

Efecto de la adición de una pectinasa y una celulasa sobre la digestibilidad *in vitro* del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

Floribeth Víquez Rodríguez, Ana Ruth Bonilla Leiva

Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, Costa Rica, C.A.

RESUMEN. Se midió el efecto de la adición de una pectinasa y una celulasa comerciales sobre la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica de dos variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), una negra (Brunca) y una roja (Chirripó). Se mantuvieron condiciones fijas de pH (entre 6,3 y 6,4), tiempo (60 min) y temperatura (40°C) y se ensayaron tres concentraciones de cada enzima: 0,25%, 0,50% y 1,0% m/m. Los incrementos en la digestibilidad *in vitro* del frijol negro fueron 6,9%; 9,5% y 12,3% ($p < 0,05$), para los respectivos incrementos en la concentración de pectinasa y del frijol rojo de 8,9%; 10,2% y 12,9% ($p < 0,05$). El efecto de la celulasa fue dependiente de la concentración de enzima y de la variedad de frijol. La digestibilidad *in vitro* del frijol rojo aumentó en 5,7%; 9,2% y 12,0% ($p < 0,05$), con los incrementos en la concentración de celulasa; la digestibilidad del frijol negro aumentó en menos de un 5% ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la aceptación general de los frijoles tratados enzimáticamente (negro o rojo) y los frijoles sin tratar.

Palabras clave: Frijol (*Phaseolus vulgaris*); digestibilidad *in vitro*; pectinasa; celulasa.

SUMMARY. Effect of pectinase and cellulase addition on *in vitro* digestibility of common bean (*Phaseolus vulgaris*). Effect of commercial pectinase and cellulase addition on *in vitro* digestibility of two common bean (*Phaseolus vulgaris*) varieties, black (Brunca) and red (Chirripó), was measured. Constant conditions of pH (6,3-6,4), time (60 min), and temperature (40°C) were held, and three enzyme concentrations were tested: 0,25%, 0,5% and 1,0% m/m. *In vitro* digestibility increases for black beans were 6,9%; 9,5% and 12,3% ($p < 0,05$), and for red beans were 8,9%; 10,2% and 12,9% ($p < 0,05$), with increasing pectinase concentration. Effects of cellulase were dependent upon both, enzyme concentration and bean variety. *In vitro* digestibility of red beans increased by 5,7%; 9,2% and 12,0% with increasing cellulase concentration; digestibility of black beans increased by less than 5%. No significant difference ($p > 0,05$) in general acceptance of enzyme treated beans (black or red) or nontreated beans was noted. **Key words:** Beans (*Phaseolus vulgaris*); *in vitro* digestibility; pectinase; cellulase.

INTRODUCCION

Los frijoles son un alimento básico y tradicional en la dieta del costarricense, al igual que lo es en la de muchos otros países del área centroamericana. A pesar de ser un alimento rico en nutrientes, tales como proteínas, carbohidratos, fibra, ciertas vitaminas y minerales, su consumo se ve restringido por la presencia de factores antinutricionales, una baja digestibilidad de la proteína y del almidón y los problemas de flatulencia que ocasiona su ingesta.

Se ha comprobado que los principales causantes de flatulencia en el frijol común son el almidón resistente, los oligosacáridos de la familia de la rafinosa y los componentes de la fibra dietética (1-7). Tanto el almidón resistente como los componentes de la fibra dietética tienen efectos fisiológicos beneficiosos para la salud, ejercen un efecto protector sobre diversos tipos de cáncer, así como enfermedades cardiovasculares, el tratamiento de la diabetes y la reducción del colesterol, entre otros (8-10).

Diversos procesos que mejoran la digestibilidad de la proteína y del almidón de leguminosas, así como tratamientos que eliminan los problemas de flatulencia debido al almidón resistente y a los oligosacáridos de la familia de la rafinosa han sido reportados en la literatura (11-15). Sin embargo, no existen referencias del uso de pectinasas y celulasas para mejorar la digestibilidad del frijol común.

