86
2.3	2,1675	1,3019	60,06
3.1	2,4646	1,3751	55,80
3.2	2,4866	1,4659	58,95
3.3	2,4687	1,4509	58,77
4.1	2,5106	1,4682	58,48
4.2	2,4738	1,4602	59,03
4.3	2,4807	1,4496	58,44
4.4	2,5135	1,4341	57,06

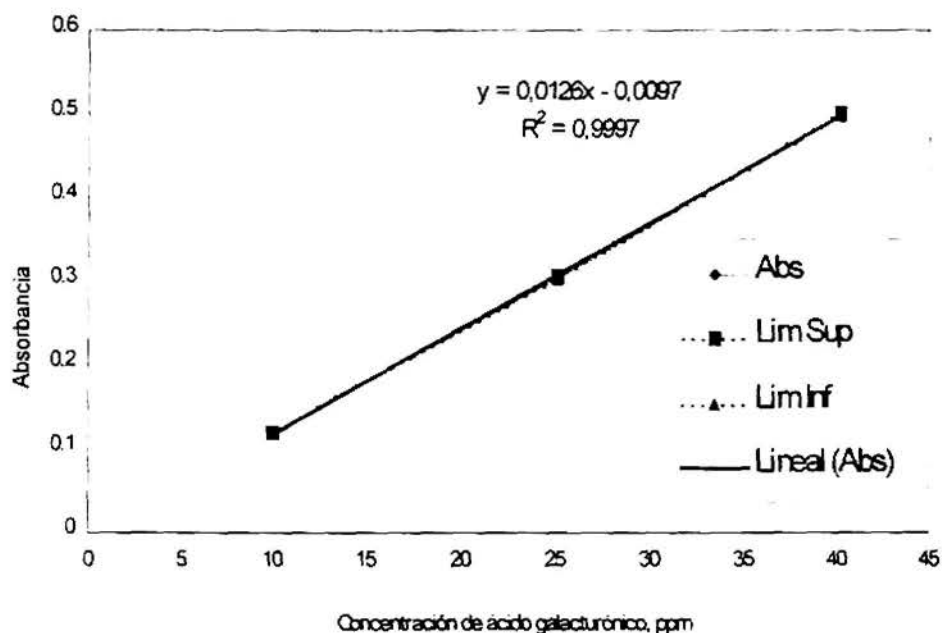
**Cuadro A27. Datos para la determinación del contenido de residuo indigerible para el frijol rojo (% m/m base seca)**

Repetición	Muestra seca	Residuo Indigerible	Residuo Indigerible % m/m
1.1	2,4940	1,5892	63,72
1.2	2,5148	1,5976	63,53
1.3	2,4905	1,5278	61,34
2.1	2,5230	1,4802	58,67
2.2	2,5268	1,4983	59,30
2.3	2,5320	1,4902	58,85
2.4	2,5156	1,5039	59,78
3.1	1,4245	1,4245	57,47
3.2	1,3767	1,3767	56,01
3.3	1,3848	1,3848	56,32
4.1	1,4743	1,4743	59,54
4.2	1,4940	1,4940	60,31
4.3	1,5563	1,5563	61,18
4.4	1,5198	1,5198	60,55

