

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DESARROLLO DE UN PROCESO ESTANDARIZADO DE FERMENTACIÓN
LÁCTICA DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) VAR. PINTO AMERICANO PARA
PRODUCCIÓN DE UN INGREDIENTE TECNOFUNCIONAL

Por

MA. DEL CARMEN CARDENAS CARDENAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Acentuación en Alimentos

Mayo, 2018

**DESARROLLO DE UN PROCESO ESTANDARIZADO DE FERMENTACIÓN
LÁCTICA DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) VAR. PINTO AMERICANO PARA
PRODUCCIÓN DE UN INGREDIENTE TECNOFUNCIONAL**

Comité de Tesis

Dra. María Guadalupe de Jesús Alanís Guzmán
Presidente

Dr. Arturo Espinoza Mata
Secretario

Dr. Juan Gabriel Báez González
Vocal

Dr. Carlos Javier Aguilera González
Vocal

Dra. Sandra Loruhamá Castillo Hernández
Vocal

**DESARROLLO DE UN PROCESO ESTANDARIZADO DE FERMENTACIÓN
LÁCTICA DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) VAR. PINTO AMERICANO PARA
PRODUCCIÓN DE UN INGREDIENTE TECNOFUNCIONAL**

Dirección de Tesis

Dra. María Guadalupe de Jesús Alanís Guzmán
Director

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios, por permitirme alcanzar esta meta, que forma parte de un proyecto de vida construido hace algunos años. Gracias por estar conmigo siempre, por escucharme, responderme y darme fortaleza. Cada logro alcanzado y cada obstáculo superado dan testimonio de Tu Amor y de que los límites sólo existen en la mente.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgarme una beca para realizar los estudios del programa de Doctorado en Ciencias con Acentuación en Alimentos.

Asimismo, agradezco a la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL y a la Subdirección de Estudios de Posgrado de esta dependencia, por permitir la realización de los estudios de doctorado.

Dra. Guadalupe Alanís Guzmán, gracias por recibirme en el Departamento de Alimentos y aceptarme como su alumna tesista. Gracias por su asesoría, su paciencia y el apoyo brindado durante y después del proyecto, dando seguimiento hasta la conclusión de la tesis.

Dr. Arturo Espinoza Mata, gracias por aceptarme en el Laboratorio de Microbiología Médica y Sanitaria, por todo su apoyo en dudas, con el material y los reactivos que necesité durante mi estancia y por la confianza depositada en mí para formar parte de su laboratorio.

Dra. Sandra Castillo, gracias por siempre apoyarme en todo, en dudas, asesoría, reactivos, material y sobre todo, por brindarme tu amistad.

Agradezco a mis tutores: Dr. Carlos García, por estar al pendiente de las evaluaciones y avances de tesis; Dr. Carlos Aguilera, por ser un excelente guía en metodología de la

investigación, por sus observaciones y sugerencias, y estar al tanto de los avances del proyecto.

Dr. Juan Báez y Dr. Carlos Amaya, gracias por los conocimientos y experiencia compartidos en las clases y durante las evaluaciones. Me gusta su visión de trabajo en equipo interdisciplinario para avanzar en la ciencia.

Agradezco también, al M.C. Francisco Javier Sánchez del Laboratorio de Microbiología Médica y Sanitaria, por el apoyo otorgado durante mi estancia en el laboratorio, por la confianza brindada para trabajar ahí y compartir su experiencia. Igualmente, a la Química Cristina González por la ayuda técnica proporcionada durante mi estancia en el Departamento de Alimentos.

Por supuesto, agradezco a mis padres, Felipe Cárdenas Guzmán y Carmen Cárdenas Herrera, por estar siempre a mi lado apoyándome en cada decisión que he tomado, por tener para mí palabras de aliento en momentos difíciles y celebrar conmigo cada victoria. Por ustedes he llegado hasta aquí y salgo cada día buscando dar lo mejor.

A mis hermanos, Felipe Cárdenas y Pedro Daniel Cárdenas, gracias por escuchar y aconsejarme cuando lo he necesitado; por ayudarme en las dificultades y también por estar presentes en los buenos momentos.

Gracias a mis compañeros de laboratorio y de estudios: Minerva Bautista, Jenny Rodríguez, Alma Mora, Ana Aidé Pérez Bolado, Alejandra Guzmán, Edith Espinoza, Cynthia Torres, Verónica de la Cruz, Mónica Ibarra, Daniela Herrera, Irasema Medina, Adriana Ruiz, Analía Lu, Ricardo García, Tere Solís. Cada uno de ustedes me enseñó algo, contribuyó para que este camino fuera más sencillo, mi estancia en el Departamento de Alimentos fuera agradable y ahora guardo buenos recuerdos.

Gracias a todos, por todo, Dios bendiga su vida y tengan Éxito en lo que emprendan.

DEDICATORIA

A Dios,
Mi Fortaleza.

A mis padres,
Felipe de J. Cárdenas Guzmán

y

Carmen Cárdenas Herrera

quienes me apoyan en cada una de mis razones y
locuras...

ÍNDICE

Índice de tablas	xii
Índice de figuras	xiii
Lista de símbolos y abreviaturas	xv
Resumen	xviii
Abstract	xix
Introducción	1
Antecedentes	3
2.1 Frijol	3
2.2 Componentes de interés nutricional en leguminosas	7
2.2.1 Proteína	7
2.2.2 Carbohidratos	10
2.2.2.1 Almidón	10
2.2.2.1.1 Almidón resistente	11
2.2.2.2 Fibra dietética	12
2.2.3 Lípidos	14
2.2.4 Fitoquímicos	14
2.3 Factores antinutricionales en leguminosas	16
2.3.1 α -Galactósidos	16
2.3.2 Ácido fítico	18

2.3.3 Taninos	19
2.3.4 Inhibidores enzimáticos	19
2.3.5 Lectinas	21
2.4 Fermentación en leguminosas	21
2.5 Efecto de la fermentación en propiedades nutricionales de leguminosas ..	25
2.6 Propiedades tecnofuncionales	31
2.6.1 Absorción de agua	32
2.6.2 Retención de agua	33
2.6.3 Retención de aceite	33
2.6.4 Capacidad de hinchamiento	34
2.6.5 Gelificación	34
2.6.6 Capacidad espumante	35
2.6.7 Capacidad emulsionante	35
2.6.8 Densidad aparente	36
2.7 Efecto del procesamiento en propiedades tecnofuncionales.....	36
Justificación	39
Hipótesis	40
Objetivos	41
Material y métodos	42
6.1 Muestras	42
6.2 Fermentación natural	42
6.2.1 Microorganismos indicadores	43
6.2.1.1 Preparación de la muestra	43
6.2.1.2 Mesófilos aerobios	44
6.2.1.3 Coliformes totales	44
6.2.1.4 Enterococos totales	45

6.2.2 Bacterias ácido lácticas (BAL)	46
6.3 Identificación de bacterias ácido lácticas aisladas en el proceso de fermentación natural	47
6.3.1 Identificación bioquímica	47
6.3.1.1 Pruebas bioquímicas primarias	47
6.3.1.1.1 Tinción de Gram	47
6.3.1.1.2 Prueba de la catalasa	48
6.3.1.1.3 Prueba de la oxidasa	48
6.3.1.1.4 Prueba de oxidación/fermentación (O/F)	48
6.3.1.1.5 Prueba de movilidad	50
6.3.1.2 Pruebas bioquímicas de segunda etapa	50
6.3.1.2.1 Hemólisis	50
6.3.1.2.2 Crecimiento a 45 °C	50
6.3.1.2.3 Sobrevivencia a 60 °C durante 30 min	50
6.3.1.2.4 Crecimiento en pH 9.6	51
6.3.1.2.5 Arabinosa (ácido)	51
6.3.1.2.6 Glicerol (ácido)	51
6.4 Fermentación inducida del frijol con bacterias ácido lácticas	51
6.4.1 Condiciones óptimas para BAL	51
6.4.2 Sanitización de frijol para la fermentación inducida	52
6.5 Proceso fermentativo inducido del frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) var. pinto americano	53
6.6 Análisis químico-nutricional	54
6.6.1 Análisis proximal	54
6.6.2 Digestibilidad <i>in vitro</i> de la proteína	54
6.6.2.1 Digestión <i>in vitro</i>	54
6.6.2.2 Determinación de la proteína en el digerido	55
6.7 Propiedades tecnofuncionales	55
6.7.1 Absorción de agua	56
6.7.2 Absorción de aceite	56
6.7.3 Gelificación	56

6.7.4 Capacidad espumante	57
6.7.5 Capacidad emulsificante	57
6.7.6 Densidad aparente	57
6.8 Calidad microbiológica de los productos de fermentación de frijol (<i>P. vulgaris</i>) var. pinto americano	58
Resultados	59
7.1 Fermentación natural	59
7.2 Identificación de bacterias ácido lácticas aisladas en el proceso de fermentación natural	62
7.3 Fermentación inducida del frijol con bacterias ácido lácticas	64
7.3.1 Determinación de condiciones óptimas para BAL	64
7.3.2 Sanitización de frijol por tratamiento térmico	65
7.3.3 Sanitización de frijol con hipoclorito de sodio 1 % (v/v) y ácido láctico 10 % (v/v)	66
7.4 Proceso fermentativo inducido del frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) var. pinto americano	67
7.5 Análisis químico-nutricional	72
7.5.1 Análisis proximal	72
7.5.2 Digestibilidad <i>in vitro</i> de la proteína	73
7.6 Propiedades tecnofuncionales	74
7.7 Calidad microbiológica de los productos de fermentación de frijol (<i>P. vulgaris</i>) var. pinto americano	75
Discusión	78
8.1 Fermentación natural	78
8.2 Identificación de bacterias ácido lácticas aisladas en el proceso de fermentación natural	78
8.3 Condiciones óptimas de fermentación para las bacterias ácido lácticas ...	79

8.4 Fermentación inducida de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) var. pinto americano	80
8.5 Análisis químico-nutricional	81
8.5.1 Análisis proximal	81
8.5.2 Digestibilidad <i>in vitro</i> de la proteína	81
8.6 Propiedades tecnofuncionales	83
8.7 Calidad microbiológica de los productos de fermentación de frijol (<i>P. vulgaris</i>) var. pinto americano	84
Conclusiones	86
Perspectivas	88
Bibliografía	89
Resumen biográfico	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información nutricional de frijol	5
Tabla 2. Los principales α -galactósidos	16
Tabla 3. Pruebas bioquímicas primarias	62
Tabla 4. Pruebas bioquímicas de segunda etapa	63
Tabla 5. Resultados de pruebas de condiciones para favorecer el crecimiento de BAL aisladas en fermentación natural	65
Tabla 6. Composición proximal y fibra dietética total, insoluble (FDI) y soluble (FDS) de frijol (<i>P. vulgaris</i>) var. pinto americano	73
Tabla 7. Porcentajes de digestibilidad proteica <i>in vitro</i> y de proteína digerible en frijol (<i>P. vulgaris</i>) var. pinto americano con distintos tratamientos	74
Tabla 8. Propiedades tecnofuncionales de frijol (<i>P. vulgaris</i>) var. pinto americano con distintos tratamientos	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los principales componentes del almidón	11
Figura 2. Estructura de los principales α -galactósidos	17
Figura 3. Estructura del ácido fítico	18
Figura 4. Prueba OF. Prueba negativa	49
Figura 5. Prueba OF. Prueba positiva	49
Figura 6. Prueba OF. Prueba positiva para metabolismo oxidativo	49
Figura 7. Condiciones de temperatura, pH y presencia de oxígeno/dióxido de carbono a las que se sometieron las bacterias ácido lácticas	52
Figura 8. Microorganismos presentes durante la fermentación natural de frijol (<i>P. vulgaris</i>) var. pinto americano	59
Figura 9. Valores de pH durante la fermentación natural de frijol (<i>P. vulgaris</i>) var. pinto americano	60
Figura 10. Microorganismos indicadores presentes en la fermentación natural de frijol (<i>P. vulgaris</i>) var. pinto americano con agitación a 140 ciclos/min.....	61
Figura 11. Variación de pH durante la fermentación natural de frijol (<i>P. vulgaris</i>) var. pinto americano con agitación a 140 ciclos/min	61
Figura 12. Tinción de Gram de bacterias ácido lácticas (BAL) de procesos de fermentación natural de frijol (<i>P. vulgaris</i>) var. pinto americano	62
Figura 13. Prueba de O/F que indica un metabolismo fermentativo	63
Figura 14. Prueba de hemólisis	64
Figura 15. Efecto de tratamiento térmico (80 °C por 20 min) en niveles de microorganismos indicadores y de BAL	66
Figura 16. Niveles de microorganismos indicadores y de BAL tras sanitización con hipoclorito de sodio 1 % (v/v) y ácido láctico 10 % (v/v)	67

Figura 17. Proceso de fermentación inducida de frijol (<i>P. vulgaris</i>) var. pinto americano	68
Figura 18. Niveles de BAL durante fermentación inducida de frijol (<i>P. vulgaris</i>) var. pinto americano entero	69
Figura 19. Variación de pH durante la fermentación inducida de frijol (<i>P. vulgaris</i>) var. pinto americano entero	69
Figura 20. Proceso de fermentación inducida de frijol (<i>P. vulgaris</i>) var. pinto americano molido	70
Figura 21. Niveles de BAL durante fermentación inducida de frijol (<i>P. vulgaris</i>) var. pinto americano molido	71
Figura 22. Variación de pH durante la fermentación inducida de frijol (<i>P. vulgaris</i>) var. pinto americano molido	71
Figura 23. Microorganismos indicadores en frijol (<i>P. vulgaris</i>) var. pinto americano procesado por fermentación natural	76
Figura 24. Microorganismos indicadores en frijol (<i>P. vulgaris</i>) var. pinto americano procesado por fermentación inducida por BAL	76
Figura 25. Microorganismos indicadores en frijol (<i>P. vulgaris</i>) var. pinto americano molido y procesado por fermentación inducida por BAL ...	77

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
°C	Grados Celsius
\pm	Más, menos
>	Mayor que
<	Menor que
-	Negativo
/	Por
%	Por ciento, Porcentaje
+	Positivo
ACP	Agar Cuenta en Placa
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Coliformes Totales
DE	Desviación Estándar
DOF	Diario Oficial de la Federación
E	Enterococos Totales
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FDI	Fibra Dietética Insoluble
FDS	Fibra Dietética Soluble
FI	Fermentación Inducida
Fig.	Figura
FN	Fermentación Natural

g	Gramo(s)
h	Hora(s)
HCl	Ácido clorhídrico
ICC	Infusión Cerebro Corazón
L	Litro(s)
LAB	Lactic acid bacteria
log	Logaritmo
M	Concentración Molar
MA	Mesófilos Aerobios
MCG	Menor Concentración de Gelificación
mg	Miligramo(s)
min	Minuto(s)
mL	Mililitro(s)
m/m	Masa/masa
MRS	Agar DeMan Rogosa-Sharpe
m/v	Masa/volumen
N	Concentración Normal
NaClO	Hipoclorito de sodio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
NOM	Norma Oficial Mexicana
O ₂	Oxígeno
O/F, OF	Oxidación/Fermentación
PDA	Agar Papa Dextrosa
pH	Potencial de Hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
RVBA	Agar Bilis Rojo Violeta
s	Segundo(s)
sf	Sin fecha
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
t	Tiempo

TCA	Ácido Tricloro Acético
TTC	Cloruro de Trifenil Tetrazoilo
UFC	Unidad(es) Formadora(s) de Colonias
var.	Variedad
v/v	Volumen/volumen
x g	Gravedad(es)

RESUMEN

Phaseolus vulgaris, llamado comúnmente frijol, es una leguminosa que representa una importante fuente de carbohidratos complejos y de proteína en la dieta de los latinoamericanos. Al igual que todas las leguminosas, el frijol debe ser procesado previo a su consumo, lo cual altera su composición química. Considerando lo anterior y la importancia de este alimento en la dieta de la población latinoamericana, el objetivo de este proyecto fue desarrollar un proceso fermentativo para producir un ingrediente tecnofuncional de buen valor nutricional y sanitario a partir de frijol (*P. vulgaris*). Los análisis se realizaron en frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano y harinas de frijol producidas por fermentación natural (FN) y por fermentación inducida (FI) o controlada (ácido láctico). La fermentación natural se llevó a cabo a 42 °C por 48 h, con y sin agitación. Los microorganismos indicadores en FN sin agitación: mesófilos aerobios (1.38×10^8 - 3.40×10^8 UFC/g), coliformes totales (1.27×10^8 - 9.57×10^7 UFC/g) y enterococos totales (1.91×10^1 - 1.72×10^9 UFC/g); el pH inicial fue 5.64 y final 4.51. La FN con agitación no arrojó resultados favorables. La bacteria ácido láctica (BAL) implicada en el proceso de FN fue *Enterococcus faecium*. Las condiciones óptimas para el proceso de fermentación controlada desarrollado fueron 42 °C y pH inicial 5. Además, se probaron dos métodos de sanitización de frijol previo a la inoculación con la BAL: tratamiento térmico a 80 °C por 20 min y tratamiento químico de lavado con NaClO 1 % (v/v) y ácido láctico 10 % (v/v); resultando más adecuado el tratamiento químico. El proceso de fermentación controlada por la BAL se llevó a cabo a 42 °C por 48 h, sin agitación, en frijol entero y en frijol molido. Los niveles de BAL (5.67×10^5 - 9.14×10^4 UFC/g en frijol entero; 2.05×10^6 - 2.03×10^7 UFC/g en frijol molido) y pH (4.20 final en frijol entero; 4.52 final en frijol molido) fueron monitoreados cada 24 h. Ocurrió un aumento significativo ($p < 0.05$) en la proteína (18.90 a 20.89 %) al procesar el frijol por fermentación natural, pero no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) al procesarlo por fermentación inducida con BAL. El fermentado natural aumentó en 36.12 % la digestibilidad *in vitro* de la proteína y en 50.68 % la proteína digerible del frijol var. pinto americano; mientras que el fermentado producido por BAL aumentó estos valores en 84.90 % (digestibilidad) y en 89.54 % (proteína digerible); y la molienda del frijol previo a ser fermentado por BAL permitió un aumento de digestibilidad de 128.74 % y de la proteína digerible un aumento de 129.54 %. La fermentación de frijol, natural e inducida por BAL, mejoró las propiedades funcionales de absorción de agua y capacidad emulsificante, pero disminuyó la capacidad espumante del mismo. Las modificaciones en estas propiedades funcionales permitiría aplicar las harinas fermentadas en el desarrollo de nuevos productos de panificación o sopas para mejorar su contenido proteico. Finalmente, se determinó la calidad sanitaria de las harinas fermentadas de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano como adecuada, según las normas oficiales mexicanas, haciéndolas adecuadas para su adición a productos alimenticios.