El objetivo de este estudio fue evaluar, mediante tratamientos independientes, el efecto de la adición de una pectinasa y una celulasa comerciales sobre el contenido de residuo indigerible (RI) de dos variedades de frijol de diferente coloración, con el propósito de encontrar un tratamiento que mejore la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica del frijol común (*Phaseolus vulgaris*).

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron dos variedades de frijol común, una negra (Brunca) y una roja (Chirripó), suministradas por la Estación Experimental Fabio Baudrit de la Universidad de Costa Rica.

La pectinasa empleada fue "Pectinex Ultra SPL" (Novo Nordisk). Mediante la reducción de la viscosidad relativa con respecto al tiempo de una disolución de pectina comercial al 1,0% (m/v) y utilizando una concentración definida de Pectinex de 1,0% (m/v) se determinó que una unidad PG (unidad viscosimétrica pectinasa) equivale a 4,5 veces el cambio de viscosidad/min. La celulasa utilizada fue "Validase TRL" (Valley Research Inc., IN), para la cual la casa comercial reporta que una unidad CU (unidad viscosimétrica celulasa) equivale a 0,2 veces el cambio de viscosidad/min.

Para los tratamientos enzimáticos, tanto de la pectinasa como de la celulasa, se trabajó con pastas de frijol obtenidas de la siguiente manera: los frijoles se remojaron en agua 16 h, utilizando una relación 1:3 (frijol:agua); luego se eliminó el agua de remojo y se cocieron en una olla de presión (15 lb/plg²) por 5 min, utilizando una relación 1:1 (frijol: agua); se homogeneizaron en una licuadora de alta velocidad hasta obtener una pasta fina con un contenido de sólidos entre 74 y 77%. En cada tratamiento se emplearon 100 g de la pasta de frijol homogeneizada. Se mantuvieron condiciones fijas de pH (entre 6,3 y 6,4), temperatura (40°C) y tiempo de acción enzimática (60 min). Se ensayaron tres concentraciones de cada enzima: 0,25%, 0,5% y 1,0% m/m. En todos los casos, se empleó un control, sin adición de la enzima.

Una vez concluido el tiempo de acción de la enzima, ésta se inactivó mediante la adición de HCl concentrado hasta un pH de 1,9-2,0. Las muestras se deshidrataron en una estufa de convección a 85°C, durante la noche (16 ± 2 h), se molieron en un molino (Cienceware Micro Mill, Belt Art Products, NJ), se pasaron a través de una malla de 40 mesh y se les determinó el contenido de residuo indigerible (RI). Para el análisis de digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica, se empleó el método descrito por Tomkinson (5), empleando las enzimas pepsina y pancreatina, variando los tiempos de acción a 2 h, según lo recomiendan Kon *et al.* (18). Se pesó por triplicado exactamente 2,55 g de muestra seca y se colocó en una botella de centrifuga de 250 mL. Se agregó 90 mL de agua destilada y unos cristales de timol. Se tapó y se colocó en un baño con agua a ebullición 30 min. Se enfrió a temperatura ambiente y se adicionó 15 mL de pepsina de concentración 10 mg/mL. Se ajustó el pH a 1,9-2,0, con HCl concentrado, utilizando un pH-metro. Se colocó 2 h en un baño a 40°C con agitación. Se ajustó el pH a 6,8 con NaOH 0,5 M. Se agregó 15 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0,1 M (pH 6,8) conteniendo 10 mg/mL de pancreatina, previamente filtrada a través de un papel Whatman N° 41. Se colocó 2 h en un baño a 40°C con agitación. Se enfrió y se adicionó 4 volúmenes de etanol a 60°C, se dejó reposar 30 min. Se centrifugó a 2000 rpm (336 RCF) 4 min. Se descartó el supernatante y el residuo se deshidrató a 70 °C durante la noche (16 ± 2 h) en una estufa al vacío. Se enfrió a temperatura

ambiente y se pesó. Se seleccionó la concentración de enzima que logró la mayor digestibilidad *in vitro* (el menor contenido de RI). Esta concentración fue usada posteriormente para medir el efecto sobre la calidad y el agrado general.

Los resultados se analizaron mediante un análisis de ANDEVA, al 95% de confiabilidad. Se determinó el efecto de la adición de la enzima mediante un modelo de regresión múltiple, analizando el efecto de la variedad de frijol, el efecto de la enzima, de la concentración de la enzima y de la interacción enzima:variedad.