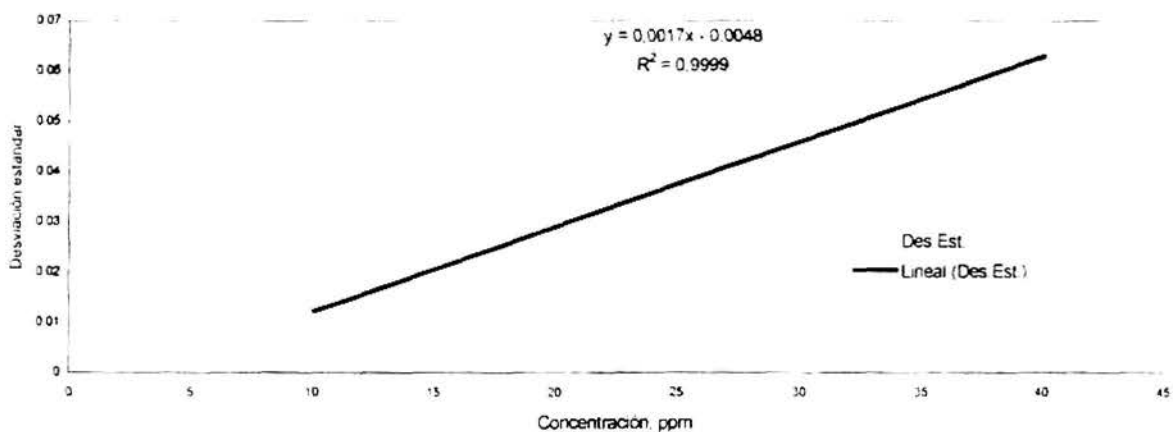
**Cuadro A28. ANDEVA para la determinación de RI en frijol  
*Phaseolus vulgaris* (% m/m base seca)**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	1	3,13938	3,1393	0,8049	0,3782
Dentro grupos	25	97,5089	3,9004		
Total	26	100,6481			

**Figura 1A. Curva de calibración para la determinación del  
Ácido  $\alpha$ - D galacturónico**



**Figura 2A. Desviación estándar versus concentración para la curva de calibración del ácido D-galacturónico**



**Figura 3A. Curva de calibración para la determinación de D-glucosa**

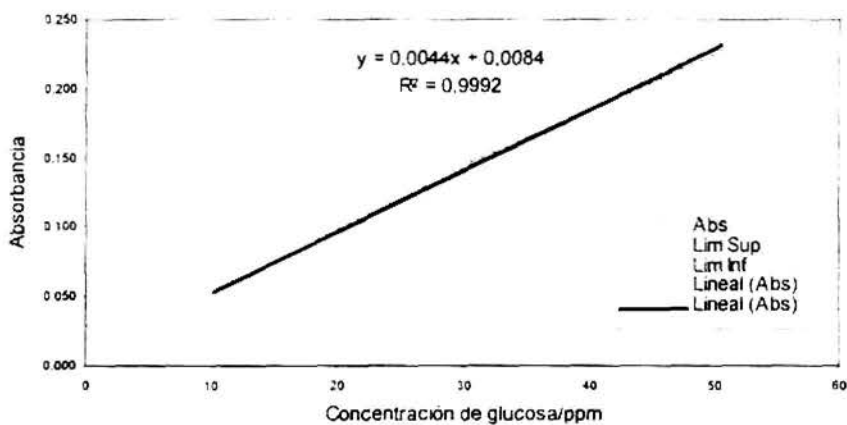
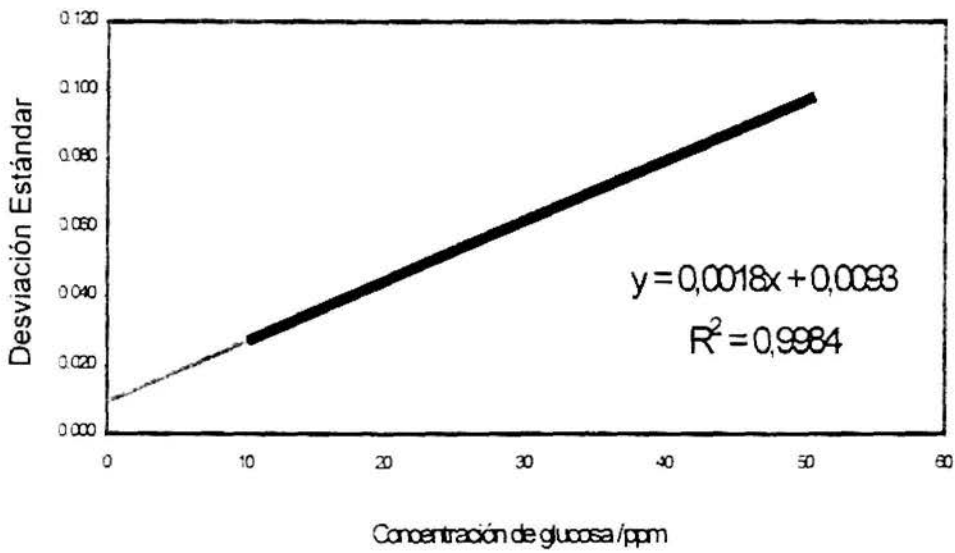