ABSTRACT

Phaseolus vulgaris, known as the common bean, is a legume that represents an important source of complex carbohydrates and protein in the Latin American diet. As any other legume, bean must be processed prior to be consumed, which changes its chemical composition. Considering the previous, and the value of this food in the diet of the Latin American population, the objective of this study was the development of a fermentative process to obtain a good-nutritional value and innocuous functional food ingredient, from the bean (*P. vulgaris*). The analysis were carried out with bean (*P. vulgaris*) var. american pinto and with bean flour obtained from natural fermentation (FN) and induced (FI) or controlled (lactic acid) fermentation. Natural fermentation was performed at 42 °C for 48 h, with and without stirring. Indicator microorganisms in FN without stirring: aerobic mesophiles (1.38×10^8 - 3.40×10^8 UFC/g), total coliforms (1.27×10^8 - 9.57×10^7 UFC/g), and total enterococcus (1.91×10^1 - 1.72×10^9 UFC/g); initial and final pH was 5.64 and 4.51, respectively. FN with stirring did not result favorable. The lactic acid bacteria (LAB) involved in FN process was *Enterococcus faecium*. Optimal conditions for controlled fermentation process were 42 °C and 5 value as initial pH. Besides, two sanitation methods were tested for the bean prior to be inoculated with LAB: thermal treatment at 80 °C for 20 min and chemical treatment washing with NaClO 1 % (v/v) and with lactic acid 10 % (v/v); the chemical treatment resulted more suitable. Controlled fermentation by LAB process was performed at 42 °C for 48 h, without stirring, in whole and ground bean. LAB levels (5.67×10^5 - 9.14×10^4 UFC/g in whole bean; 2.05×10^6 - 2.03×10^7 UFC/g in ground bean) and pH (4.20 at the end, in whole bean; 4.52 at the end, in ground bean) were monitored every 24 h. A significant increase ($p < 0.05$) in the protein content (18.90 a 20.89 %) occurred by natural fermentation of bean, but there was not a significant difference ($p > 0.05$) in protein content by induced fermentation with the LAB. Natural fermentation increased *in vitro* digestibility of the protein by 36.12 % and by 50.68 % the digestible protein of var. american pinto bean; while these values were increased by 84.90 % (*in vitro* digestibility) and by 89.54 % (digestible protein) in the LAB fermentation; the grounding of the bean before fermentation with LAB enabled the *in vitro* digestibility to be raised by 128.74 % and the digestible protein by 129.54 %. The fermentation of the bean, natural and induced by LAB, improved the water absorption capacity and emulsifying functional properties, but it decreased the foaming properties of the product. These functional properties alterations would allow the fermented flours to be used in new products formulations in baking industry or in soup doughs to improve their protein content. At last, the sanitary quality of the fermented bean (*P. vulgaris* var. american pinto) flours was determined as acceptable, in accordance with the official Mexican regulations, making these bean flours suitable to be added in food products.

INTRODUCCIÓN

Phaseolus vulgaris, también conocido como frijol, caraotas, judías, alubias, entre otros nombres, es una leguminosa que representa una importante fuente de carbohidratos complejos y de proteína en la dieta de los latinoamericanos, cuya calidad, si se combina con la proteína de los cereales es equivalente a la de la carne, aunque con menor digestibilidad que ésta. Actualmente, esta leguminosa se enfrenta a modificaciones importantes ante una sociedad cambiante, incluidos los hábitos alimenticios, a consecuencia del urbanismo, la migración y el empleo; así como el paso de una economía cerrada a una economía global, todo lo cual está ejerciendo presiones en diversas etapas de la cadena de producción, comercialización, transformación y consumo (SAGARPA).

Nutricionalmente es importante conservar la ingesta de frijol, ya que adicional a la proteína, aporta compuestos bioactivos como la fibra dietética (insoluble y soluble) y el almidón resistente, que juntos previenen la incidencia de enfermedades relacionadas con el inadecuado tránsito intestinal y tienen efecto hipocolesterolémico; además, esta leguminosa contiene polifenoles y taninos, los cuales poseen capacidad antioxidante.

Sin embargo, esta leguminosa presenta una serie de factores que limitan su consumo: presencia de compuestos antinutricionales, requiere largos periodos de cocción, sobre todo si no es bien almacenado o no es de cosecha reciente, y contiene compuestos productores de flatulencia, como los α -galactósidos, los cuales al ser fermentados por las bacterias colónicas producen una serie de síntomas intestinales molestos.

P. vulgaris al igual que todas las leguminosas debe ser procesada previo a su consumo, lo cual altera su composición química. El proceso tradicional es la cocción, que inactiva los inhibidores de proteasas, no así, los factores causantes de flatulencia.

Bioprocesos como la fermentación natural y la posterior cocción, disminuyen significativamente los factores antinutricionales y los compuestos productores de flatulencia, mejorando además la calidad nutritiva sin detrimento de su aceptabilidad sensorial.

Adicionalmente, se ha explorado de manera incipiente y mencionado que la fermentación natural puede incrementar el potencial de *P. vulgaris* como ingrediente funcional, susceptible de ser utilizado en el desarrollo de productos extendidos con leguminosas o de nuevos productos a base de leguminosas (Granito *et al.*, 2009).

Por lo que en este trabajo se desarrolló un proceso fermentativo para producir un ingrediente tecnofuncional de buen valor nutricio y sanitario a partir de frijol (*P. vulgaris*).

ANTECEDENTES

2.1 FRIJOL

Las leguminosas tienen importancia desde el punto de vista agrícola por la superficie mundial que se dedica a su cultivo y por su capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico debido a la simbiosis con la bacteria *Rhizobium* del suelo, lo que permite elevar la fertilidad total del terreno, reemplazando parcialmente el uso de fertilizantes nitrogenados caros (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

Se producen en múltiples sistemas de producción y ambientes en regiones tan diversas como África, Europa, América Latina, Cercano Oriente, y en países como Estados Unidos, Canadá y China. Son muchas las variedades de plantas herbáceas de ciclo anual que crecen como matorrales o vitáceas y que producen una gran variedad de tipos de frijoles, alubias y habichuelas (FAO, 2014).

El frijol común, cuyo nombre científico es *Phaseolus vulgaris* L., es la leguminosa más importante para consumo directo en el mundo y constituye una fuente importante de proteína en la dieta de muchos países en desarrollo (FAO, 2014). Es una planta originaria de Mesoamérica, que se viene cultivando desde hace alrededor de 8 mil años, desarrollándose durante ese tiempo una diversidad de tipos y calidades de frijoles. Se considera que en total existen alrededor de 150 especies, aunque en México éstas ascienden a 50, destacando las cuatro especies que el hombre ha domesticado, como son el *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común), *Phaseolus coccineus* L. (frijol ayocote), *Phaseolus lunatus* L. (frijol comba) y *Phaseolus acutifolius* Gray (frijol tepari). Las especies más importantes en cuanto a superficie sembrada y producción en México son las dos primeras (Anónimo, 2013; SAGARPA). Es un producto de considerable valor

socioeconómico tanto por superficie de siembra como por consumo per cápita (Syngenta, 2013).

Por su gran importancia económica y social, el frijol es un producto estratégico dentro del desarrollo rural de México, ya que ocupa el segundo lugar en cuanto a superficie sembrada nacional y representa además la segunda actividad agrícola más importante en el país por el número de productores dedicados al cultivo. Es así, que como generador de empleo es relevante dentro de la economía del sector rural. En conjunto con el maíz, el frijol constituye una parte esencial en la dieta básica de la población en México (Muñoz Saldaña, 2010; Syngenta, 2013), sobre todo para las clases más desprotegidas del país, ya que constituye la fuente principal de proteínas para dicho sector, siendo un alimento que no puede sustituirse con el consumo de algún otro. Adicionalmente, la importancia ancestral de su cultivo en el campo mexicano radica también en que forma parte de la cultura gastronómica de México, de ahí la amplia aceptación del producto en la cocina mexicana, por lo que posee una gran demanda a nivel nacional (SAGARPA).

Actualmente esta leguminosa se enfrenta a modificaciones importantes ante una sociedad cambiante, incluidos los hábitos alimenticios, a consecuencia del urbanismo, la migración y el empleo; así como el paso de una economía cerrada a una economía global, todo lo cual está ejerciendo presiones en diversas etapas de la cadena de producción, comercialización, transformación y consumo (SAGARPA).

Las leguminosas son fuente de macronutrientes, micronutrientes y compuestos antioxidantes, con gran potencial en nutrición humana y animal; de este grupo de alimentos, el frijol es el más común de consumo humano (Porres *et al.*, 2003). Junto con los cereales, las leguminosas han sido utilizadas por el hombre desde la más remota antigüedad y son esenciales para su alimentación, siendo habitual su consumo diario en la mayor parte del mundo (Aguilera-Gutiérrez, 2009). *Phaseolus* spp. es la variedad de frijol más ampliamente consumida en los países de América Central y Sudamérica y en países de África Central y del Este (Granito y Álvarez, 2006).

Las leguminosas combinadas con cereales presentan beneficios significativos para la nutrición humana y para la salud cuando se consumen con regularidad en dietas bien equilibradas, provocando una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes, entre otras (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

Además de su importante contenido de carbohidratos y minerales, el frijol se considera como la principal fuente de proteínas vegetales en la dieta. Su papel es aún más significativo para las clases de menores recursos que, al no tener acceso a proteínas de origen animal, hallan en el frijol esos nutrimentos esenciales (Tabla 1) (Muñoz Saldaña, 2010).

Tabla 1. Información nutricional de frijol (Muñoz Saldaña, 2010).

Información nutricional de frijol	
(por 100 g)	
Calorías	322 Kcal
Proteínas	21.8 g
Grasas	2.5 g
Carbohidratos	55.4 g
Tiamina	0.63 mg
Riboflavina	0.17 mg
Niacina	1.8 mg
Calcio	183 mg
Hierro	4.7 mg

Como se observa en la Tabla 1, el frijol es un alimento común bajo en grasa y rico en proteínas, carbohidratos complejos, vitaminas y minerales. Los frijoles son buena fuente de compuestos bioactivos como la fibra dietética (insoluble y soluble) (Martín-Cabrejas *et al.*, 2004; Granito *et al.*, 2009; Doria *et al.*, 2012). Esto los hace beneficiosos para la salud, con bajo índice glicémico y potencial de disminuir las concentraciones séricas de colesterol (Martín-Cabrejas *et al.*, 2004; Alanís-Guzmán *et al.*, 2006). Otros beneficios atribuidos al consumo de frijol son: reduce las posibilidades de desarrollar cánceres de mama y de próstata, pues contiene fitoestrógenos; previene problemas cardíacos y

ayudan a la digestión por su contenido de fibra; ayuda a combatir la anemia por ser fuente primordial de hierro y zinc (Muñoz Saldaña, 2010; Idaho, 2014).

Por mucho tiempo, los frijoles han sido una de las fuentes principales de proteína en poblaciones rurales, satisfaciendo una proporción considerable de los requerimientos de proteína de las personas (Granito *et al.*, 2002). A pesar de ello, su consumo se ha visto limitado por la presencia de factores antinutricionales en las semillas, los cuales pueden tener efectos adversos en la nutrición humana y animal, además de afectar la digestibilidad y biodisponibilidad de los nutrientes (Granito *et al.*, 2002; Martín-Cabrejas *et al.*, 2004; Doria *et al.*, 2012). Algunos de estos compuestos son inhibidores enzimáticos, lectinas, compuestos fenólicos, flavonoides, fitatos y cianoglicósidos (Martín-Cabrejas *et al.*, 2004) que están naturalmente presentes y son capaces de disminuir la biodisponibilidad y limitar la digestibilidad de los nutrientes (Granito y Álvarez, 2006).

Otros factores por los cuales en ocasiones se ve limitado el consumo de frijol son los largos períodos de cocción y la flatulencia que se produce tras su ingesta. La flatulencia se produce como resultado de la fermentación colónica de los α -galactósidos (rafinosa, estaquiosa, verbascosa) y de la fibra soluble, que disminuyen mediante la fermentación natural del grano, obteniéndose un alimento nutritivo, sensorialmente aceptable que no produce flatulencia (Granito y Álvarez, 2006; Granito *et al.*, 2009).

Granito *et al.* (2004) consideran que debido al alto potencial nutricional del frijol venezolano (*Vigna sinensis*) es importante incrementar su consumo y diversificar su uso como ingrediente en el desarrollo de productos alimenticios, lo cual también es importante para otras leguminosas como *P. vulgaris*. Dado el alto potencial nutricional de las leguminosas, es importante incrementar su consumo, diversificando su uso como ingrediente en el desarrollo de productos alimenticios. Consecuentemente, es deseable desarrollar procesos de transformación que pudieran mejorar la calidad nutricional de las leguminosas y también proporcionar nuevos productos derivados para los consumidores (Martín-Cabrejas *et al.*, 2004). Sin embargo, para lograr una utilización

óptima de frijol como ingrediente, se deben conocer algunas de sus propiedades funcionales, tanto en la materia prima cruda, como en la procesada.

2.2 COMPONENTES DE INTERÉS NUTRICIONAL EN LEGUMINOSAS

El valor nutritivo de las leguminosas se debe esencialmente a su contenido proteico, a la vez que son fuente importante de carbohidratos complejos, algunos de absorción lenta como el almidón y otros no digeribles como los componentes de la fibra alimentaria. Pero a pesar de que contienen innumerables propiedades nutritivas muy positivas, presentan una serie de compuestos antinutritivos que influyen negativamente en la calidad nutricional (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

2.2.1 Proteína

El elevado contenido proteico en la mayoría de especies de leguminosas convierte a esta familia en la principal fuente de proteína vegetal para el hombre. El porcentaje medio de contenido en las legumbres se sitúa entre el 20-25% (Aguilera-Gutiérrez, 2009); en el caso del frijol, dependiendo de la variedad, el contenido fluctúa entre el 14 al 33 % (Ulloa *et al.*, 2011) y típicamente es de 15 a 25 % de proteína en peso seco (Sathe, 2002), encontrándose la mayor parte (80 %) en forma de proteínas de almacenamiento, principalmente globulinas (Rubio *et al.*, 2004).

El frijol es rico en aminoácidos como la lisina (6.4 a 7.6 g/100 g de proteína) y la fenilalanina más tirosina (5.3 a 8.2 g/100 g de proteína), pero con deficiencias en los aminoácidos azufrados de metionina y cisteína. Sin embargo, de acuerdo a evaluaciones de tipo biológico, la calidad de la proteína del frijol cocido puede llegar a ser de hasta el 70% comparada con una proteína testigo de origen animal a la que se le asigna el 100% (Ulloa *et al.*, 2011).

Recientemente, se ha sugerido que desarrollar frijoles con más concentración proteínica sería posible al establecer variedades que tengan mayor cantidad de faseolina, una proteína que representa alrededor del 50% (Anónimo, 2013).

La digestibilidad y el valor biológico de las proteínas de leguminosas, si se compara con las de origen animal, son algo inferiores debido a su baja digestibilidad, a su deficiencia en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y a la presencia de factores antinutritivos (Bressani y Elías, 1984; Belitz *et al.*, 1997). Sin embargo, las proteínas pueden ser fácilmente desnaturalizadas e inactivadas durante un tratamiento térmico (Sathe, 2002).

El frijol (*P. vulgaris*) blanco presenta mayor digestibilidad que el frijol negro, rojo y café. Esta mayor digestibilidad del frijol blanco se debe a que la proteína que da una mayor digestibilidad en los frijoles blancos es bastante deficiente en aminoácidos azufrados (Bressani y Elías, 1984).

Una posible explicación de la digestibilidad disminuida del frijol (*P. vulgaris*) es el alto consumo de fibra dietética de las dietas a base de leguminosas, esto ocasionaría una disminución significativa de la absorción de nutrientes en general (Cárdenas-Quintana *et al.*, 2000).

Se evaluó la calidad proteica de cuatro variedades mejoradas de frijol y una variedad comercial en ratas por Cárdenas-Quintana *et al.* (2000), encontrando que los valores promedio de digestibilidad fueron entre 63.9 y 68.7 % y el valor biológico fue de 55 %, lo que demuestra que las variedades de frijoles mejoradas presentan ligeras modificaciones en su calidad proteica, así como en sus efectos antinutricionales.

La clasificación de las proteínas vegetales se basa en sus propiedades de solubilidad: las albúminas se caracterizan por ser solubles en agua, las globulinas son solubles preferentemente en soluciones acuosas con sales, las prolaminas son solubles en

soluciones de etanol/agua y las glutelinas solubles a pHs extremos ácidos o básicos (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

La mayoría de las proteínas de legumbres se caracterizan por tener puntos isoelectrónicos ácidos, debido al alto contenido de residuos de ácidos glutámico y aspártico, lo que las hará más solubles en medios acuosos básicos (pH 8.5-10). Sin embargo, la carga de los aminoácidos que estructuran las proteínas se verá alterada con el procesado de las leguminosas, pudiendo variar el contenido de aminoácidos ácidos, básicos, hidrofóbicos o sin carga una vez que se produce la solubilización de los mismos tras un tratamiento térmico (Carbonaro *et al.*, 1997). Por lo tanto, la solubilidad proteica se verá influenciada en gran medida por los procesados térmicos debido principalmente a la desnaturalización que sufre la proteína, jugando un papel importante en la determinación de la digestibilidad proteica en las leguminosas.

Es, por todo esto, que el estudio de la fracción proteica tiene un gran interés, así como su distribución en función de sus características de solubilidad.

En los últimos años, la aplicación de distintas tecnologías ha permitido la obtención de productos con una elevada cantidad de proteína. Los concentrados proteicos, como los de soya entre otros, son empleados por la industria alimentaria ya que ofrecen ventajas económicas, nutricionales y funcionales, manteniendo las cualidades sensoriales deseables necesarias para la aceptación por el consumidor (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

Investigaciones recientes atribuyen a las proteínas de leguminosas propiedades nutraceuticas, por sus efectos beneficiosos en la salud, principalmente su papel protector frente a determinadas enfermedades (Duranti, 2006). Además, las proteínas de leguminosas se han visto asociadas a la reducción del riesgo cardiovascular, a un efecto anticarcinogénico como consecuencia de la presencia de lectinas e inhibidores de proteasa en distintas legumbres, a la prevención de obesidad y diabetes debido a la

acción del inhibidor de α -amilasa y a una capacidad de transporte de minerales que mejoran su absorción (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

Por lo tanto, las proteínas de las leguminosas pueden tener un papel muy destacado en la industria alimentaria tanto en alimentos procesados como en la elaboración de nuevos productos texturizados destinados al consumo humano (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

2.2.2 Carbohidratos

El valor nutritivo de las leguminosas se debe especialmente a su aporte de carbohidratos (24-68 %), siendo el almidón el polisacárido mayoritario. Además, es importante destacar el papel de la fibra dietética por los efectos beneficiosos que produce en el organismo humano (Granito *et al.*, 2002; Martín-Cabrejas *et al.*, 2004; Alanís-Guzmán *et al.*, 2006; Aguilera-Gutiérrez, 2009; Idaho, 2014).