Para el análisis sensorial se empleó pasta homogeneizada de frijol obtenida de la manera como se describió anteriormente. Se empleó la concentración de enzima seleccionada y la temperatura, tiempo y pH descritos. Una vez cumplido el tiempo de acción de la enzima, ésta se inactivó calentando la muestra a aproximadamente 85°C, 5 min. Se adicionó 0,3% de sal (NaCl), 0,2% de cebolla (*Allium cepa*), 0,1% de ajo (*Allium sativum*), 0,1% de culantro (*Coriandrum sativum*) y 0,1% de chile dulce (*Capsicum annuum*) a ambas muestras (el control y la muestra tratada con la enzima). Se determinó el agrado y la calidad general del producto, utilizando una escala hedónica no estructurada de 150 puntos y 24 jueces entrenados. Los resultados se analizaron mediante un análisis de ANDEVA, al 95% de confiabilidad.

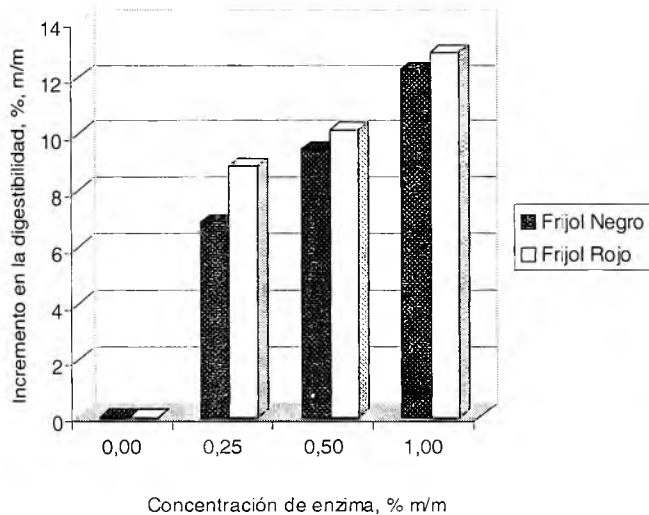
RESULTADOS Y DISCUSION

La acidificación de las muestras, que se realizó para la inactivación de las enzimas, favorece la hidrólisis de los enlaces glucosídicos tanto de la pectina como de la celulosa. Sin embargo, esto no afecta los valores del incremento en la digestibilidad *in vitro* que se reportan a continuación, ya que los mismos fueron establecidos utilizando como referencia un control sin tratamiento enzimático, bajo las mismas condiciones de acidificación y secado.

El contenido promedio de RI en las muestras sin enzima fue de 39,8%. Al adicionar pectinasa, se pudo determinar que su efecto sobre el contenido de RI no fue afectado por la variedad de frijol ($p > 0,05$). También se pudo observar que un incremento en la concentración de la enzima aumentó la digestibilidad *in vitro* de ambas variedades, lo cual se manifiesta por una reducción en el contenido de RI. La Figura 1 muestra los incrementos de digestibilidad *in vitro* obtenidos con las dos variedades de frijol, de acuerdo con la concentración de la enzima. Con una concentración de 1,0% m/m (la mayor concentración utilizada) se obtuvo un RI de 34,9% para frijol negro (variedad Brunca) y de 34,7% para el frijol rojo (variedad Chirripó), lo que significa incrementos en la digestibilidad *in vitro* de 12,3% y 12,9%, respectivamente.