Figura 4<sup>a</sup>. Desviación estándar versus concentración para la curva de calibración de D-glucosa





**Cuadro A29. Datos para el cálculo de recuperación de pectinas  
frijol negro (base seca)**

Repetición	Masa inicial del residuo *	mg de pectina agregados	mg de pectina recuperados *	% de recuperación
1 sin enriquecer	12,15	-	0,4034	
1 enriquecida	5,6	0,2012	0,3339	73,6
2 sin enriquecer	10,65	-	0,3335	
2 enriquecida	6,1	0,2008	0,3486	78,3
3 sin enriquecer	10,75	-	0,3614	
3 enriquecida	5,65	0,2008	0,3354	72,5

\* valores promedio, n = 2

**Cuadro A30. Datos para el cálculo de recuperación de pectinas  
frijol rojo (base seca)**

Repetición	Masa inicial del residuo *	mg de pectina agregados	mg de pectina recuperados *	% de recuperación
1 sin enriquecer	10,55	-	0,3240	
1 enriquecida	6,25	0,2012	0,3272	67,3
2 sin enriquecer	10,6	-	0,4259	
2 enriquecida	5,2	0,2008	0,3524	71,5
3 sin enriquecer	10,3	-	0,4011	
3 enriquecida	5,3	0,2008	0,3593	76,2

\* valores promedio, n = 2

**Cuadro A31. Límites de confianza para la recuperación de pectinas en frijol *Phaseolus vulgaris* (% m/m base seca)**

Frijol	n	Media	Desviación estándar	Error estándar	Límites de confianza para la media *
Negro	3	75	3	2	67 - 83
Rojo	3	72	4	3	61 - 83
Total	6	73	4	2	69 - 77

\* al 95% de confiabilidad

**Cuadro A32. ANDEVA para la determinación del contenido de pectinas en el RI en ambas variedades**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	1	15.0100	15.0100	1.0156	0.3706
Dentro grupos	4	59.1167	14.7792		
Total	5	74.1267			

**Cuadro A33. Contenido de pectinas en el frijol negro\* (% m/m base seca)**

Repetición	Masa mg	Concentración $\mu\text{g/ml}$	% de pectinas
1	11,1	16,280	3,30
2	11,1	14,901	3,02
3	11,0	15,369	3,14
4	10,0	14,165	3,19
5	10,2	14,156	3,12
6	10,8	14,759	3,07
7	10,5	14,879	3,19
8	10,8	15,928	3,32
9	10,7	16,191	3,40

• con un 73.2% de recuperación

**Cuadro A34. Contenido de pectinas en el frijol rojo\*  
(% m/m base seca)**

Repetición	Masa mg	Concentración μg/ml	% de pectinas
1	11,9	19,288	3,65
2	13,5	19,843	3,31
3	10,2	17,004	3,75
4	10,3	17,407	3,80
5	12,0	21,078	3,95
6	12,4	21,622	3,92
7	10,6	19,048	4,04
8	10,6	18,810	3,99
9	10,3	18,268	3,99
10	10,3	17,384	3,78

\* con un 73,2% de recuperación

**Cuadro A35. Análisis de varianza para la determinación de pectinas en el residuo indigerible en ambas variedades**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	1	1,8508	1,8508	56,3565	0,0000
Dentro grupos	17	0,5583	0,0328		
Total	18	2,4090			

**Cuadro A36. Datos para la determinación del contenido de celulosa en frijol negro (% m/m base seca)**

Repetición	Peso mg	Concentración μg/ml	% de celulosa
1	11,8	34,578	13,19
2	10,0	23,070	10,38
3	10,2	30,120	13,29
4	11,0	29,734	12,16
5	12,3	38,920	14,24
6	12,0	39,805	14,93