En relación al frijol, el aporte de carbohidratos es de 52 a 76 g por cada 100 g de frijol crudo, dependiendo de la variedad de la que se trate, siendo el principal componente el almidón (Ulloa *et al.*, 2011).

2.2.2.1 Almidón.

El almidón es el principal constituyente de las leguminosas. Constituye la mayor reserva de polisacáridos de las plantas superiores y representa el 51-67 % en frijol (Aguilera-Gutiérrez, 2009). El almidón representa el principal compuesto que aporta energía, a pesar de que durante la cocción una parte del mismo no está disponible ya que se transforma en el denominado almidón resistente a la digestión (Ulloa *et al.*, 2011).

El almidón está constituido por dos grandes polímeros: la amilosa, polisacárido no ramificado que presenta configuración helicoidal una vez hidratado y la amilopectina, que es un polímero muy ramificado y con un mayor peso molecular. Sus propiedades funcionales vienen determinadas por la organización de estas macromoléculas en la

estructura granular y por la relación amilosa/amilopectina que se establece en el gránulo de almidón (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

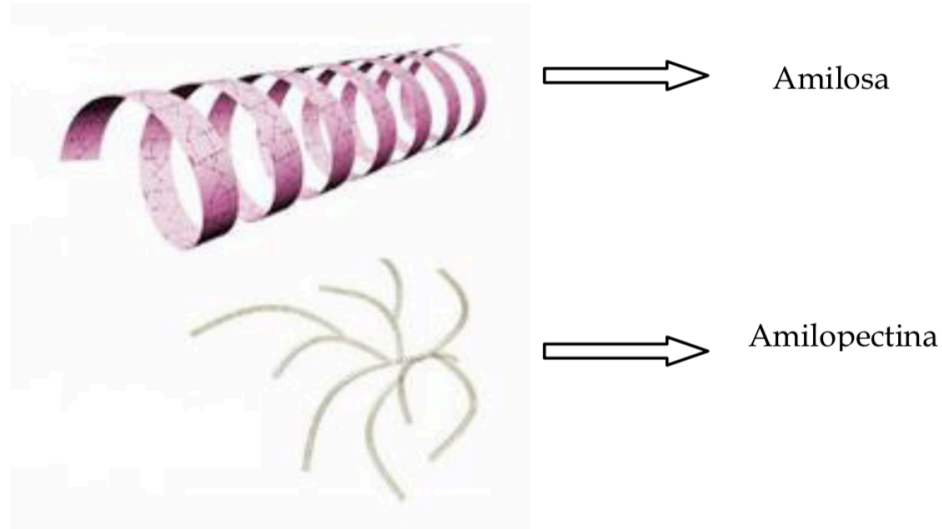


Figura 1. Estructura de los principales componentes del almidón (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

El procesamiento de los alimentos afecta a la estructura del almidón provocando en ocasiones la gelatinización parcial o total, así como una parcial retrogradación. El almidón gelatinizado no es estable. La aplicación de calor en presencia de agua produce la gelatinización del almidón, lo que conlleva una pérdida irreversible de la estructura cristalina de los gránulos, un incremento en el tamaño de los gránulos (probablemente no uniforme), un aumento de la viscosidad, entre otros cambios.

2.2.2.1.1 Almidón resistente. El almidón resistente se define como: almidón y productos de la degradación del almidón que no se absorben en el intestino delgado de los seres humanos sanos. Mientras que el almidón fácilmente digerible es disociado por las amilasas del páncreas en 20 minutos, aproximadamente (el tiempo de degradación puede durar más de dos horas en el caso del almidón resistente). En el intestino grueso es donde se produce su fermentación de forma más o menos completa por la microbiota; durante este proceso, además de metano, hidrógeno y dióxido de carbono, se forman ácidos grasos de cadena corta (ácidos acético, propiónico y butírico), con lo que no sólo se reduce el pH en el intestino grueso, sino que, como consecuencia de ello, también aumenta la cantidad de agua en las heces (Cummings y Macfarlane, 1991).

Respecto a la formación del almidón resistente, se requiere una longitud de cadena mínima de 30-40 unidades de glucosa. Mientras que la longitud de las cadenas de amilosa promueve la formación de almidón resistente, la presencia de lípidos impide su producción, debido a la creación del complejo almidón-lípido (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

El porcentaje de amilosa está directamente correlacionado con el almidón resistente, cuanto mayor es el contenido de amilosa, mayor contenido de almidón resistente. Las características de no digestibilidad que se le atribuyen, se deben en parte a las fuertes interacciones macromoleculares que se establecen entre las largas cadenas de amilosa y las cadenas ramificadas de la amilopectina. La proporción en la que se encuentra el almidón resistente en los alimentos no sólo varía dependiendo del tipo de alimento, sino del tratamiento térmico al que se someta el mismo (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

Se han identificado cuatro tipos de almidón resistente: el que se encuentra inaccesible físicamente (AR1), gránulos de almidón nativos (AR2), almidón retrogradado (AR3) y almidón modificado químicamente (AR4).

Las legumbres son una de las principales fuentes de almidón resistente 1 (AR1), ya que la gruesa pared celular que tienen hace que el almidón sea inaccesible al ataque enzimático (Gray, 2003).

2.2.2.2 Fibra dietética.

Los cereales, las legumbres, hortalizas, frutas y otras semillas son la mayor fuente alimentaria de fibra y de carbohidratos no digeribles. La fibra alimentaria o dietética es una mezcla compleja de carbohidratos que están asociados a otros componentes no-carbohidratos. Consiste en el residuo vegetal no digerible, que incluye los polisacáridos no amiláceos y la lignina. La fibra dietética presenta una serie de propiedades fisicoquímicas que explican los efectos fisiológicos que se le atribuyen (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

El consumo de frijoles es una buena manera de aumentar la fibra en la dieta. La fibra que se encuentra en los frijoles ayuda a reducir los niveles de colesterol en la sangre y reduce el riesgo de enfermedades crónicas, tales como la diabetes, la obesidad y el cáncer. Media taza de frijoles contiene 7 gramos de fibra (Trinidad *et al.*, 2010; Idaho, 2014).

La fibra dietética se puede clasificar en fibra soluble e insoluble, según sus diferentes propiedades fisiológicas. Tradicionalmente se emplea el término fibras solubles porque muchas de ellas forman geles viscosos en el intestino delgado (pectinas y β -glucanos) y afectan principalmente a la absorción de glucosa y grasa; su alta viscosidad puede influir en la absorción, retrasando el vaciado gástrico. Por otro lado, las fibras con una gran influencia en el funcionamiento del intestino grueso, son las fibras insolubles (celulosa, parte de las hemicelulosas y lignina). La fibra insoluble incrementa el volumen fecal y disminuye el tiempo de tránsito intestinal, además de ser un sustrato fermentativo de la microbiota digestiva (Muñoz Saldaña, 2010).

A la fibra soluble se le atribuye el papel protector contra el cáncer de colon, debido a la fermentación que realiza la microbiota en el intestino grueso. También se ha estudiado cierta implicación en la disminución de los niveles de colesterol total y LDL en la sangre (Martín-Cabrejas *et al.*, 2004; Alanís-Guzmán *et al.*, 2006).

Las legumbres junto con las frutas y hortalizas constituyen la principal fuente de polisacáridos pécticos de la fibra dietética en la dieta. Estos compuestos se degradan durante el cocinado y procesamiento, particularmente los situados en el cotiledón de las semillas de leguminosas (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

2.2.3 Lípidos

Dentro de los macronutrientes del frijol, la fracción correspondiente a los lípidos es la más pequeña (1.5 a 6.2 g/100 g), constituida por una mezcla de acilglicéridos cuyos ácidos grasos predominantes son los mono y poliinsaturados (Ulloa *et al.*, 2011).

2.2.4 Fitoquímicos

A los componentes o ingredientes fisiológicos activos de ciertos alimentos, denominados nutracéuticos o funcionales, se les conoce con el término fitoquímico. A su vez, un alimento nutracéutico o funcional es aquel que por sus componentes fisiológicos activos, proporciona beneficios más allá de la nutrición básica y puede prevenir enfermedades o promover la salud. Algunos de los fitoquímicos actualmente reconocidos en el frijol son: fibra, polifenoles, ácido fítico, taninos, inhibidores de tripsina y lectinas (Ulloa *et al.*, 2011).

El papel que juega la fibra del frijol como fitoquímico es por su efecto hipocolesterolémico, es decir, disminuye el colesterol en la sangre hasta un 10%. El almidón resistente del frijol también puede ejercer el mismo efecto que la fibra. Por otra parte, la fermentación en el colon de la fibra soluble y el almidón resistente que generan ácidos grasos de cadena corta, provoca la disminución de la síntesis hepática del colesterol.

Los inhibidores de tripsina confieren protección contra rotavirus, inhiben las carcinogénesis y pueden ser utilizados como agentes quimiprotectores, es decir, para proteger al organismo contra efectos secundarios de tratamientos de ciertas enfermedades.

Las lectinas del frijol disminuyen el crecimiento de linfomas no-Hodgking (cáncer del tejido linfoide, que abarca los ganglios linfáticos, el bazo y otros órganos del sistema inmunitario) y pueden utilizarse como marcadores de tumores al identificar células que

se encuentran en las primeras etapas de diferenciación a células cancerosas. El descubrimiento acerca de que las lectinas de plantas presentan actividad biológica sobre células transformadas, especialmente en relación con un efecto antitumoral, ha aumentado el interés en este campo, en búsqueda de extractos naturales de plantas con actividad antitumoral y anticancerígenas, así como también en compuestos naturales presentes en productos alimenticios (Abdullaev y González de Mejía, 1997).

Respecto al ácido fítico, fue en principio estudiado por su capacidad para atrapar iones y bajar la biodisponibilidad de minerales como Zn, Ca, Fe, actualmente se ha demostrado que reduce el riesgo de cáncer, principalmente de colon y de mama, probablemente por su poder antioxidante (Belitz *et al.*, 1997; Ulloa *et al.*, 2011). Por su parte los taninos, sustancias muy astringentes y de sabor amargo, pertenecientes a la familia de los polifenoles, funcionan como antioxidantes, anticancerígenos y antimutágenos efectivos (Ulloa *et al.*, 2011).

Los polifenoles hasta hace unos pocos años eran considerados antinutrientes debido a su facilidad para combinarse con proteínas, produciendo un aprovechamiento deficiente de dichos nutrientes. Sin embargo, estudios recientes asignan determinadas propiedades fisiológicas beneficiosas a los compuestos fenólicos, los cuales incluyen un gran número de sustancias sumamente heterogéneas, que se caracterizan por poseer un anillo aromático con al menos una sustitución hidroxilo y una cadena lateral funcional (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

Casi todos los tejidos de las plantas contienen mezclas complejas de polifenoles, que se pueden encontrar libres o unidos a hidroxiacidos y azúcares. Los compuestos fenólicos contribuyen a las cualidades sensoriales de los alimentos, a sus propiedades farmacológicas y a su valor nutricional (Dueñas *et al.*, 2002). Todo ello justifica el gran interés del estudio de estos compuestos en los alimentos en los últimos años.

Actualmente, los compuestos fenólicos tienen importancia como bioactivos, por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimutagénicas, anticancerígenas,

antibacterianas, entre otras, y por su capacidad para modificar las funciones de algunas enzimas celulares clave (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

2.3 FACTORES ANTINUTRICIONALES EN LEGUMINOSAS

Las leguminosas, además de poseer numerosas características nutritivas, presentan una serie de compuestos que influyen negativamente en su valor nutritivo, y que se conocen como factores antinutritivos o antinutricionales.

2.3.1 α -Galactósidos

Los α -galactósidos son carbohidratos solubles derivados de la sacarosa que contienen de 1 a 4 unidades de galactosa unidas por enlaces 1,6. Son muy solubles en agua y fermentados rápidamente por la microflora colónica (Granito y Álvarez, 2006; Mussatto y Mancilha, 2007; Granito *et al.*, 2009). El α -galactósido más pequeño es la rafinosa, formada por una molécula de galactosa unida a la sacarosa.

Tabla 2. Los principales α -galactósidos.

Los principales α-galactósidos	
Rafinosa	α -D-Gal(1-6)- α -D-Glu(1-2)- β -D-Fru
Estaquiosa	α -D-Gal(1-6)- α -D-Gal(1-6)- α -D-Glu(1-2)- β -D-Fru
Verbascosa	α -D-Gal(1-6)- α -D-Gal(1-6)- α -D-Gal(1-6)- α -D-Glu(1-2)- β -D-Fru
Gal = galactosa; Glu = glucosa; Fru = fructosa	

Los α -galactósidos, también son conocidos como los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (rafinosa, estaquiosa y verbascosa), y han sido identificados como factores causantes de flatulencia. A pesar de que estos compuestos son removidos fácilmente mediante procesos tradicionales como remojo y cocción, la fibra dietética soluble (también causante de flatulencia) no parece verse afectada por estos procesos (Granito *et al.*, 2002).

Los α -galactósidos son considerados factores antinutricionales porque las especies monogástricas como el hombre no poseen la enzima α -1,6-galactosidasa, responsable de hidrolizar los enlaces α -1,6, que se requiere para la correcta digestión de estos oligosacáridos. Estos compuestos pasan por el intestino delgado intactos y sufren una fermentación anaerobia en el colon, lo que provoca la aparición de gases (H_2 , CO_2 y CH_4) responsables de la flatulencia y en ocasiones de dolores abdominales y diarreas osmóticas. Así, los galactósidos son considerados como los factores antinutricionales más importantes en la generación de la flatulencia, aunque otros compuestos pueden contribuir también a la producción de gas (Aguilera-Gutiérrez, 2009), como la fibra soluble (Granito y Álvarez, 2006).

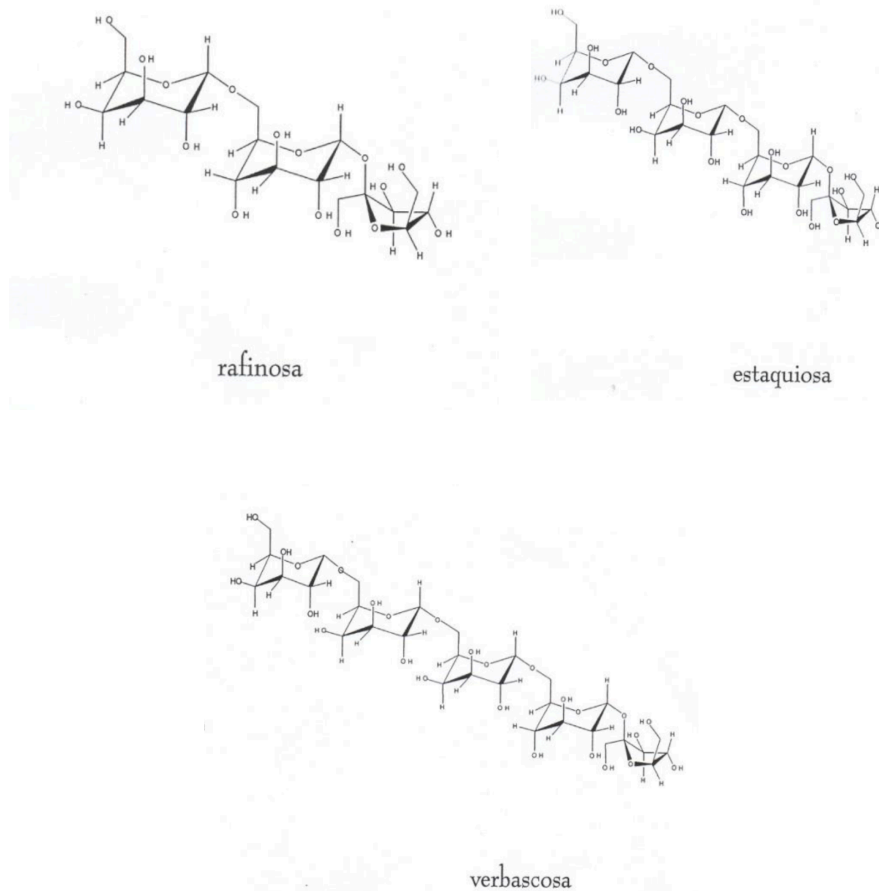


Figura 2. Estructura de los principales α -galactósidos.

2.3.2 Ácido fítico

El ácido fítico (IP₆) es el éster hexafosfato de mioinositol (también conocido como inositol hexafosfato) y representa la forma principal de reserva de fósforo utilizado durante la germinación. Se encuentra presente en muchos alimentos de origen vegetal, principalmente cereales y legumbres (0.4-3 %), en forma de sales de cationes mono y divalentes (K⁺, Ca⁺², Mg⁺²), siendo al mismo tiempo una importante reserva de fósforo durante la germinación y el crecimiento de las plantas y una forma de almacén de cationes en muchas semillas (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

El ácido fítico es considerado como la causa principal del deterioro en la absorción de muchos minerales esenciales, convirtiéndolos a formas insolubles las cuales no están disponibles para el organismo, además, este compuesto está relacionado con la formación de complejos con enzimas proteolíticas y amilolíticas (Granito *et al.*, 2002).

Este compuesto tiene el siguiente mecanismo de acción: los seis grupos fosfato de la molécula de IP₆ lo hacen comportarse como un fuerte agente quelante reduciendo la biodisponibilidad, principalmente de cationes di y trivalentes, tales como Zn⁺², Cu⁺/Cu⁺², Fe⁺²/Fe⁺³, Mn⁺², Mg⁺², Ca⁺² (Belitz *et al.*, 1997; Ulloa *et al.*, 2011). Bajo las condiciones de pH del tracto gastrointestinal, se forman los complejos insolubles metal-ácido fítico, convirtiendo al metal en una forma no disponible para la absorción intestinal, reduciéndose su biodisponibilidad en animales y en humanos (Belitz *et al.*, 1997). Además, el ácido fítico disminuye la digestibilidad de las proteínas, almidón y lípidos.

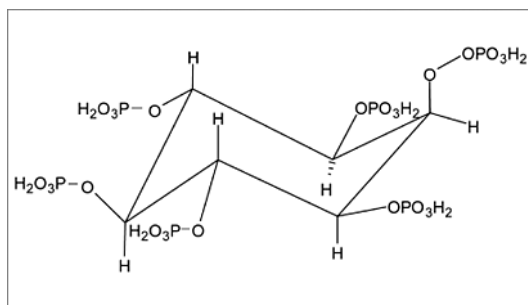


Figura 3. Estructura del ácido fítico (De Carli *et al.*, 2006).

2.3.3 Taninos

Los taninos se definen como compuestos fenólicos solubles en agua con pesos moleculares entre 500 y 20,000 Daltons (D), con gran complejidad en su estructura y que, junto con las propiedades generales de los compuestos fenólicos, presentan propiedades específicas como la facilidad de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

Debido a estas propiedades específicas, la presencia de taninos está asociada con un bajo valor nutritivo pues al formar complejos solubles e insolubles con proteínas, reducen su biodisponibilidad (Liener, 1994). Algunas enzimas digestivas como la tripsina, α -amilasa y lipasa son inhibidas por estos compuestos, lo que provoca una disminución de la digestibilidad de carbohidratos, proteínas y lípidos (Aguilera-Gutiérrez, 2009). Los taninos también limitan la biodisponibilidad de minerales como el hierro y el zinc (Ulloa *et al.*, 2011).