FIGURA 1

Efecto de la adición de una pectinasa comercial* sobre la digestibilidad *in vitro* de dos variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris*)



*Pectinex Ultra SPL (Novo Nordisk)
Actividad = 26 000 PG/mL
1 PG = 4,5 cambio de viscosidad/min

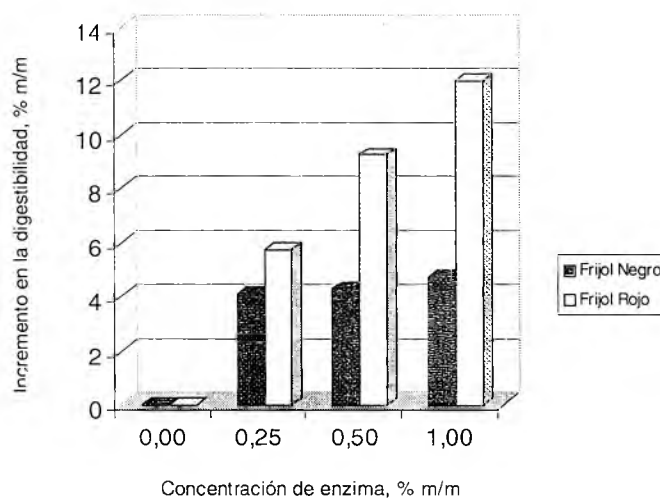
A partir del análisis de regresión múltiple, se pudo obtener la ecuación que mide el efecto de la concentración de la pectinasa sobre el contenido de RI (Ecuación 1). Si se trabaja a las mismas condiciones de ensayo descritas y dentro del rango de concentración estudiado, esta ecuación puede emplearse para estimar, con un 69 % de probabilidad, el efecto sobre el contenido de RI a otras concentraciones de la enzima.

$$RI (\% m/m) = 38,84 - 4,58 \times \text{concentración} + e_j \tag{Ecuación 1}$$

A pesar de que los panelistas percibieron cambios en la textura final del producto tratado con pectinasa (una ligera "arenosidad"), el agrado general de los frijoles con y sin enzima fue similar ($p > 0,05$), tanto para el frijol rojo como para el negro. Se obtuvo una calificación promedio de 108 puntos en una escala hedónica no estructurada de 150 puntos. Se encontró que el efecto de la celulasa sobre el contenido de RI fue diferente según la variedad de frijol empleada ($p < 0,05$). El contenido promedio de RI de los frijoles sin tratamiento enzimático fue de 39,8%; al adicionar un 1,0% de la enzima disminuye a 37,9% en el frijol negro y a 35,0% en el frijol rojo. Esto implica que la digestibilidad *in vitro* del frijol negro se incrementó en un 4,7%, mientras que la del rojo en un 12,0 % (Figura 2).

FIGURA 2

Efecto de la adición de una celulasa* sobre la digestibilidad *in vitro* de dos variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris*)



*Validase TRL (Valley Research Inc.)
Actividad = 13000 CU/g
1 CU = 0,2 cambio viscosidad/min

El modelo con interacción es el que mejor explica el efecto de la celulasa sobre el contenido de RI. La Ecuación 2 permite estimar, con un 61 % de probabilidad, el efecto de la celulasa a otras concentraciones, bajo las condiciones de ensayo descritas y dentro del rango de concentración estudiado.

$$RI (\% m/m) = 39,53 - 1,57 \times \text{conc.} + 0,35 \times \text{vari.} - 3,006 \times \text{inter.} + e_{ij} \tag{Ecuación 2}$$

Si el frijol es negro, vari. (variedad) es 0 e inter. (interacción enzima: variedad) también es cero, con lo que el efecto de la celulasa sobre el contenido de RI en el frijol negro se puede calcular como sigue:

$$RI (\% m/m) = 39,53 - 1,57 \times \text{conc.}$$

Si el frijol es rojo, vari. es 1 e inter. también es 1 y el contenido de RI va a depender de la concentración de la enzima de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$RI (\% m/m) = 39,53 - 4,63 \times \text{conc.}$$

Desde el punto de vista sensorial, no se encontraron diferencias significativas en cuanto al agrado y calidad general del frijol tratado con un 1,0% m/m de celulasa y el

frijol sin tratamiento ($p > 0,05$), tanto para el frijol rojo como para el negro, obteniéndose una calificación promedio de 120 puntos en una escala hedónica no estructurada de 150 puntos. La glucosa que resulta de la hidrólisis de la celulosa le imparte un sabor residual dulce, que resultó agradable al gusto de los panelistas. Los jueces no detectaron cambios en la textura; el producto tratado con celulasa obtuvo una calificación general promedio superior al obtenido con pectinasa ($p < 0,05$).