**Cuadro A37. Datos para la determinación del contenido de celulosa en frijol rojo (% m/m base seca)**

Repetición	Peso mg	Concentración $\mu\text{g/ml}$	% de celulosa
1	10,2	25,830	11,40
2	10,3	24,394	10,66
3	12,0	28,181	10,57
4	12,4	29,318	10,64
5	10,5	29,908	12,82
6	10,6	33,147	14,07

**Cuadro A38. Análisis de varianza para la determinación de celulosa en el residuo indigerible en ambas variedades**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	1	5,3818	5,3818	2,3021	0,1602
Dentro grupos	10	23,3783	2,3378		
Total	11	28,7601			

**Cuadro A39. Determinación de la gravedad específica del agua y de la solución de pectina al 1,0% a 20 °C**

Peso picnómetro seco, 20 °C g	30,9046
Peso picnómetro más agua, 20 °C g	40,9387
Peso picnómetro más solución pectina al 1,0%, 20 °C g	40,9806
$S_1$	10,076
$S_2$	10,0341
$S_1/S_2$	1,0042

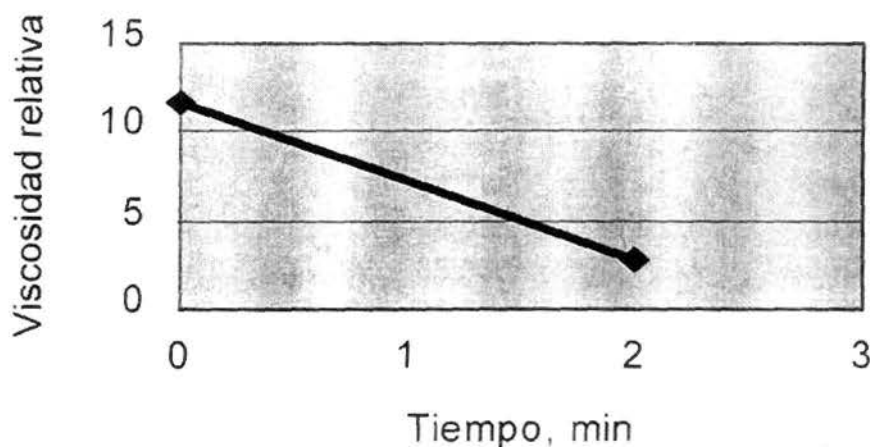
**Cuadro A40. Tiempo recorrido por la solución de pectina tratada con Pectinex y determinación de  $\eta_1$  para cada tiempo**

t medición s	t transcurrido por la disolución de pectina (s)	$\eta_1$ *
0	522	11,6655
2	120	2,6773
4	82,4	1,8414
6	69,2	1,5465
8	63,0	1,4079
10	59,4	1,3275
12	56,9	1,2716
14	55,4	1,2381
16	54,3	1,2135

\* se calcula según la fórmula el tiempo cero corresponde a la solución de pectina sin enzima el tiempo recorrido por el agua a 40 °C fue de 45.16 s (promedio de 8 valores)

Se determinó que una unidad de pectinasa (PG) es igual a la reducción en la viscosidad relativa de 4,5/min (Figura 1A).

**Figura 5A. Determinación de la actividad de Pectinex Ultra SPL sobre solución de pectina comercial al 1,0%**



La ecuación de la línea de mejor ajuste es la siguiente

$$y = -4.4941x + 11.666$$

$$r^2 = 1,0$$

**Cuadro A41. Efecto de Pectinex sobre la digestibilidad *in vitro* del frijol negro y el frijol rojo**

Concentración de enzima %	Frijol Negro % de Residuo Indigerible	Frijol Rojo % de Residuo Indigerible
0	39,60	40,36
	40,55	40,55
	38,53	39,27
	38,81	40,08
	38,24	39,97
	40,46	41,26
0,25	36,26	36,71
	35,61	35,87
	36,09	36,76
	38,81	36,51
	37,15	37,21
	37,99	36,98
0,50	34,19	36,36
	35,52	35,84
	35,78	35,40
	36,67	35,36
	35,53	36,90
	36,08	37,14
1,00	34,66	34,34
	34,77	35,07
	34,01	35,45
	35,33	35,28
	33,72	33,84
	34,75	36,39