Además del efecto negativo, los taninos presentan un papel potencial como antioxidantes, asociado a las propiedades generales de los compuestos fenólicos como captadores de radicales libres. Esta actividad se produce también por la unión de los taninos a proteínas endógenas, por ejemplo a las del tracto gastrointestinal, ejerciendo un efecto beneficioso contra el daño oxidativo que pueden ocasionar los radicales libres que se generan durante la digestión (Carbonaro *et al.*, 1997).

2.3.4 Inhibidores enzimáticos

Los inhibidores enzimáticos son aquéllos que interfieren en la actividad de los sistemas enzimáticos del aparato digestivo inhibiendo específica o inespecíficamente enzimas necesarias para la asimilación de nutrientes.

Los inhibidores de proteasas representan el 0.2-2% en peso de las proteínas solubles de leguminosas. Los más conocidos son los inhibidores de tripsina y quimotripsina. Los inhibidores de amilasas encontrados en leguminosas, concretamente en frijol (*P. vulgaris*) se encuentran en un intervalo molecular entre 40 y 50 kD, son de carácter ácido con pH entre 4 y 5 y con un contenido en carbohidratos entre 7 y 14 % (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

Los inhibidores de tripsina pueden inhibir la actividad proteolítica de la enzima digestiva tripsina y llevar a una disponibilidad reducida de aminoácidos. Se ha reportado que los taninos se reticulan con proteínas y carbohidratos, disminuyendo así su efectividad biológica y formando complejos con enzimas como tripsina, lipasa, α -amilasa y polisacáridos. Los inhibidores de tripsina también pueden disminuir por remojo y cocción del frijol (Granito *et al.*, 2002).

Debido al carácter termolábil de estos inhibidores, el calentamiento de las harinas de leguminosas puede mejorar su valor nutritivo y producir un suplemento proteico de mayor calidad, aunque se ha encontrado actividad inhibitoria de tripsina en harinas después de haber sido calentadas a 100 °C durante una hora. La desnaturalización por el calor puede deberse a la ruptura de los puentes disulfuro existentes en los inhibidores de tripsina (Aguilera-Gutiérrez, 2009), los cuales pueden provocar retardo en el crecimiento e hipertrofia pancreática. En general el retardo de crecimiento por el consumo de leguminosas con inhibidores de tripsina ocurre porque diversos mecanismos biológicos que impiden la incorporación de yodo a la glándula tiroides, interfieren en la síntesis de la tirosina o bloquean la incorporación del yodo, estimulando la secreción de tirotrófina, y terminan en la hiperplasia o agrandamiento de la glándula tiroides. Esta hiperplasia glandular se debe a que al ser inhibida parte de la tripsina (elaborada por el páncreas e indispensable en la digestión de proteínas), el organismo exige a la glándula una mayor producción, con el consiguiente agrandamiento de la misma (Ulloa *et al.*, 2011).

2.3.5 Lectinas

Las lectinas son un grupo heterogéneo de proteínas vegetales capaces de unirse reversiblemente a restos de azúcares de glicoproteínas situados en la superficie celular, originando *in vitro* la aglutinación de los glóbulos rojos y una severa depresión del crecimiento, como consecuencia de su unión a receptores específicos de las células de la mucosa intestinal y, por lo tanto, reduciendo la capacidad de absorción de nutrientes en el intestino delgado. Aproximadamente unas 600 especies de leguminosas contienen lectinas, que representan del 2 al 10 % de la proteína total de la leguminosa seca (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

Las lectinas en el hombre se comportan de igual forma, como factor antinutritivo, alergénico, u otros factores subclínicos, principalmente cuando se consumen en grandes cantidades. Sin embargo, investigaciones recientes postulan cierta implicación de las lectinas en la limitación del crecimiento tumoral. Teniendo en cuenta el carácter termolábil de estos factores antinutricionales, temperaturas iguales o superiores a 70 °C podrían disminuir parcial o totalmente su acción.

2.4 FERMENTACIÓN EN LEGUMINOSAS

El incremento en la producción y comercialización mundial de alimentos nutracéuticos, ha motivado la generación de nuevos productos e ingredientes alimentarios con valor agregado. A través de procesos como la extrusión de cereales y la fermentación en las leguminosas, es posible generar harinas precocidas con propiedades funcionales aptas para su empleo como ingredientes para la elaboración de alimentos que, además de nutrir, proporcionen un beneficio extra a la salud (Delgado *et al.*, 2011).

La fermentación es uno de los métodos de producción y preservación de alimentos más antiguos y económicos que se conocen (Porres *et al.*, 2003). Es una técnica sencilla y económica de procesamiento que logra cambios deseables en la composición de la semilla y mejora la palatabilidad, es utilizada en todo el mundo, particularmente en

países en vías de desarrollo (Martín-Cabrejas *et al.*, 2004). La fermentación en leguminosas mejora sus características sensoriales, además de que aumenta su valor nutritivo al mejorar la densidad y disponibilidad de los nutrientes, lo cual puede lograrse por la degradación o reducción de factores antinutricionales (Porres *et al.*, 2003), como el ácido fítico, inhibidor de tripsina y oligosacáridos, además de ejercer efectos beneficiosos en la digestibilidad de la proteína y valor biológico de estos alimentos (Granito *et al.*, 2002; Martín-Cabrejas *et al.*, 2004).

Los cambios que ocurren durante los procesos de fermentación son debidos principalmente a enzimas endógenas de la semilla y a la actividad enzimática de la microbiota presente en la leguminosa. Las diferencias en el valor nutricional final del producto fermentado dependen de la utilización de semillas enteras o suspensiones de harina en diferentes proporciones (Kozłowska *et al.*, 1996; Granito *et al.*, 2002; Porres *et al.*, 2003).

Los microorganismos presentes en la fermentación natural son capaces de producir enzimas que degradan los oligosacáridos a una forma asimilable (Shimelis y Rakshit, 2008). Se ha reportado que la fermentación natural de lentejas elimina totalmente los α -galactósidos, compuestos que están relacionados con la producción de flatos (Vidal-Valverde *et al.*, 1993). Algunas bacterias ácido lácticas producen galactosidasa y pueden utilizar los oligosacáridos, por lo que la eliminación de estos compuestos puede deberse a la capacidad de algunos microorganismos ácido lácticos para utilizar la rafinosa y estaquiosa en su metabolismo (Duszkiewicz-Reinhard *et al.*, 1994; Shimelis y Rakshit, 2008). Por otra parte, la fitasa microbiana puede hidrolizar el fitato durante la fermentación de harina de frijol seco y es considerada en la reducción de contenido de ácido fítico en productos fermentados (Shimelis y Rakshit, 2008).

Se ha reportado que los taninos se reducen después del proceso de fermentación debido a su localización en las capas externas de las cubiertas de las semillas de los ingredientes crudos. Se ha reportado 100 % de pérdida de taninos en soya durante preparación de tempeh. En ocasiones, la cubierta de la semilla o testa es removida del

sustrato previo a la fermentación, por lo que el potencial antinutricional causado por la presencia de taninos es de poca importancia (Shimelis y Rakshit, 2008).

El mejoramiento en la digestibilidad de la proteína podría ser resultado de la desnaturalización de la proteína y la inactivación del inhibidor de tripsina (Shimelis y Rakshit, 2008).

La fermentación puede combinarse con otros tratamientos culinarios (remojo y cocción) y tecnológicos (germinación previo a fermentación), para fomentar el mejoramiento del valor nutricional del producto fermentado (Porres *et al.*, 2003).

El proceso fermentativo, puede ser iniciado espontáneamente con la microbiota naturalmente presente en la leguminosa (Porres *et al.*, 2003), es decir la flora endógena (Granito y Álvarez, 2006), o puede controlarse con el uso de cultivos específicos o iniciadores a partir de un lote de producto previamente fermentado (Porres *et al.*, 2003). Los frijoles contienen microorganismos aerobios del aire, agua, suelo, contenedores, etcétera en su superficie; las especies comúnmente identificadas como la microbiota dominante en los procesos de fermentación natural pertenecen a los géneros de *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Micrococcus* y *Bacillus* (Granito y Álvarez, 2006). El almidón puede ser utilizado por los microorganismos responsables de la fermentación como una fuente de energía (Granito *et al.*, 2002). Estos microorganismos participan en la fermentación natural y se caracterizan por producir una disminución de pH y tener actividad α -amilasa (Sotomayor *et al.*, 1999; Granito *et al.*, 2002). Además, pueden hidrolizar el almidón a maltosa y utilizarla como fuente de energía.

Con el incremento de la acidez titulable y la reducción del pH del alimento a valores menores de 4.5, la fermentación impide la proliferación de especies de bacterias y hongos contaminantes sensibles a la acidez (Porres *et al.*, 2003). La caída de pH en productos tradicionales obtenidos por fermentación resulta en una forma de protección de organismos patógenos (Shimelis y Rakshit, 2008). Los fracasos en la fermentación

pueden atribuirse a la preponderancia de organismos indeseables así como el retraso en el crecimiento de organismos deseables. Los microorganismos esenciales para una fermentación satisfactoria pueden introducirse a los alimentos y ganar dominancia en la fermentación (Granito y Álvarez, 2006). La fermentación ácido láctica es el método más utilizado en el procesamiento y preservación de vegetales, cereales y leguminosas, debido a su bajo costo, requerimientos energéticos reducidos y alto rendimiento con sabor aceptable para consumo humano (Martín-Cabrejas *et al.*, 2004).

La fermentación tradicional de vegetales, frutas y granos a menudo incluye una fermentación láctica que involucra muchas especies diferentes de bacterias ácido-lácticas, las cuales están activas en diferentes etapas del proceso de fermentación. Las bacterias ácido-lácticas producen compuestos antimicrobianos, incluyendo ácidos orgánicos (ácidos láctico, acético, fórmico, feniláctico y caproico), dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, diacetilo, etanol, bacteriocinas, reuterina y reutericiolina. Adicionalmente, estas bacterias mejoran la textura natural de productos alimenticios como el yogurt y el helado (Granito y Álvarez, 2006).

Los vegetales fermentados son microbiológicamente estables durante el almacenamiento, siempre y cuando todos los azúcares sean removidos al ser convertidos en ácidos, alcoholes y otros productos durante la fermentación primaria de las bacterias ácido lácticas o levaduras. La fermentación incompleta de los azúcares puede dar lugar a una fermentación secundaria efectuada por levaduras durante el almacenamiento (Fleming *et al.*, 1983; Granito *et al.*, 2009).

La fermentación natural de frijol es un proceso muy efectivo en el incremento de la funcionalidad de *P. vulgaris*. Asimismo, la fermentación del frijol entero es un bioproceso muy prometedor debido a su bajo costo (Granito *et al.*, 2002). Si se aplican procesos de fermentación natural y posterior cocción a granos de frijol se potencia y facilita la ingesta del producto al proveer al consumidor las siguientes ventajas: menor tiempo de cocción y disminución de los niveles de los factores antinutricionales y responsables de flatulencia (Granito *et al.*, 2009)

P. vulgaris al igual que todas las leguminosas puede ser procesada previo a su consumo, lo cual altera su composición química. La fermentación natural de *P. vulgaris* y su posterior cocción, disminuyen significativamente los factores antinutricionales y productores de flatulencia, mejorando además la calidad nutritiva de los granos, sin detrimento de su aceptabilidad sensorial. Adicionalmente, la fermentación natural incrementa el potencial de *P. vulgaris* como ingrediente funcional, susceptible de ser utilizado en el desarrollo de productos extendidos con leguminosas o de nuevos productos a base de leguminosas (Granito *et al.*, 2009).

2.5 EFECTO DE LA FERMENTACIÓN EN PROPIEDADES NUTRICIONALES DE LEGUMINOSAS

Granito *et al.* (2002) estudiaron el efecto de la fermentación natural de la harina y de granos enteros de frijol (*P. vulgaris*) en el contenido de nutrientes (proteína, lípidos, almidón, fibra dietética y vitaminas B1 y B2) y en los factores antinutricionales (α -galactósidos, inhibidor de la actividad de tripsina y fosfatos de inositol).

Se encontró que después de la fermentación a 42 °C durante 48 horas, el contenido de proteína total disminuyó (2-15 %) pero se incrementó la digestibilidad proteica *in vitro* (4-8 %); el contenido de grasa no cambió; los azúcares fructosa y sacarosa en harinas de frijol fermentadas disminuyeron (67-83 y 99-100 %, respectivamente) y el contenido de glucosa se incrementó (175-750 %); ninguno de estos azúcares solubles se detectó en la fermentación natural de frijol entero. Los contenidos de almidón total, almidón disponible y fibra insoluble disminuyeron tras la fermentación (5-13, 10-24 y 5-26 %, respectivamente) de harina, mientras que al utilizar frijoles enteros, la fibra insoluble no cambió significativamente. El hierro (Fe), fósforo (P), magnesio (Mg), calcio (Ca) y potasio (K) disminuyeron mientras que el contenido de zinc (Zn) no cambió tras la fermentación natural.

En cuanto al efecto de la fermentación natural en los factores antinutricionales de granos de frijol entero, Granito *et al.* (2012) encontraron que los niveles de los inhibidores de tripsina y el contenido de taninos se redujeron (58-71 y 61-70 %, respectivamente); no se detectaron IP₅ e IP₄. Los α -galactósidos e inositol hexafosfato (IP₆) disminuyeron (99-100, 7-39 %, respectivamente), tanto en harina de frijol como en el grano entero fermentados.

Porres *et al.* (2003) estudiaron el efecto de las fermentaciones natural y controlada con inóculo de *Lactobacillus plantarum* y de la fermentación combinada con tratamiento térmico de calor seco a 120 °C por 20 minutos en la composición química y nutricional y la dializabilidad de minerales en frijol (*P. vulgaris* L. var. *carrilla*). Ambas fermentaciones causaron reducción de pH (30 y 42 % en fermentación natural y controlada, respectivamente) y contenido de fitato (36 %) de las harinas de frijol, con un concomitante incremento de la acidez titulable y el contenido de fósforo libre. La dializabilidad del calcio (25.5 %) no fue afectada por la fermentación con inóculo de *L. plantarum*, mientras que la fermentación natural (18.8 %) del frijol causó una ligera pero significativa reducción en el porcentaje de calcio en comparación a frijol crudo.

El porcentaje de dializabilidad de nitrógeno, fósforo, cobre y magnesio mejoró significativamente en ambos tipos de fermentación, mientras que para el zinc fue reducida significativamente; siendo observada mayor reducción para la harina de frijol fermentada con inóculo de *L. plantarum*. Esta misma característica mejoró significativamente en el hierro como resultado de la fermentación natural, pero no se afectó por la fermentación controlada.

Concluyeron que la fermentación natural y la combinación de fermentación natural con calor seco a 120 °C por 20 min son los procesos más eficientes y económicos para desarrollar un producto alimenticio que disminuya el riesgo de deficiencias energéticas y de micronutrientes en niños y ancianos. Sus resultados indican que el proceso de fermentación natural mejora la dializabilidad de nitrógeno, fósforo, hierro, cobre y

magnesio, favoreciendo así un producto alimenticio con elevada disponibilidad de nutrientes.

En el mismo estudio, Porres *et al.* (2003) encontraron que las fermentaciones natural y controlada de harina de frijol incrementaron los niveles de nitrógeno no proteico insoluble y soluble, y disminuyeron el contenido de nitrógeno proteico soluble.

En frijol crudo, 79.3 % del nitrógeno total correspondió a nitrógeno proteico soluble, mientras que 11.5 % correspondió a nitrógeno no proteico soluble (NNP) y el restante 9.2 % no fue soluble a pH básico utilizado para la extracción de nitrógeno. Las fermentaciones natural y controlada de las harinas de frijol incrementaron significativamente los niveles de nitrógeno no proteico soluble e insoluble y redujeron significativamente el contenido de nitrógeno proteico soluble.

El nitrógeno no proteico (NNP) usualmente está constituido de aminoácidos libres, poliaminas, péptidos de bajo peso molecular, bases purinas y pirimidinas y alcaloides; su incremento se puede atribuir a digestión de proteínas de almacenamiento por proteinasas bacterianas o de la leguminosa, lo que origina polipéptidos que no precipitan en las condiciones acídicas.

En cuanto a estudios de los cambios en el patrón de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), Porres *et al.* (2003) encontraron que la harina cruda de frijol exhibió el típico patrón de bandas generalmente atribuidas a subunidades de faseolina (43-51 kDa) y dos bandas de alta densidad a un peso molecular de ~32 kDa, generalmente atribuidas a fitolectinas de *Phaseolus*.

Los procesos de fermentación natural y controlada causaron la desaparición de muchas bandas de proteínas después de 48 h de fermentación, mientras que las bandas de 32 kDa disminuyeron en menor medida y las subunidades de faseolina β'' (46 kDa) y β' (43 kDa) se vieron fuertemente afectadas. La fermentación del frijol llevó a la aparición de agregados proteicos de elevado peso molecular que permanecieron en la

parte superior del gel, lo cual fue muy evidente en las harinas de frijol que fueron fermentadas y después sometidas a secado por calor seco.

Se ha reportado que después de la fermentación natural por 48 h a 42 °C en *Vigna sinensis*, el contenido de proteína se redujo significativamente para la variedad clara Orituco de esta leguminosa (Granito *et al.*, 2004); se observó una reducción más alta cuando los granos fermentados fueron adicionalmente cocidos, pues se observaron reducciones adicionales de 9.1 y 17.3% para las variedades Orituco y Tuy, respectivamente.

Por otra parte, la cocción no varió de manera significativa el contenido de cenizas. Sin embargo, la fermentación natural sí originó disminuciones de 51.53 y 43.60% en los contenidos de cenizas de las variedades Orituco y Tuy. La disminución del contenido en cenizas podría deberse a cambios en la solubilidad de los minerales debido al pH del proceso de fermentación, alrededor de 4.5.

Martín-Cabrejas *et al.* (2004) estudiaron el efecto de las fermentaciones natural y ácido-láctica en las fracciones de fibra dietética (total, insoluble y soluble) en *Phaseolus vulgaris*. Estos autores encontraron que ambas fermentaciones redujeron significativamente el contenido de fibra soluble (de 30 a 19 % de la fibra dietética total) e incrementaron la fibra insoluble (de 68 a 80 % de la fibra dietética total), lo cual podría deberse a una menor accesibilidad de los microorganismos a los componentes de la fibra insoluble durante la fermentación.

La acción de los microorganismos, fue determinante para la degradación de la pared celular de frijol, interrumpiendo la integración proteína-carbohidrato, reduciendo así la solubilidad de la fibra dietética. Este efecto fue más pronunciado en la fermentación láctica que en la fermentación natural.