CONCLUSIONES

El mayor efecto de la adición de la pectinasa se obtuvo al utilizarla al 1%, lo cual aumentó la digestibilidad *in vitro* de las dos variedades de frijol, rojo y negro, en un 12,9% y un 12,3% respectivamente. El efecto de la celulasa no sólo fue dependiente de la concentración de la enzima, sino además, de la variedad de frijol. La digestibilidad *in vitro* del frijol rojo aumentó en un 12% (máximo valor obtenido) utilizando 1% de la enzima, mientras que la digestibilidad del frijol negro no sobrepasó un incremento del 5%.

Debido a la importancia del consumo de frijoles en la población costarricense, el incremento en la digestibilidad *in vitro* del frijol común obtenido en este estudio cobra relevancia desde el punto de vista nutricional, especialmente en ciertos sectores de nuestro país, tales como niños de corta edad, ancianos y vegetarianos, que basan su suministro de proteína y de hierro a través del consumo de esta leguminosa.

Esta investigación formó parte del Programa "Bean Cowpea Collaborative Research Support Programa (CRSP)" y fue financiada por la Agencia Internacional para el Desarrollo (USAID) Grant N° DAN-G-SS-86-0008-88

REFERENCIAS

1. Tovar J. Bioavailability of carbohydrates in legumes: digestible and indigestible fractions. *Arch Latinoamer. Nutr.* 1994;44 (4-S): 36 S- 40 S.
2. Annison G & Topping DL Nutritional role of resistant starch: chemical structure and physiological function. *Annu Rev Nutr.* 1994;14: 297-320.
3. Nanna IA. & Phillips RD. Protein and starch digestibility and flatulence potential of germinated cowpeas (*Vigna unguiculata*). *J Food Sci.* 1990;55(1): 151-153. 183.
4. Englyst HN & Cummings JH. Non starch polysaccharides (dietary fiber) and resistant starch. In *New developments in dietary fiber.* Furda, I. & Brine, C.J., eds. Plenum Press. New York. 1990;205-225.
5. Tomkinson RA. Studies on the indigestible and fermentable components of dry bean and cereal grains. Thesis M.Sc. Michigan State University, Department of Crop and Soil Science, Michigan. 1986;48-58.
6. Reddy NR, Pierson MD, Sathe SK & Salunkhe DK. Chemical, nutritional and physiological aspects of dry bean carbohydrates. A review. *Food Chem.* 1984;13:25-68.
7. Fleming SE. A study of relationships between flatus potential and carbohydrate distribution in legume seeds. *J Food Sci.* 1981;46:794-798.
8. Kellogg's. Importancia de la fibra. *Dieta y Salud* 1997;7 (1):1-16.
9. Gurr MI & Asp NG. 1994. Dietary Fiber. ILSI Europe Concise Monograph Series. ILSI Press. Washington, D.C. 23 p.
10. Kritchesky D. Cereal fiber and lipidemia. *Cereal Foods World* 1997;42 (2): 81-85.
11. 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 Lic. en Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Facultad de Agronomía. San José. 36 p.
12. Chau CF & Cheung PCK. Effect of various processing methods on antinutrients and *in vitro* digestibility of protein and starch of two Chinese indigenous legume seeds. *J Agr Food Chem.* 1997;45(12): 4773-4776.
13. Barampama Z & Simard RE. Effects of soaking, cooking and fermentation on composition, *in vitro* starch digestibility and nutritive value of common beans. *Plant Foods Human Nutr.* 1995;418 (4): 349-365.
14. Marques MH, Casa Nova S, Fernández ML & Gomes AM. Insoluble dietary fiber of grain food legumes and protein digestibility. *Arch Latinoamer Nutr.* 1993;43(1): 66-72.
15. Borejszo Z & Khan K. Reduction of flatulence causing sugars by high temperature extrusion of pinto bean high starch fractions. *J Food Sci.* 1992;57(3): 771-777.
16. Kon S, Wagner JR, Becker R, Booth AN & Robbins DJ. Optimizing nutrient availability of legume food products. *J Food Sci.* 1971;36: 635-639.

Recibido: 23-04-2001

Aceptado: 19-02-2002