**Cuadro A42. Efecto de Pectinex sobre la reducción del residuo indigerible (R.I.) del frijol negro y el frijol rojo**

% enzima utilizado	Frijol Negro		Frijol Rojo	
	contenido R.I. % m/m	% reducción	contenido R.I. % m/m	% reducción
0	39,36		40,25	
0,25	36,65	6,89	36,67	8,88
0,50	35,63	9,49	35,16	10,15
1,0	34,54	12,26	35,06	12,89

**Cuadro A43. Efecto de Validase sobre la reducción del residuo indigerible (R.I.) del frijol negro y el frijol rojo**

% enzima utilizado	Frijol Negro		Frijol Rojo	
	% residuo indigerible	% reducción	% residuo indigerible	% reducción
0	40,16		40,60	
0,25	38,51	4,11	38,28	5,73
0,50	38,44	4,30	36,85	9,25
1,0	38,28	4,70	35,74	11,97

**Cuadro A44. ANDEVA del análisis sensorial con Pectinex. Agrado general del frijol negro**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	1	10770,021	10770,021	13,113	0,0007
Dentro grupos	46	37781,958	821,347		
Total	47	48551,958			

**Cuadro A45. ANDEVA del análisis sensorial con Pectinex.  
Calidad general del frijol negro**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	1	9718,521	9718,521	11,755	0,0013
Dentro grupos	46	38030,458	826,7491		
Total	47	47748,979			

**Cuadro A46. ANDEVA del análisis sensorial con Pectinex.  
Agrado general del frijol rojo**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	1	19602,083	19602,083	23,892	0,0000
Dentro grupos	46	37739,833	820,431		
Total	47	57341,917			

**Cuadro A47. ANDEVA del análisis sensorial con Pectinex.  
Calidad general del frijol rojo**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	1	21888,021	21888,021	33,936	0,0000
Dentro grupos	46	29669,292	644,98460		
Total	47	51557,313			



**Cuadro A48. Efecto de la concentración de la enzima Validase sobre el contenido de RI en ambas variedades de frijol**

Concentración de enzima %	Frijol Negro % de Residuo Indigerible	Frijol Rojo % de Residuo Indigerible
0	42,28	42,61
	38,87	40,11
	39,81	40,78
	38,94	41,04
	39,58	40,42
	40,39	40,46
	41,13	39,16
	40,33	40,25
0,25	38,73	37,43
	37,87	36,58
	37,83	38,97
	37,82	37,78
	39,60	39,66
	39,39	39,76
	38,22	37,91
	38,64	38,12
0,50	39,58	35,436
	39,51	36,45
	37,99	37,15
	35,44	37,31
	36,24	36,69
	37,46	36,66
	38,99	36,82
	39,64	37,87
1,00	38,81	35,04
	37,08	35,14
	36,34	37,40
	37,59	36,69
	39,32	35,62
	39,91	34,81
	38,84	35,54
	38,35	35,72

**Cuadro A49. ANDEVA del análisis sensorial con Validase.  
Agrado general para el frijol negro**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	1	1250,5208	1250,5208	2,2995	0,1363
Dentro grupos	46	25015,4583	543,8143		
Total	47	26265,9792			

**Cuadro A50. ANDEVA del análisis sensorial con Validase.  
Calidad general para el frijol negro**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	1	1485,1875	1485,1875	3,4190	0,0709
Dentro grupos	46	19982,1250	434,3940		
Total	47	21467,3125			

**Cuadro A51. ANDEVA del análisis sensorial con Validase.  
Agrado general para el frijol rojo**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	1	243,0000	243,0000	0,2630	0,6105
Dentro grupos	46	42500,9167	923,9330		
Total	47	42743,9167			

**Cuadro A52. ANDEVA del análisis sensorial con Validase.  
Calidad general para el frijol rojo**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	Razón de F	Probabilidad de F
Entre grupos	1	180,1875	180,1875	0,2520	0,6181
Dentro grupos	46	32896,2917	715,1368		
Total	47	33076,4792			