Granito y Álvarez (2006) estudiaron la fermentación natural de granos de frijol negro (*P. vulgaris* variedad L-140) para identificar la microbiota involucrada y, de esta

manera, proponer la fermentación inducida como un proceso viable de ser utilizado a gran escala. Al analizar microbiológicamente los granos fermentados del frijol negro, encontraron que los microorganismos dominantes fueron *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum*. En la fermentación natural de frijol, los coliformes totales constituían el 62 % de los microorganismos y especies de *Lactobacillus* el 36 % de la población bacteriana, sin embargo, tras la fermentación inducida se logró una disminución de 98 % de coliformes totales.

Al someter los granos de frijol negro a fermentación inducida (24 y 48 h a 42 °C) con diferentes inóculos y posterior cocción, Granito y Álvarez (2006) encontraron que el contenido de proteína disminuyó 4.51 %, mientras que la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* de la proteína aumentó 12.55 y 3.5 %, respectivamente; la fibra soluble e insoluble disminuyó 63.35 y 39.05 %, respectivamente; el almidón resistente y el almidón disponible se incrementaron 13.13 y 35 %, respectivamente.

En cuanto al efecto de la fermentación inducida y cocción del producto de fermentación sobre los minerales, Granito y Álvarez (2006) encontraron que el contenido de ceniza disminuyó 66.88 %, al igual que el contenido de grasa disminuyó 37 %. Respecto a los factores antinutricionales, encontraron una disminución significativa de los inhibidores de tripsina (57 %) y taninos (83 %).

Shimelis y Rakshit (2008) investigaron la influencia de las fermentaciones natural (25 °C por 24, 48, 72 y 96 h) y controlada (cultivo láctico termófilo, mezcla de *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium* BB-12 y *Streptococcus thermophilus* ABT-4) en la digestibilidad *in vitro* de la proteína y el contenido de α -galactósidos y antinutrientes en tres variedades de frijol (*P. vulgaris* L., variedades Roba, Awash y Beshbesh), utilizando harina de la leguminosa. En su trabajo, observaron que la fermentación natural de frijol molido produjo un incremento significativo de 93.59 % en la digestibilidad de la proteína de la variedad Roba de frijol.

Los componentes antinutricionales y el pH disminuyeron significativamente en ambos tipos de fermentación en las investigaciones de Shimelis y Rakshit (2008), sin embargo los valores de pH fueron menores en la fermentación natural que en la fermentación controlada.

La concentración de rafinosa se redujo significativamente hasta un nivel indetectable tras 72 h de fermentación natural. La fermentación controlada no tuvo ningún efecto significativo en la reducción del contenido de α -galactósidos de las harinas durante la fermentación. Los autores concluyeron que los procesos de fermentación natural y controlada incrementan la digestibilidad de la proteína de frijol en alrededor del 90 % y que estos procesos reducen el contenido de fitatos, inhibidores de tripsina, saponinas, taninos y oligosacáridos rafinosa.

La fermentación ofrece ventajas nutricionales únicas para hacer la proteína de harina de frijol más digestible al reducir sus antinutrientes. La fermentación natural tiene un mejor efecto en la descomposición de los oligosacáridos, rafinosa y estaquiosa, así, la fermentación natural es un método económico por el cual los consumidores pueden obtener proteína de buena calidad. Ambos tipos de fermentación disminuyen el contenido de antinutrientes y mejoran el valor nutricional de la harina de frijol (Shimelis y Rakshit, 2008).

En un estudio realizado por Granito *et al.* (2009) se determinó que la vida útil de granos fermentados y cocidos de *P. vulgaris*, almacenados a temperatura ambiente, es de 45 días. Además analizaron la flora microbiana del agua de fermentación, siendo la población predominante los *Lactobacillus* spp., por lo que infirieron que estos microorganismos son los responsables de la fermentación. De igual manera, el pH (4.07) y la acidez titulable (0.13) del agua de fermentación sugieren la presencia activa de bacterias ácido-lácticas como responsables del proceso. La producción de ácido láctico por parte de estos microorganismos contribuye a que la microbiota acompañante no se incremente de manera significativa.

Delgado *et al.* (2011) evaluaron el potencial nutracéutico de harinas precocidas de maíz y frijol (60:40) obtenidas a partir de extrusión de maíz y fermentación en estado sólido de frijol, encontraron que estas harinas presentaron excelentes propiedades nutracéuticas por lo que sugieren su empleo como ingredientes potenciales en la elaboración de bebidas funcionales.

2.6 PROPIEDADES TECNOFUNCIONALES

La industria alimentaria está continuamente ensayando tecnologías e ingredientes para producir nuevos alimentos o mejorar algunas propiedades organolépticas, funcionales y nutritivas de los ya existentes, de tal modo que sean apetecibles para el consumidor y satisfagan sus necesidades. La utilización de las legumbres como alimentos se concentra en los países en desarrollo, que representan el 90% del consumo mundial de legumbres destinadas a alimentación humana (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

El uso exitoso de fuentes de proteínas vegetales en la formulación de alimentos depende de las propiedades funcionales de la materia prima. Las proteínas, así como los carbohidratos y la fibra dietética presentes en el frijol, determinan propiedades funcionales hidrodinámicas importantes como la capacidad para absorber agua y grasa, o propiedades coloidales como la capacidad espumante y emulsificante, las cuales a su vez indican en qué tipo de producto se podrá incorporar la materia prima que las posea (Granito *et al.*, 2004).

Las propiedades funcionales se definen como cualquier propiedad fisicoquímica de los polímeros que afecta y modifica alguna característica de un alimento y que contribuye a la calidad final del producto; además, permiten predecir el comportamiento de los ingredientes proteicos dentro de un producto alimenticio, lo cual determinará su campo de aplicación en la industria de alimentos (González Quijada, 1999, 2003).

Las propiedades de las proteínas inherentes a su funcionalidad no sólo están determinadas por su origen, sino también por las condiciones del procesamiento

utilizado para extraerlas de sus fuentes naturales. Por lo general, las propiedades funcionales la presentan en mayor grado las proteínas en su estado natural normal, perdiéndose en gran medida cuando ocurre la desnaturalización (González Quijada, 1999, 2003).

Las propiedades tecnofuncionales han adquirido una gran importancia debido al incremento en el uso de harinas de leguminosas en el desarrollo de formulaciones alimentarias. No cabe duda que las características tecnofuncionales proporcionan una serie de datos relevantes en la formulación de alimentos, que pueden ser utilizados como guía en el desarrollo de productos, especialmente en harinas mixtas de trigo-leguminosas, donde las proteínas se utilizan como los principales ingredientes funcionales. No obstante, estas características vienen determinadas no sólo por el contenido de proteínas en las harinas, sino también por el contenido de carbohidratos complejos y otros componentes de la fibra alimentaria como son las pectinas y hemicelulosas. Actualmente, los alimentos funcionales están adquiriendo suma importancia y han atraído la atención de no sólo de fabricantes y comercializadores de alimentos, sino también de los consumidores (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

2.6.1 Absorción de agua

La capacidad de absorción de agua se define como la cantidad de agua que permanece unida al material hidratado tras la aplicación de una fuerza externa. Esta propiedad es de suma importancia en el caso de las legumbres y está directamente relacionada con las características de cocción, por lo que resulta imprescindible para determinar el comportamiento del alimento durante el procesado térmico, ya que ayuda a la separación de las células en los cotiledones de las leguminosas. Esta característica también se aplica para mantener la textura suave de productos elaborados con mezcla de harinas de cereal-leguminosa. La propiedad de absorción de agua es deseable en alimentos como natillas y masa de repostería, por su capacidad de embeber agua sin disolver las proteínas (Seena y Sridhar, 2005).

Las interacciones proteína-agua se efectúan por medio de los aminoácidos polares de naturaleza catiónica, aniónica o no iónica, y cada uno de ellos tiene diferente capacidad de retención de agua, siendo mayor ésta cuando el aminoácido se encuentra en forma ionizada; razón por la cual la absorción de agua está influenciada por el pH del medio (Badui Dergal, 2006). Esto implica que las estructuras secundarias y terciarias tienen importancia en la capacidad de absorción de agua de una proteína, debido a que los grupos hidrofílicos deben estar expuestos al exterior, en contacto con el agua, para que la interacción proteína-agua sea efectiva.

Entre distintas variedades de frijol, la harina de frijol rojo arriñonado pequeño tiene la mayor capacidad de absorción de agua (2.65 g/g de harina), mientras que la harina de frijol negro muestra la menor absorción de agua (2.23 g/g de harina) (Siddiq *et al.*, 2010).

2.6.2 Retención de agua

Se define como la habilidad del material húmedo para retener agua cuando el material ha sido sometido a fuerzas centrífugas externas o de compresión; por tanto, es la suma del agua enlazada, agua hidrodinámica y agua atrapada físicamente, siendo esta última la que mayor contribución aporta a esta capacidad. En esta propiedad las proteínas son las principales responsables de los incrementos o reducciones que experimenta la capacidad retención de agua en alimentos (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

2.6.3 Retención de aceite

La proporción de lípidos en las leguminosas es baja si se compara con otros alimentos, sin embargo la capacidad de retención de aceite es determinante en la elaboración y almacenamiento de alimentos fritos, debido al papel que desempeña el aceite en el desarrollo del poder oxidativo y en el de enranciamiento. El mecanismo de esta propiedad se debe a la retención física del aceite por atracción capilar. Esta propiedad es deseable para la conservación de aromas, para conseguir una mejor

palatabilidad e incrementar la vida media de productos de repostería, productos cárnicos y sopas (Aguilera-Gutiérrez, 2009); aumenta o mejora la retención del sabor y el gusto de muchos productos alimenticios (González Quijada, 1999, 2003).

La capacidad de absorción de grasa está determinada por la estructura de la matriz proteica, la disposición de los aminoácidos dentro de la estructura proteica, lo cual a su vez determina las interacciones hidrofóbicas proteína-grasa, por el tipo de grasa y por la presencia de almidones (Granito *et al.*, 2004).

Siddiq *et al.* (2010) reportan diferencias significativas en la capacidad de absorción de aceite de harinas de distintas variedades de frijol, las cuales van de 1.23 g/g de harina de frijol rojo arriñonado pequeño a 1.52 g/g de harina de frijol rojo arriñonado.

2.6.4 Capacidad de hinchamiento

Se define como la relación entre el peso húmedo del gel sedimentado y su peso seco. Generalmente el almidón de las leguminosas es más viscoso que el perteneciente a cereales, lo que indica que el almidón de las harinas de leguminosas presenta una mayor resistencia al hinchamiento y a la ruptura. La capacidad de hinchamiento también podría ser atribuida a las pequeñas cantidades de carbohidratos, principalmente de almidón y a las uniones del agua con las proteínas solubles (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

2.6.5 Gelificación

Una de las propiedades funcionales más importantes de las proteínas es su capacidad para formar geles después del calentamiento. La gelificación determina muchos parámetros reológicos en los productos alimenticios sólidos o semisólidos porque contribuye a la textura, apariencia y actúa como una matriz rígida que retiene agua, lípidos, proteínas disueltas, carbohidratos y otras especies (González Quijada, 1999, 2003).

El mecanismo de gelificación es complejo y comprende un paso previo en el cual se desdoblán las proteínas, para luego ocurrir la interacción proteína-proteína que da origen a la estructura tridimensional ordenada característica del gel (Badui Dergal, 2006).

Esta propiedad representa la mínima concentración a la que una harina alcanza la máxima gelificación. Se trata de una propiedad esencial en la elaboración y aceptación de diversos alimentos, incluyendo vegetales y otros productos. La capacidad de gelificación de las leguminosas parece estar en función de la naturaleza y tipo de almidón y proteína que constituyen el alimento, e incluso de los posibles complejos proteína-polisacárido que pueden llegar a formar. Asimismo, la concentración mínima requerida para la formación de un gel en harinas está influenciada por una competición física por el agua entre la gelificación de la proteína y la gelatinización del almidón. La capacidad que tienen las harinas de leguminosas para formar geles es muy apropiada en la elaboración de alimentos viscosos tales como salsas procedentes de carnes, sopas, productos de repostería, entre otros (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

2.6.6 Capacidad espumante

Esta propiedad hace referencia a la capacidad que tienen las proteínas de formar capas estables rodeando las gotitas de gas en una fase líquida (Rangel *et al.*, 2003). Las proteínas flexibles facilitan una buena capacidad de formar espumas, mientras que las moléculas globulares proporcionan una baja capacidad espumante porque éstas no son capaces de reducir la tensión superficial de la interfase aire-agua. La capacidad de formar espuma en las harinas de leguminosas es una característica deseable para la producción de algunos alimentos tradicionales, tales como los productos de repostería (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

2.6.7 Capacidad emulsionante

Esta propiedad mide la capacidad de las proteínas para formar una dispersión de una fase oleosa en un medio acuoso. Las características de emulsión de las proteínas

contribuyen en gran medida a la funcionalidad de los alimentos. Son varios los factores que afectan a la capacidad emulsionante, tales como pH, tamaño de gota, carga neta, tensión interfacial, viscosidad y la conformación de la proteína. Se ha observado que los elevados valores de capacidad emulsionante que poseen algunas proteínas de leguminosas pueden ser debidas a la naturaleza globular que presentan, o bien estar directamente relacionadas con la mayor o menor solubilidad que muestran en el alimento. Otros componentes de naturaleza no proteica, como los carbohidratos, también contribuyen sustancialmente a las propiedades de emulsión. Por lo tanto, las proteínas procedentes de leguminosas que poseen buena capacidad para formar emulsiones podrán ser utilizadas en la fabricación de alimentos como mayonesa, salchichas y aderezos (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

2.6.8 Densidad aparente

Es la propiedad tecnofuncional que relaciona la masa con el volumen ocupado por el alimento, incluyendo el volumen de las partículas y los espacios disponibles entre las mismas. La densidad aparente de las harinas de leguminosas tiene un papel importante en la formulación de alimentos infantiles (Aguilera-Gutiérrez, 2009).

La densidad aparente de harinas de frijol de distintas variedades varía significativamente desde 0.515 g/mL en harina de frijol negro hasta 0.556 g/mL para la harina de frijol rojo arriñonado (Siddiq *et al.*, 2010).

2.7 EFECTO DEL PROCESAMIENTO EN PROPIEDADES TECNOFUNCIONALES

Granito *et al.*, (2004) evaluaron las propiedades tecnofuncionales: absorción de agua y de grasa, capacidad emulsificante y espumante en harinas de frijol venezolano (*Vigna sinensis*) crudas, cocidas, fermentadas y fermentadas cocidas; encontraron que el procesamiento térmico húmedo (cocción) y la fermentación natural a 42 °C por 48 h incrementan la capacidad para absorber agua y grasa, pero disminuyen la capacidad

espumante, así como la estabilidad de la espuma. En este estudio, los granos fermentados presentaron una menor afinidad por las grasas, mientras que los fermentados cocidos presentaron la mayor capacidad de absorción de grasa. La capacidad emulsificante entre muestras crudas, fermentadas y fermentadas cocidas no presentaron diferencias significativas. Las harinas de granos fermentados y fermentados cocidos no presentaron capacidad espumante.

La fermentación natural por 48 h a 42°C parece ejercer un efecto protector sobre la desnaturalización que produce el tratamiento térmico en las proteínas de las harinas, contribuyendo a conservar la capacidad emulsificante de las harinas crudas en las harinas fermentadas y cocidas (Granito *et al.*, 2004).

Estos autores sugieren la incorporación de harinas fermentadas y cocidas de frijol (*Vigna sinensis*) para la elaboración de alimentos viscosos, tales como sopas, salsas, masas y productos horneados, así como en productos emulsionados, como mayonesas, postres congelados y embutidos. También se sugiere la incorporación a productos fritos como empanadas, croquetas o donas.

Se ha estudiado el impacto del procesamiento (remojo, cocción y deshidratación industrial) en el perfil fenólico, la actividad antioxidante y las propiedades funcionales de harinas deshidratadas de frijol (*P. vulgaris*), variedades Cannellini y Pinta (Aguilera *et al.*, 2011). La deshidratación industrial produjo una reducción general de los compuestos bioactivos y se observó actividad antioxidante.

En cuanto a las propiedades funcionales, Aguilera *et al.* (2011) encontraron que las harinas crudas y procesadas exhibieron baja capacidad de retención de aceite (1-1.15 mL/g), mientras que las capacidades de retención de agua en las harinas de frijol fueron de 3-3.8 mL/g. Las capacidades emulsificante y espumante fueron inhibidas durante el procesamiento térmico. Estos autores consideran que las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos bioactivos junto con las propiedades funcionales observadas

en las harinas deshidratadas de frijol, hacen que estos productos sean considerados ingredientes funcionales para formulación de alimentos.

Se estudiaron las propiedades funcionales y bioquímicas de cotiledones de frijol sometidos a extrusión en las siguientes condiciones: 12.3-23.7 g/100 g de humedad y temperatura de 150-178 °C (Lopes *et al.*, 2012). Sus resultados indican que la cocción por extrusión no altera la composición química de harinas de frijol, pero elimina completamente la actividad de los inhibidores de tripsina y α -amilasa y hemaglutininas.

Otro proceso que tiene impacto en las propiedades biológicas de *P. vulgaris* es la germinación. Se realizó un estudio de la influencia de la cocción y la germinación en la composición fenólica de frijol negro variedad Tolosana, y su efecto en las capacidades antioxidante, neuroprotectora y anticancerígena (López *et al.*, 2013). Se observaron diferencias cualitativas y cuantitativas en la composición fenólica entre frijol negro crudo y procesado, esto ocurrió principalmente en la germinación, que produjo una reducción de la capacidad antioxidante.

JUSTIFICACIÓN

El uso doméstico del frijol en Latinoamérica sigue siendo el uso principal de esta leguminosa, y la necesidad de productos nutritivos industrializados con ingredientes aceptados culturalmente es una opción deseable, sin embargo, la industrialización debe resolver la eliminación y/o inactivación de compuestos antinutrimientales como los inhibidores de proteasas, los α -galactósidos, entre otros, a la vez de mejorar la bioutilización de los nutrimentos que contiene; principalmente proteínas, minerales y fibra. Adicionalmente, el uso de variedades de frijol de poca aceptación doméstica, puede tener un valor agregado como ingrediente biofuncional en la industria de los alimentos.

Con base en lo anterior, se propuso propiciar cambios en la proteína del frijol por efecto de la fermentación natural y de una fermentación inducida por una bacteria ácido láctica (BAL), la identificación de los microorganismos presentes en el proceso de fermentación natural, el desarrollo y estandarización de un proceso de fermentación ácido láctica y la valoración del impacto de las alteraciones proteicas en las propiedades tecnofuncionales y nutricias del producto.

Considerando la importancia de este alimento en la dieta de la población latinoamericana, se buscó la obtención de un ingrediente funcional en forma de harina o un aditivo alimentario con valor agregado y elevada calidad química-nutricional y microbiológica. Este producto fermentado representaría una opción encaminada a diversificar la dieta del consumidor con productos vegetales de buena calidad, ampliar las posibilidades de los productores en el mercadeo de esta leguminosa e implementar el proceso de fermentación ácido láctica desarrollado y estandarizado en el presente trabajo, en otras variedades de frijol o en otras leguminosas.

HIPÓTESIS

La fermentación natural e inducida del frijol (*Phaseolus vulgaris*) por una bacteria ácido láctica (BAL), altera el contenido proteico de esta leguminosa, lo cual afecta a una o más propiedades tecnofuncionales y nutricias del producto.

OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un proceso fermentativo para producir un ingrediente tecnofuncional de buen valor nutricio y sanitario a partir de frijol (*Phaseolus vulgaris*).

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar los microorganismos presentes en la fermentación natural del frijol (*Phaseolus vulgaris*) var. pinto americano.
2. Aislar y caracterizar bioquímicamente una bacteria ácido láctica (BAL) presente en el proceso de fermentación natural del frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano.
3. Establecer las condiciones (tiempo, temperatura, presencia o ausencia de oxígeno, pH) que son favorables para la BAL obtenida en el proceso de fermentación natural, para ser empleada posteriormente en procesos estandarizados de fermentación inducida de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano.
4. Determinar las modificaciones en las propiedades tecnofuncionales del frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano causadas por procesos de fermentación, natural e inducida por una BAL.
5. Determinar el valor nutrimental del frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano a través del proceso fermentativo natural e inducido por una BAL.
6. Determinar la calidad microbiológica de los productos de fermentación, natural e inducida por BAL, de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano.

MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 MUESTRAS

El proceso y los análisis se realizaron en muestras de frijol (*Phaseolus vulgaris*) variedad pinto americano proporcionado por la Facultad de Agronomía de la UANL. Las muestras empleadas fueron de frijol sin procesar, frijol procesado por fermentación natural (FN) y frijol procesado por fermentación inducida (FI) por bacterias ácido lácticas (BAL).

6.2 FERMENTACIÓN NATURAL

La fermentación natural, se llevó a cabo de acuerdo a Granito *et al.* (2002), con modificaciones. Primeramente, el frijol se limpió manualmente de forma aséptica para retirar polvo y partículas de materia extraña, se pesaron por triplicado muestras de 100 g y, posteriormente, cada muestra se lavó tres veces con 100 mL de agua destilada estéril. Después, cada muestra se colocó en agua destilada estéril (1:4, m/v) y se dejó en remojo por 16 h. Tras el periodo de remojo, se drenó el líquido y el frijol se sometió a procesamiento por fermentación natural, donde el frijol se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL conteniendo agua destilada estéril (1:4, m/v) y se dejó fermentar a 42 °C por 48 y 72 h en una incubadora (Hoffman Manufacturing, Inc.). Este mismo proceso se realizó también en agitación constante (140 ciclos/min) en un baño de agitador (temperature controller, Thomas Scientific) .

En el tiempo cero y cada 24 h se homogeneizó el contenido del matraz y se tomó muestra del líquido de fermentación para determinar indicadores microbiológicos y bacterias ácido lácticas, además de monitorear el pH con un potenciómetro (530 pH meter, Corning, Inc.).

Una vez concluido el tiempo de fermentación, el material fermentado fue drenado, se secó a 55-60 °C por 24 h en una estufa de secado, se molió asépticamente empleando una licuadora (Oster, Jarden Corp.) y se almacenó en congelación para posteriormente realizar los análisis correspondientes.

Las bacterias ácido lácticas aisladas se sembraron en caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC) (Difco, Becton and Dickinson) y se resguardaron en refrigeración (4 °C) para posterior identificación bioquímica.

6.2.1 Microorganismos indicadores

Para determinar la calidad microbiológica durante el proceso y en el producto final, se determinaron los siguientes microorganismos indicadores: mesófilos aerobios (MA), coliformes totales (CT) y enterococos totales (E).

La determinación de mesófilos aerobios se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de bacterias aerobias en placa; en tanto que para la determinación de coliformes totales se utilizó la metodología descrita en la NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes en placa. Los enterococos se determinaron mediante el procedimiento descrito por Cárdenas (2012) (DOF, 1995a, 1995c; FDA, 1998; Granito y Álvarez, 2006; Cárdenas, 2012).

6.2.1.1 Preparación de la muestra.

Se preparó una dilución primaria en donde 11 mL de la muestra se transfirieron asépticamente a un frasco de dilución con 99 mL de agua peptonada 0.1 % estéril y se homogeneizó empleando un vórtex (SP Vortex Jr. Mixer S8225-1, Baxter Scientific), para constituir la dilución primaria.

A partir de la dilución primaria se prepararon diluciones decimales seriadas. Se transfirió asépticamente 1 mL de la dilución primaria a un tubo de ensayo de 18 x 150 mm conteniendo 9 mL de agua peptonada 0.1 % estéril y se agitó en vórtex, y así se hizo sucesivamente con cada una de las diluciones siguientes.

6.2.1.2 Mesófilos aerobios.

Una vez preparadas las diluciones de la muestra, se cuantificaron los mesófilos aerobios según la NOM-092-SSA1-1994, empleando la técnica de vertido en placa. Para ello se tomó una alícuota de 1 mL de cada dilución y se colocó en el centro de una placa Petri estéril, posteriormente se agregaron 12 a 15 mL de agar cuenta en placa (ACP) (Difco, Becton and Dickinson) fundido y mantenido a 48 °C (termobañero Felisa, Fabricantes Feligneo, S. A. de C.V.), se mezcló mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio, posteriormente se dejó solidificar.

Las placas se incubaron en posición invertida a 35 ± 2 °C (Lab-Line Imperial III Incubator, Barnstead International) durante 48 ± 2 h. Transcurrido el tiempo de incubación se cuantificaron las colonias (SC5 Colony Counter, Stuart Scientific), seleccionando las placas con 25-250 colonias. Cada muestra se plaqueó por triplicado; además se incluyó una caja sin inóculo como control negativo. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) de muestra.

6.2.1.3 Coliformes totales.

Una vez realizadas las diluciones de la muestra, para la determinación de coliformes totales se empleó la metodología descrita en la NOM-113-SSA1-1994 utilizando las técnicas de siembra por vertido en placa y la de doble capa de agar.

Se transfirieron alícuotas de 1 mL de las diluciones de la muestra a placas de Petri estériles y posteriormente se agregaron 12 a 15 mL de agar bilis rojo violeta (RVBA) (Difco, Becton and Dickinson) fundido y mantenido a 48 °C, se mezcló mediante 6

movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio y se dejó solidificar.

Posteriormente, se añadió una capa de 5 mL más de RVBA fundido y mantenido a 48 °C y se dejó solidificar. Las placas se incubaron en posición invertida a 35 ± 2 °C (Lab-Line Imperial III Incubator, Barnstead International) durante 18-24 h.

Transcurrido el tiempo de incubación, los coliformes se cuantificaron (SC5 Colony Counter, Stuart Scientific) como colonias color rojo a púrpura de al menos 0.5 mm de diámetro y con halo de precipitación debido a las sales biliares. Cada muestra se plaqueó por triplicado, además se incluyó una caja sin inóculo como control negativo. Los resultados se expresaron como UFC/g de muestra.

6.2.1.4 Enterococos totales.

Una vez preparadas las diluciones de la muestra, se determinaron los enterococos presentes empleando la técnica de vertido en placa según la metodología descrita por Cárdenas (2012).

Para ello se tomó una alícuota de 1 mL de cada dilución y se colocó en el centro de una placa Petri estéril, posteriormente se agregaron 12 a 15 mL de agar KF Streptococcus (Difco, Becton and Dickinson) suplementado con cloruro de 2, 3, 5-trifenil-tetrazolio (TTC) 1% (Sigma-Aldrich, Inc.), fundido y mantenido a 48 °C, se mezcló mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio y se dejó solidificar. Las placas se incubaron en posición invertida a 35 ± 2 °C (Lab-Line Imperial III Incubator, Barnstead International) durante 48 ± 2 h.

Transcurrido el tiempo de incubación, se cuantificaron las colonias (SC5 Colony Counter, Stuart Scientific) características de *Enterococcus* spp. en este medio, cuya

presencia se detectó con púrpura de bromocresol que cambia de color púrpura a amarillo, por la capacidad de los enterococos de metabolizar maltosa y lactosa con producción de ácido, además que estos microorganismos reducen el TTC a formazán dando una coloración roja a las colonias (Neogen, 2011a; Cárdenas, 2012). Cada muestra se plaqueó por triplicado; además se incluyó una caja sin inóculo como control negativo. Los resultados se expresaron como UFC/g de muestra.

6.2.2 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Una vez preparadas las diluciones de la muestra como se indica en la sección “6.2.1.1 Preparación de la muestra”, se determinaron las bacterias ácido lácticas (BAL) presentes empleando la técnica de vertido en placa, según la metodología de Granito y Álvarez (2006) con modificaciones.

Se tomó una alícuota de 100 mL de cada dilución y se colocó en el centro de una placa Petri estéril, posteriormente se agregaron 12 a 15 ml de Agar DeMan Rogosa-Sharpe (MRS) (Difco, Becton and Dickinson) fundido y mantenido a 48 °C, se mezcló mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio y se dejó solidificar. Las placas se incubaron en posición invertida a 35 ± 2 °C (Lab-Line Imperial III Incubator, Barnstead International) durante 72 ± 2 h en ambiente microaerofílico (Neogen, 2011b).

Transcurrido el tiempo de incubación se cuantificaron las colonias características de BAL, que son grandes y color blanco. Cada muestra se plaqueó por triplicado; además se incluyó una caja sin inóculo como control negativo. Los resultados se expresaron como UFC/g de muestra.

Las bacterias ácido lácticas aisladas se sembraron en caldo ICC (Difco, Becton and Dickinson) y se resguardaron en refrigeración (4 °C) para identificación bioquímica.

6.3 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN NATURAL

Se realizaron pruebas de identificación de las bacterias ácido lácticas aisladas del proceso de fermentación natural de frijol (*Phaseolus vulgaris*) var. pinto americano. Para la realización de las pruebas se emplearon cultivos de BAL de 24 h en caldo ICC. Las pruebas se realizaron por triplicado y se detallan a continuación.

6.3.1 Identificación bioquímica

Las bacterias ácido lácticas aisladas durante el proceso de fermentación natural se sometieron a pruebas bioquímicas señaladas en el manual de Cowan y Steel (1974) en dos etapas, para identificación de género y especie. Las pruebas primarias fueron: tinción de Gram (morfología), catalasa, oxidasa, oxidación/fermentación (O/F) y movilidad; las pruebas bioquímicas de segunda etapa fueron: hemólisis, crecimiento a 45 °C, sobrevivencia a 60 °C durante 30 min, crecimiento en pH 9.6, arabinosa (ácido) y glicerol (ácido). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Los resultados se compararon con tablas de referencia (Cowan y Steel, 1974) para establecer el género y la especie presuntiva de las BAL aisladas.

6.3.1.1 Pruebas bioquímicas primarias.

Las pruebas bioquímicas primarias se realizaron de acuerdo a los métodos mencionados por MacFaddin (2003).

6.3.1.1.1 Tinción de Gram. Se realizó un frotis bacteriano a partir de un cultivo de 24 h en caldo ICC. Con ayuda de un mechero, se flameó un asa bacteriológica hasta el rojo vivo y se esperó a que enfriara un poco, se tomó una gota de agua estéril y se colocó en un portaobjetos. Se flameó nuevamente el asa y se esperó a que enfriara para tomar con el asa un poco de muestra bacteriana a partir de una colonia aislada. Se

colocó la muestra en la gota de agua del portaobjetos y se homogeneizó suavemente con movimientos circulares. Se esperó a que el frotis seicara al aire libre y se pasó durante uno o dos segundos por la flama del mechero para fijar la muestra.

Una vez fijada la muestra, se agregó el colorante cristal violeta, durante 60 segundos, posteriormente se enjuagó con agua destilada. A continuación se agregó el yodo-lugol, durante 60 segundos, enseguida se enjuagó con agua destilada. Posteriormente, se lavó con alcohol-acetona durante aproximadamente 15 a 20 segundos e inmediatamente se enjuagó con agua destilada. Finalmente, se agregó safranina, durante 60 segundos, posteriormente se enjuagó con agua destilada. El frotis se secó a temperatura ambiente y se observó en un microscopio óptico con el objetivo de 100X empleando aceite de inmersión para determinar la morfología de la bacteria.

6.3.1.1.2 Prueba de la catalasa. Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno 3 % (H_2O_2) sobre un portaobjetos con ayuda de una pipeta, después se tomó una asada de bacterias a partir de un cultivo de 24 h en caldo ICC y se suspendió en la gota del reactivo. Se detectó la formación de burbujas como resultado positivo (+) y su ausencia como negativo (-).

6.3.1.1.3 Prueba de la oxidasa. Se preparó el reactivo de oxidasa en solución al 1%; con una pipeta se transfirieron unas gotas de reactivo directamente sobre un cultivo bacteriano de 24 h en placa de Petri con agar base sangre; esta placa de cultivo ya no sería utilizada. Para que el resultado sea positivo (+) se debe observar una coloración morada o azul en un lapso no mayor a 10 a 30 segundos, de lo contrario el resultado es negativo (-). No se debe considerar un resultado positivo después de 30 segundos, ya que el oxígeno molecular del ambiente oxida al reactivo.

6.3.1.1.4 Prueba de oxidación/fermentación (O/F). Esta prueba nos indica si el microorganismo presente, tiene un metabolismo oxidativo o fermentativo. Se preparó el medio OF (Becton Dickinson) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se distribuyó en tubos con tapón de rosca. Posteriormente, se añadieron 1 o 2 mL de aceite

mineral estéril a la mitad de los tubos. Los tubos de medio OF con aceite fueron empleados para la prueba de fermentación y los tubos de medio OF sin aceite se emplearon para la prueba de oxidación. Los tubos se inocularon por el método de punción en el agar y se incubaron a 37 °C durante 24-48 h. Se emplearon como **control positivo oxidativo:** *Pseudomonas aeruginosa* y como **control positivo fermentador:** *Escherichia coli*.

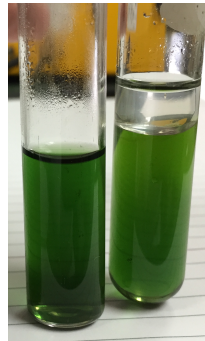


Figura 4. Prueba OF. Prueba negativa, no hay cambios en ninguno de los tubos, debido a que el microorganismo es no sacarolítico, no consume glucosa.

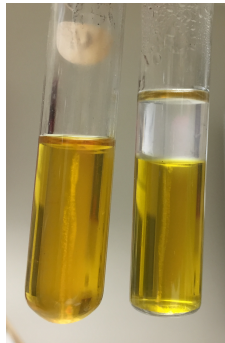


Figura 5. Prueba OF. Prueba positiva para fermentadores facultativos, en donde ambos tubos presentan viraje a amarillo; se reporta como “F”.

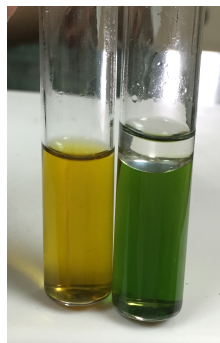


Figura 6. Prueba OF. Prueba positiva para metabolismo oxidativo. En esta prueba no hay cambio de coloración en el tubo que contiene aceite; se reporta como “O”.

6.3.1.1.5 Prueba de movilidad. La movilidad se realizó en medio SIM y OF, se determinó mediante la observación de un crecimiento turbio lejos de la picadura realizada en la inoculación de los medios OF o en un medio SIM.

6.3.1.2 Pruebas bioquímicas de segunda etapa.

Las pruebas bioquímicas de segunda etapa se realizaron para discriminar género.

6.3.1.2.1 Hemólisis. Se tomó una asada de cultivo bacteriano de 24 h en caldo ICC y se sembró por estría en una placa de agar sangre (Difco, Becton and Dickinson). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h.

En la hemólisis alfa (α), el agar bajo la colonia es oscuro y verdoso; se denomina hemólisis incompleta o hemólisis parcial y es causada por H_2O_2 producido por la bacteria que oxida hemoglobina a metahemoglobina verde.

La hemólisis beta (β) se denomina hemólisis completa. Ocurre la lisis completa de los glóbulos rojos alrededor y debajo de las colonias. Se observa como una zona transparente.

En la hemólisis gama (γ) no ocurre hemólisis; el agar debajo y alrededor de la colonia no presenta ningún cambio.

6.3.1.2.2 Crecimiento a 45 °C. Se tomó una asada de cultivo bacteriano de 24 h en caldo ICC y se inoculó otro tubo con caldo ICC que se incubó a 45 °C (Hoffman Manufacturing, Inc.) durante 24 h. La turbidez representa un resultado positivo y un tubo translúcido (tubo sin cambios) representa un resultado negativo.

6.3.1.2.3 Sobrevivencia a 60 °C durante 30 min. Se tomó un tubo con cultivo de 24 h en caldo ICC, se colocó en un baño de agua (termobañero Felisa, Fabricantes Feligneo, S. A. de C.V.) a 60 °C por 30 min. Después, se tomó una asada del cultivo y se inoculó

otro tubo con caldo ICC, se incubó a 37 °C por 24 h. La turbidez representa un resultado positivo y un tubo translúcido (tubo sin cambios) representa un resultado negativo.

6.3.1.2.4 Crecimiento en pH 9.6. Se tomó una asada de cultivo bacteriano de 24 h en caldo ICC, se inoculó otro tubo con caldo ICC, que previamente se ajustó a pH 9.6, y se incubó durante 24 h. La turbidez representa un resultado positivo y un tubo translúcido (tubo sin cambios) representa un resultado negativo.

6.3.1.2.5 Arabinosa (ácido). Se tomó una asada de cultivo bacteriano de 24 h en caldo ICC y se inoculó un tubo preparado con caldo nutritivo suplementado con arabinosa al 1 % y púrpura de bromocresol como indicador, se incubó a 37 °C durante 24 h. La turbidez y el vire del indicador a color amarillo representa un resultado positivo y un tubo translúcido y que permanece púrpura representa un resultado negativo.

6.3.1.2.6 Glicerol (ácido). Se tomó una asada de cultivo bacteriano de 24 h en caldo ICC y se inoculó un tubo preparado con caldo nutritivo suplementado con glicerol al 1 % y púrpura de bromocresol como indicador, se incubó a 37 °C durante 24 h. La turbidez y el viraje del indicador a color amarillo representa un resultado positivo y un tubo translúcido y que permanece púrpura representa un resultado negativo.

6.4 FERMENTACIÓN INDUCIDA DEL FRIJOL CON BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

6.4.1 Condiciones óptimas para BAL

Una vez identificadas las BAL aisladas del proceso de fermentación natural, se realizaron distintas pruebas para determinar las condiciones óptimas para la realización de la fermentación inducida.

Las pruebas se realizaron partiendo del cultivo axénico y con un tiempo de crecimiento de 24 h, los tubos con caldo ICC se inocularon con la BAL y se sometieron

a una combinación de las siguientes condiciones: temperaturas de incubación de 42, 45 y 50 °C; pH de 3, 4 y 5; presencia de oxígeno y de dióxido de carbono (Figura 7). Las pruebas se realizaron por triplicado.

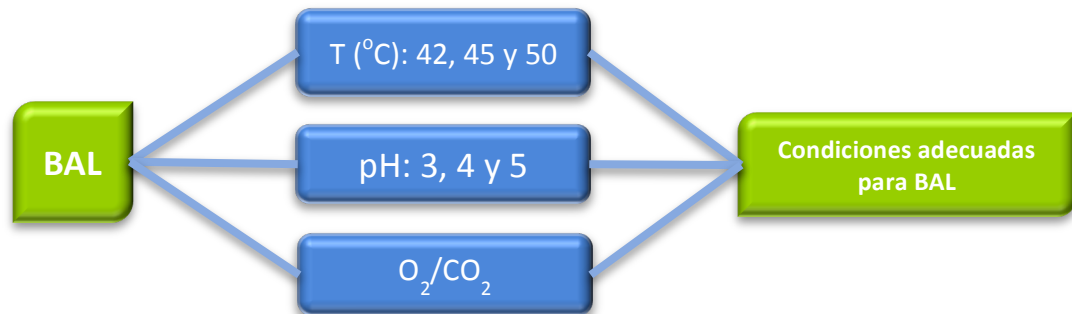


Figura 7. Condiciones de temperatura, pH y presencia de oxígeno/dióxido de carbono a las que se sometieron las bacterias ácido lácticas para determinar las condiciones favorables para su uso en proceso de fermentación inducida.

Posterior a la determinación de las condiciones óptimas para las BAL aisladas, se procedió a la sanitización del frijol con diferentes métodos para eliminar en lo más posible los microorganismos naturalmente presentes. Además después de la sanitización, se realizaron pruebas microbiológicas para comprobar la microbiota remanente.

6.4.2 Sanitización de frijol para la fermentación inducida

Para sanitizar el frijol y eliminar los microorganismos presentes, se evaluaron dos métodos.

Tratamiento térmico: El frijol, tras el periodo de remojo, se colocó en un matraz con agua destilada estéril (relación 1:4 m/v), se extrajo una muestra para determinar los niveles de indicadores de calidad microbiológica (mesófilos aerobios, coliformes totales y enterococos totales) y de BAL, después de sometió a un tratamiento térmico a 80 °C por 20 min en baño de agua para posteriormente colocarlo en baño de hielo y finalmente determinar nuevamente los niveles de indicadores microbiológicos y de BAL.

Tratamiento con hipoclorito de sodio 1 % (v/v) y ácido láctico 10 % (v/v): El frijol, tras el periodo de remojo, se drenó y se procedió a su sanitización. Primero, se realizó un lavado con 200 mL de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % (v/v) (Sigma-Aldrich, Inc.), se dejó en reposo por 15 min, se drenó el líquido y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, se realizó un lavado con 200 mL de ácido láctico al 10 % (v/v) (Sigma-Aldrich, Inc.), se dejó en reposo por 10 min, se drenó el líquido y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. Tras la sanitización, se procedió a determinar los niveles de indicadores microbiológicos y de BAL presentes.

6.5 PROCESO FERMENTATIVO INDUCIDO DEL FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) VAR. PINTO AMERICANO

El proceso de fermentación inducida de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano se realizó tomando como base la metodología de Granito *et al.* (2002) y Granito y Álvarez (2006), realizando modificaciones de acuerdo a los resultados obtenidos en los puntos 6.4.1 y 6.4.2 mencionados arriba.

El frijol se limpió de acuerdo a la metodología mencionada en el punto 6.2 para posteriormente ser sometido al tratamiento de sanitización de acuerdo al método mencionado en el punto 6.4.2. Tras la sanitización, se procedió al monitoreo de indicadores microbiológicos (mesófilos aerobios, coliformes totales y enterococos totales). Posteriormente el frijol se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL conteniendo agua destilada estéril (1:4, m/v) ajustando el pH en un rango de 5-5.6. Una vez ajustado el pH el matraz se inoculó con 1×10^8 UFC de la BAL, se sometió a fermentación a 42 °C por 72 h. Los niveles de BAL y el pH se monitorearon cada 24 h. Este procedimiento se realizó tanto con frijol entero como con frijol molido.

Una vez concluido el tiempo de fermentación, el material fermentado fue drenado, se secó a 55-60 °C por 24 h en una estufa de secado, se molió asépticamente empleando una licuadora y se almacenó en congelación para posteriormente realizar los análisis correspondientes.

6.6 ANÁLISIS QUÍMICO-NUTRICIONAL

Las muestras de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano sin procesar y de frijol fermentado fueron evaluadas nutricionalmente.

6.6.1 Análisis proximal

La composición proximal de muestras de harina de frijol sin procesar y de frijol fermentado se determinó empleando procedimientos de la AOAC: contenido de humedad, proteína, cenizas, extracto etéreo y fibra dietética (total, soluble e insoluble) (AOAC, 1995). Los carbohidratos disponibles se obtuvieron por diferencia a 100.

6.6.2 Digestibilidad *in vitro* de la proteína

La digestibilidad *in vitro* se determinó de acuerdo a la metodología de Barbano *et al.* (1991), Dinnella *et al.* (2007) y Lamothe *et al.* (2014).

6.6.2.1 Digestión *in vitro*.

La digestión *in vitro* se llevó a cabo en dos fases: fase gástrica y fase intestinal, para ello se siguió la metodología de Dinnella *et al.* (2007) con algunas modificaciones.

En la fase gástrica, se tomaron 5 g de muestra y se añadieron 40 mL de agua destilada (1:8, m/v), la mezcla se acidificó a pH 2 con ácido clorhídrico (HCl) 6 N. La muestra se sometió a agitación vigorosa durante 15 min; después, se revisó el pH y eventualmente se volvió a ajustar con HCl 6 N en caso necesario. Se adicionaron 1.5 mL de solución de pepsina (160 mg/mL; Sigma-Aldrich) disuelta en HCl 0.1 N; se añadió agua destilada para alcanzar un volumen final de 50 mL. La mezcla se agitó a 37 °C por 2 h (temperature controller, Thomas Scientific).

Después de la digestión gástrica se llevó a cabo la fase intestinal, para esto se adicionaron 12 mL de solución de pancreatina-bilis (4 mg/mL de pancreatina, 25 mg/mL de bilis en Na₂CO₃ 0.1 M; Sigma-Aldrich, MP Biomedicals, LLC.) a la mezcla digerida. El pH de la mezcla se ajustó a 7 con carbonato de sodio (Na₂CO₃) 0.9 M y se agitó a 37 °C por 2 h. Se registró el volumen final del digerido.

6.6.2.2 Determinación de la proteína en el digerido.

La determinación de la digestibilidad *in vitro* de la proteína se realizó siguiendo la metodología de Barbano *et al.* (1991) y Lamothe *et al.* (2014) con modificaciones.

La muestra digerida fue tratada añadiendo ácido tricloroacético (TCA) hasta una concentración final de 12 % m/m. Para esto, se añadió un volumen de TCA 40 % que se determinó a partir del volumen final de la mezcla digerida. El contenido se mezcló y se dejó precipitar y reposar por 15 min. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 6000 rpm por 20 min; se descartó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados del pellet con agua destilada.

Una vez concluidos los lavados del precipitado con agua destilada, este se transfirió cuidadosamente a una charola de aluminio para llevar a secado a 60 °C por 24 h. Tras el secado, se realizó la determinación de proteína por el método Kjeldahl (AOAC, 1995).

6.7 PROPIEDADES TECNOFUNCIONALES

La funcionalidad de los productos de fermentación natural y de fermentación inducida del frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano se evaluó mediante la determinación de las siguientes propiedades tecnofuncionales, que se realizaron por triplicado.

6.7.1 Absorción de agua

La absorción de agua se determinó por el método de Beuchat (1977). Se pesó 1 g de muestra, se le añadieron 10 mL de agua destilada y se agitó durante 30 s. La muestra se dejó sedimentar a temperatura ambiente (21-25 °C) por 30 min. Posteriormente se centrifugó a 5,000 x g por 30 min (Spectrafuge 6C, Labnet International, Inc.) y se midió el volumen del sobrenadante en una probeta graduada de 10 mL. Los resultados se expresan como mL/g de muestra (Deshpande *et al.*, 1982; Aguilera-Gutiérrez, 2009).

6.7.2 Absorción de aceite

La absorción de aceite se determinó por el método de Beuchat (1977). Se pesó 1 g de muestra, se le añadieron 10 mL de aceite vegetal y se agitó durante 30 s. Posteriormente se centrifugó a 5,000 x g por 30 min (Spectrafuge 6C, Labnet International, Inc.) y se midió el volumen del sobrenadante en una probeta graduada de 10 mL. Los resultados se expresan como mL/g de muestra (Deshpande *et al.*, 1982; Aguilera-Gutiérrez, 2009).

6.7.3 Gelificación

Se empleó el método de Deshpande *et al.* (1982). A partir de la muestra se prepararon suspensiones de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 % (m/v) en 5 mL de agua destilada. Los tubos de prueba con estas suspensiones se calentaron por 1 h en baño de agua a 100 °C (termobañero Felisa, Fabricantes Feligno, S. A. de C.V.) e inmediatamente después los tubos se enfriaron bajo el flujo de agua potable fría, para después enfriarlos a 4 °C por 2 h. La menor concentración de gelificación se definió como aquella a la que la muestra no se desliza por las paredes del tubo de prueba invertido. Los resultados se expresaron como: no ocurre gelificación (-), gelificación completa (+) o gelificación parcial (±) (Siddiq *et al.*, 2010).

6.7.4 Capacidad espumante

La capacidad espumante se determinó siguiendo la metodología de Bencini (1986). Se pesó 1 g de muestra, se añadieron 50 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente durante 5 min en un homogeneizador (Sunbeam). Inmediatamente, el contenido se transfirió a una probeta graduada de 250 mL. Se midieron los volúmenes inicial y final de espuma, este último después de 30 s. Los resultados se expresan como porcentaje de incremento de volumen, que se calcula con la fórmula mostrada a continuación (Aguilera-Gutiérrez, 2009; Siddiq *et al.*, 2010).

$$\text{Incremento de volumen (\%)} = \frac{\text{Volumen después de batido (mL)} - \text{Volumen antes de batido (mL)}}{\text{Volumen antes de batido (mL)}} \times 100$$

6.7.5 Capacidad emulsificante

Para analizar la capacidad emulsionante se siguió la metodología de Yasumatsu *et al.* (1992). Se pesó 1 g de muestra, se añadieron 20 mL de agua destilada y se agitó el contenido por 15 min en vórtex (Vortex Mixer, Labnet International, Inc.). Posteriormente, se ajustó a pH 7 y se llevó a un volumen total de 25 mL agregando agua destilada. Se adicionaron 25 mL de aceite de maíz y nuevamente se agitó el contenido, ahora por 3 min en un homogeneizador (GLH, Omni International, Inc.). La mezcla se centrifugó durante 5 min a 1,300 x g (Hermle Z326, Labnet International, Inc.). Para realizar la determinación de la capacidad emulsionante se realizó la medición del volumen de la capa emulsificada respecto al volumen total y se expresó como porcentaje (Granito *et al.*, 2004).

6.7.6 Densidad aparente

La densidad aparente se determinó de acuerdo al método de Okaka y Potter (1977). Se pesaron 50 g de muestra y se vaciaron en una probeta graduada de 100 mL, la cual se golpeó suavemente contra una superficie horizontal para obtener un volumen constante. Los resultados se expresaron como g/mL de muestra (Siddiq *et al.*, 2010).

6.8 CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN DE FRIJOL (*P. vulgaris*) VAR. PINTO AMERICANO

Se determinó la calidad microbiológica de los productos obtenidos de la fermentación, natural e inducida de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano de acuerdo al método mencionado en las normativas referidas en el punto 6.2.1 y en la NOM-111-SSA1-1994 Bienes y servicios, Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos (DOF, 1995a, 1995b, 1995c; FDA, 1998).

Las muestras se prepararon de acuerdo a lo indicado en la sección 6.2.1 “Microorganismos indicadores”. Posteriormente, se determinaron los microorganismos mesófilos aerobios y coliformes totales como se señala en la misma sección; mientras que para la determinación de hongos y levaduras se siguió la misma técnica de vertido en placa utilizada para los otros indicadores, sin embargo, el agar empleado fue el agar papa dextrosa (PDA) (Difco, Becton and Dickinson) acidificado con ácido tartárico al 10 %. Las placas se incubaron a 25 °C por 5 días, se seleccionaron las placas con 10-150 colonias y los resultados se expresaron como UFC/g de muestra.

RESULTADOS

7.1 FERMENTACIÓN NATURAL

Los microorganismos indicadores y las bacterias ácido lácticas (BAL) durante el proceso de fermentación natural de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano fueron determinados al tiempo inicial y cada 24 h. La Figura 8 muestra que las bacterias ácido lácticas aumentaron 6 log aproximadamente (2.81×10^2 - 1.33×10^8 UFC/g) y los enterococos totales 7 log (1.91×10^1 - 1.72×10^9 UFC/g), mientras que los niveles de los indicadores se mantuvieron estables en el proceso, los mesófilos aerobios de 1.38×10^8 - 3.40×10^8 UFC/g y los coliformes totales de 1.27×10^8 - 9.57×10^7 UFC/g.

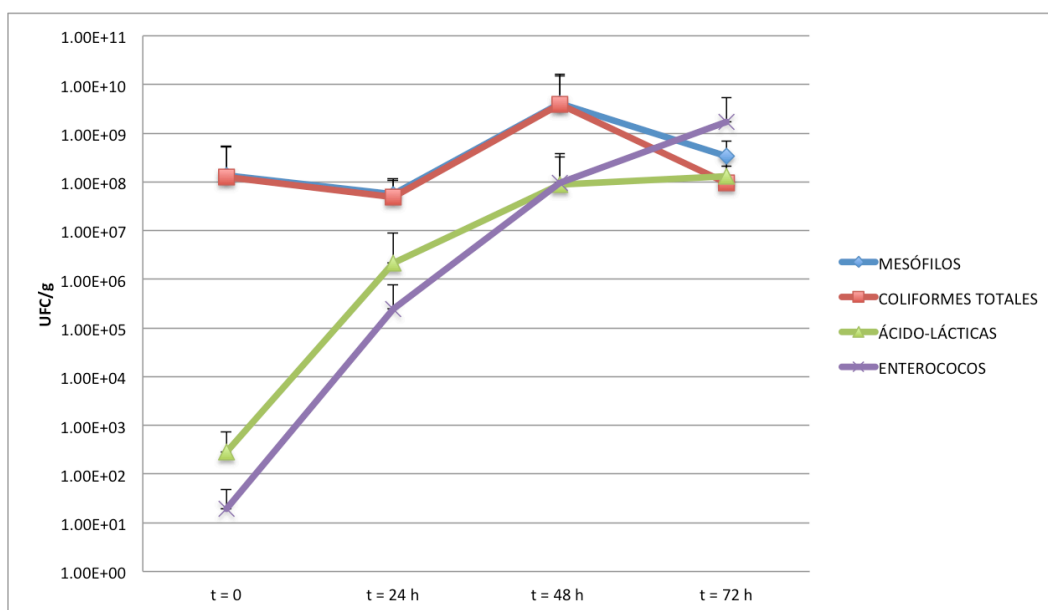


Figura 8. Microorganismos presentes durante la fermentación natural de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano.

El valor de pH monitoreado durante el proceso de fermentación natural fue de 5.64 al inicio y disminuyó a 4.51 al final de la fermentación, con una diferencia

estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el punto final de la fermentación y las primeras 48 h del proceso, según la prueba de Tukey (Figura 9).

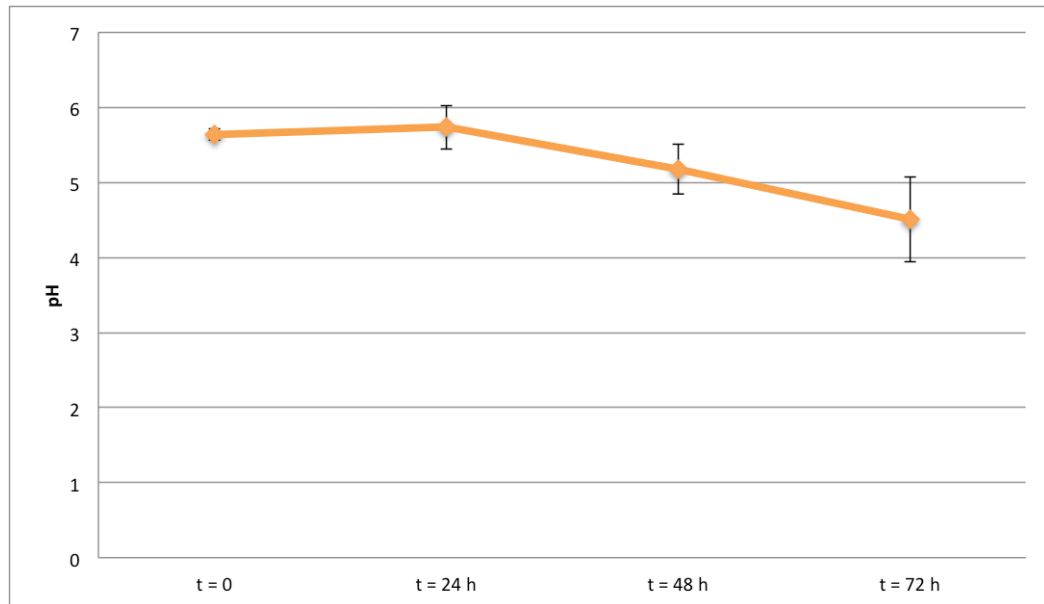


Figura 9. Valores de pH durante la fermentación natural de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano.

En el proceso de fermentación natural con agitación a 140 ciclos/min se encontró que las bacterias ácido lácticas ($1 \times 10^1 - 2 \times 10^1$ UFC/g) y los enterococos ($1 - 1 \times 10^1$ UFC/g) se mantuvieron estables, mientras que los indicadores mesófilos aerobios ($5 \times 10^3 - 1.29 \times 10^8$ UFC/g) y coliformes totales ($1.50 \times 10^3 - 6 \times 10^7$ UFC/g) aumentaron en 5 y 4 log, respectivamente, resultados mostrados en la Figura 10. De acuerdo a estos resultados, se puede determinar que la fermentación con agitación afecta el crecimiento de las bacterias ácido lácticas, lo que derivó en la poca variación del pH, al principio y al final del proceso. Encontrándose valores de 5.89 y de 5.55 respectivamente, sin una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) (Figura 11). Esto nos indicó que para un mejor resultado, es preferible un proceso sin agitación.

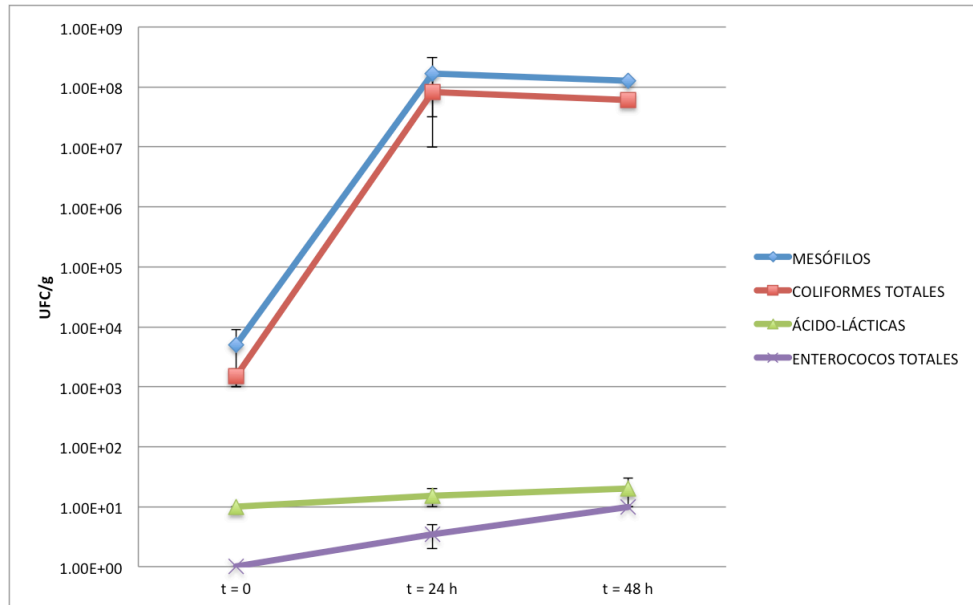


Figura 10. Microorganismos indicadores presentes en la fermentación natural de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano con agitación a 140 ciclos/min.

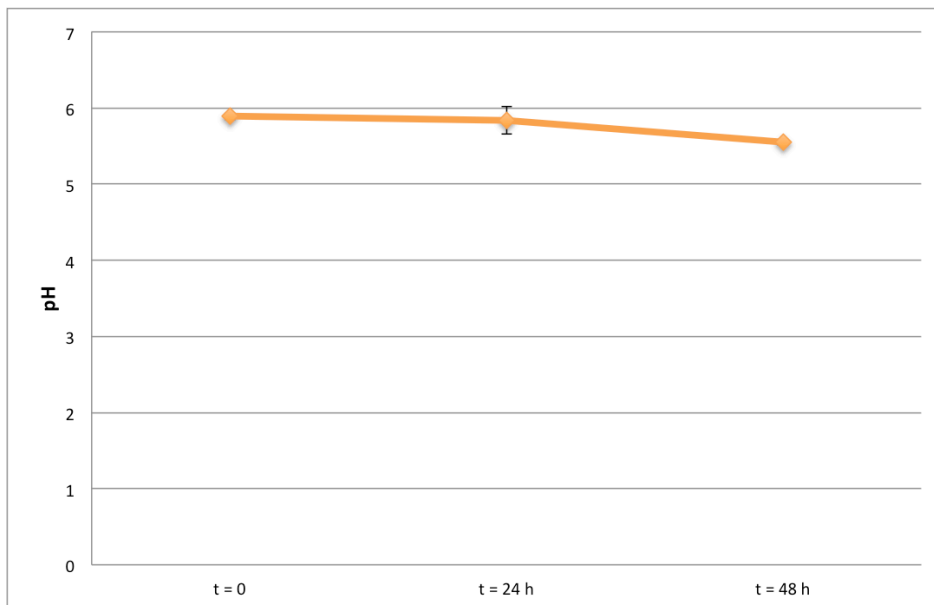


Figura 11. Variación de pH durante la fermentación natural de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano con agitación a 140 ciclos/min.

7.2 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN NATURAL

En la Tabla 3 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas primarias a las que se sometieron las bacterias aisladas en el proceso de fermentación natural de frijol, que indican bacterias de morfología cocoide, Gram positivas (+), fermentadoras, catalasa y oxidasa negativas (-), no móviles.

La morfología de las BAL se encuentra en la Figura 12, donde se muestra una fotografía de tinción de Gram de una muestra. El resultado de una prueba O/F que indica un metabolismo fermentativo de las BAL aisladas se muestra en la fotografía de la Figura 13.

Tabla 3. Pruebas bioquímicas primarias.

Morfología	Gram	Catalasa	Oxidasa	Motilidad	Oxidación/Fermentación (O/F)
Coco	Positivo (+)	Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-)	Fermentativo (F)

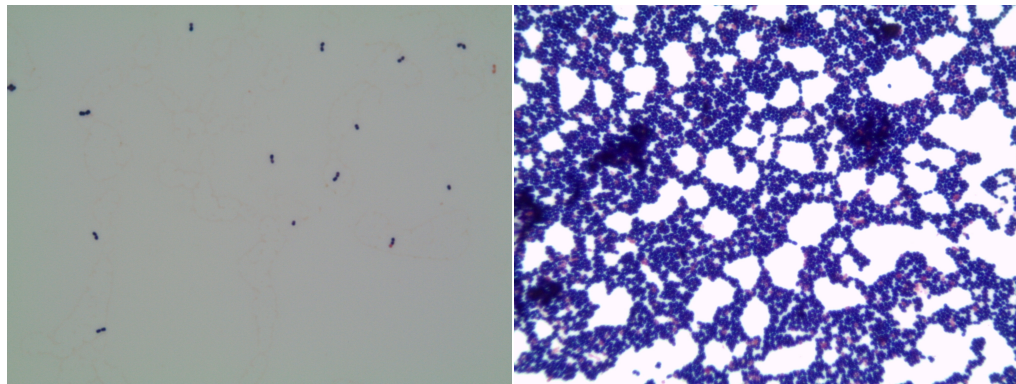


Figura 12. Tinción de Gram de bacterias ácido lácticas (BAL) de procesos de fermentación natural de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano. Resultado que indica una morfología cocoide Gram (+).

La Tabla 4 muestra los resultados de las pruebas bioquímicas de segunda etapa a las que se sometieron las BAL aisladas en el proceso de fermentación natural de frijol (*P.*

vulgaris) var. pinto americano. Estas pruebas se señalan en el manual de Cowan y Steel (1974) de acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas primarias.

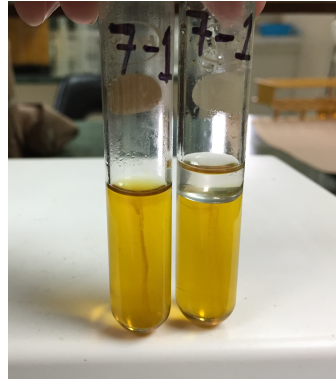


Figura 13. Prueba de O/F que indica un metabolismo fermentativo. Ambos tubos contenían glucosa, la cual fue metabolizada por la BAL con producción de ácido que vira el colorante azul de bromotimol a amarillo. El tubo de la izquierda es sin aceite mineral (oxidación) y el de la derecha con aceite mineral (fermentación).

Las pruebas bioquímicas de segunda etapa indican que se trata de BAL α -hemolíticas o no-hemolíticas (Figura 14), capaces de crecer a 45 °C, sobrevivir a 60 °C por 30 min, capaces de crecer en medios alcalinos (pH 9.6), con capacidad de producir ácido a partir de arabinosa, pero no capaces de producir ácido a partir de glicerol.

Tabla 4. Pruebas bioquímicas de segunda etapa.

Hemólisis	Crecimiento a 45 °C	Sobrevivencia a 60 °C por 30 min	Crecimiento en pH 9.6	Arabinosa (ácido)	Glicerol (ácido)
Alfa / Negativo (α / -)	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)	Negativo (-)

Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas indican que las BAL aisladas en el proceso de fermentación natural de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano pertenecen al género *Enterococcus* y presuntivamente a la especie *Enterococcus faecium*.



Figura 14. Prueba de hemólisis. Placa de agar sangre donde las bacterias ácido lácticas presentan α -hemólisis; en el cuadrante inferior derecho de la placa se observa un resultado negativo para hemólisis.

7.3 FERMENTACIÓN INDUCIDA DEL FRIJOL CON BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Se realizaron distintas pruebas para determinar las condiciones óptimas de fermentación para las bacterias ácido lácticas aisladas en el proceso de fermentación natural para su aplicación en el proceso inducido.

7.3.1 Determinación de condiciones óptimas para BAL

Las pruebas combinadas de temperatura, pH y presencia/ausencia de oxígeno a las que se sometieron las BAL indicaron que las condiciones favorables para su crecimiento y desarrollo son una temperatura de fermentación de 42-45 °C, un pH del medio de fermentación de 5 y una atmósfera con presencia de oxígeno (O₂) o de dióxido de carbono (CO₂). Estos resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de pruebas de condiciones para favorecer el crecimiento de BAL aisladas en fermentación natural. Pruebas realizadas en caldo ICC. Se señalan en sombreado azul las condiciones favorables para la bacteria: 42-45 °C, pH 5 y en O₂ y CO₂.

BAL aislada	T (°C)	pH	O ₂ /CO ₂	Resultado
<i>Enterococcus</i> spp.	42	3	O ₂	-
			CO ₂	-
		4	O ₂	-
			CO ₂	-
		5	O ₂	+
			CO ₂	+
	45	3	O ₂	-
			CO ₂	-
		4	O ₂	-
			CO ₂	-
		5	O ₂	+
			CO ₂	+
	50	3	O ₂	-
			CO ₂	-
		4	O ₂	-
			CO ₂	-
		5	O ₂	-
			CO ₂	-

7.3.2 Sanitización de frijol por tratamiento térmico

La Figura 15 muestra el efecto del tratamiento térmico a 80 °C por 20 min en los niveles de microorganismos indicadores y de BAL presentes en el frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano, previo a la fermentación. Se observa que los niveles de mesófilos aerobios y de coliformes totales son de alrededor de 6 log (2.26 x 10⁶ y 7.66 x 10⁵

UFC/g, respectivamente) antes del tratamiento y de menos de 1 log ($< 1 \times 10^1$ UFC/g) posterior al tratamiento térmico.

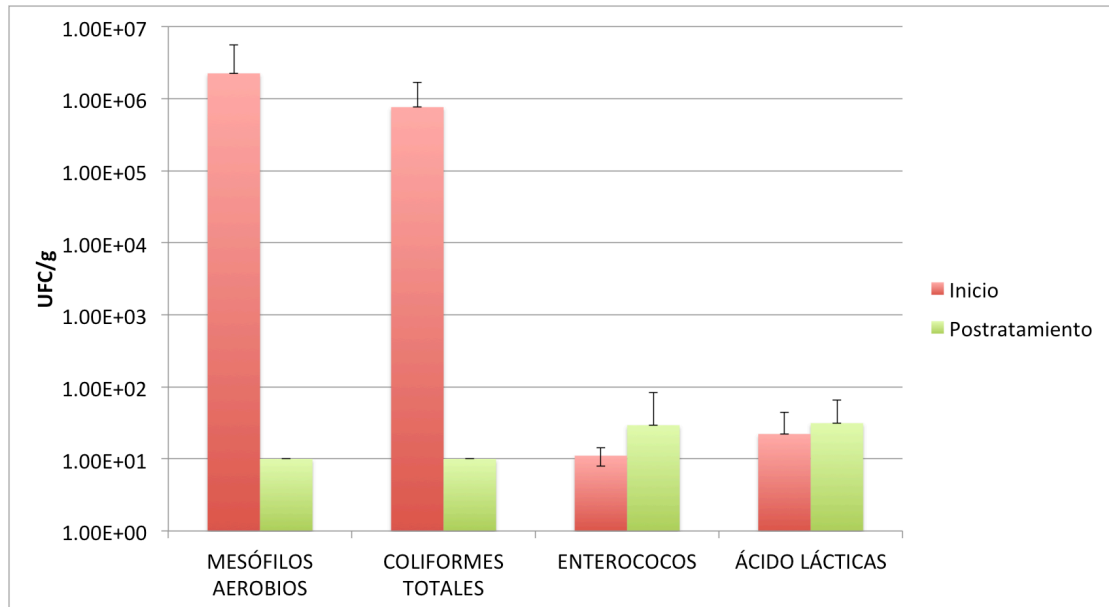


Figura 15. Efecto de tratamiento térmico (80 °C por 20 min) en niveles de microorganismos indicadores y de BAL.

7.3.3 Sanitización de frijol con hipoclorito de sodio 1 % (v/v) y ácido láctico 10 % (v/v)

La Figura 16 muestra el efecto del tratamiento químico de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano con hipoclorito de sodio al 1 % (v/v) y ácido láctico al 10 % (v/v) en los niveles de microorganismos indicadores y de BAL, previo a la fermentación. Se observa que posterior al tratamiento químico, el frijol presenta menos de 1 log ($< 1 \times 10^1$ UFC/g) de mesófilos aerobios, coliformes totales, enterococos totales y BAL.

Es importante señalar que los resultados de menos de 1 log corresponden a que no se observó crecimiento en medio sólido, sin embargo, no se puede reportar como cero debido al factor del límite de detección.

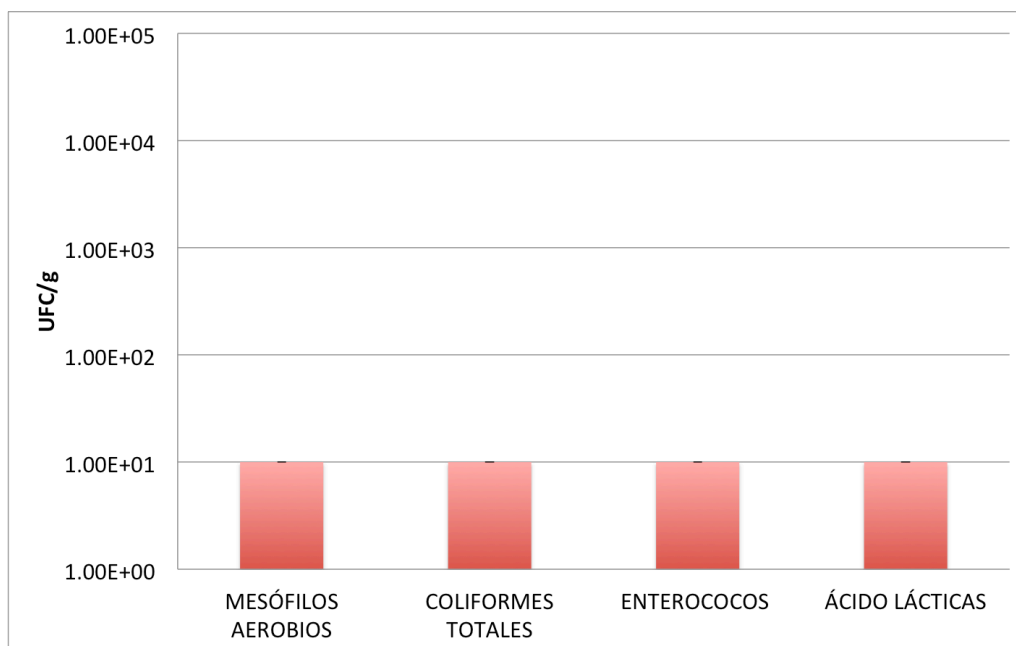


Figura 16. Niveles de microorganismos indicadores y de BAL tras sanitización con hipoclorito de sodio 1 % (v/v) y ácido láctico 10 % (v/v).

7.4 PROCESO FERMENTATIVO INDUCIDO DEL FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) VAR. PINTO AMERICANO

Este proceso se llevó a cabo tanto en frijol entero como en frijol molido. En las Figuras 17 y 20 se muestran los procesos de fermentación inducida por BAL para frijol entero y molido, respectivamente. Las condiciones óptimas quedaron establecidas de acuerdo a los resultados obtenidos en el punto 7.3.1.

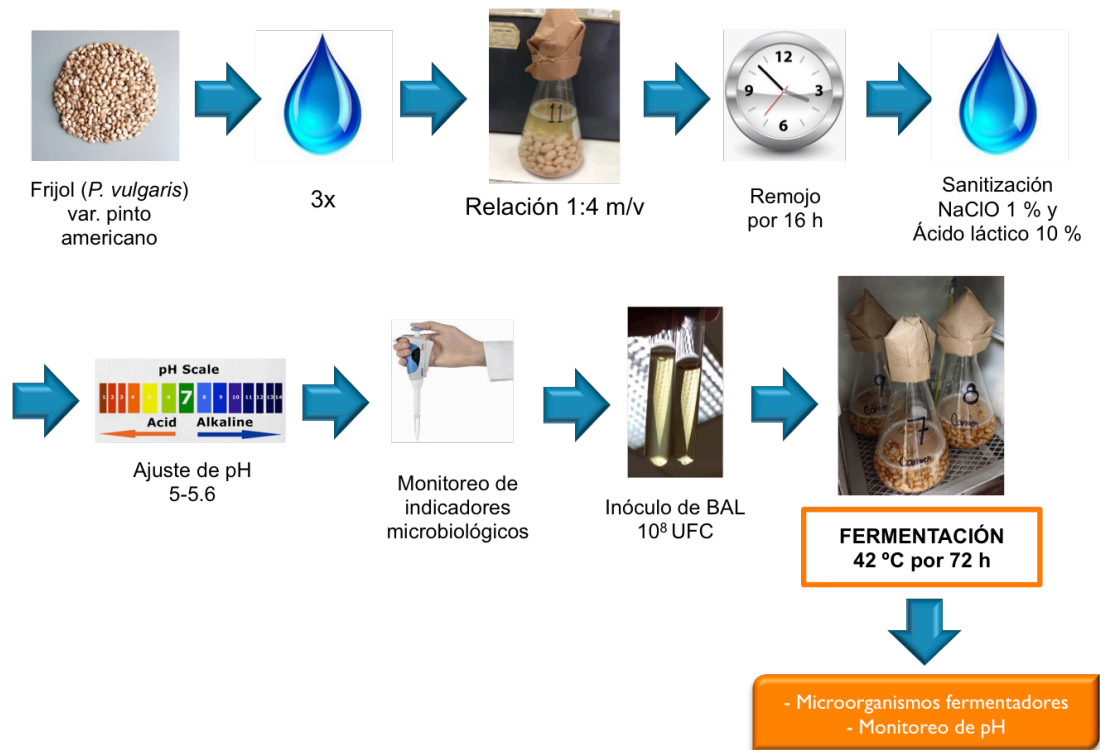


Figura 17. Proceso de fermentación inducida de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano.

En la Figura 18 se encuentran los niveles de BAL monitoreados durante la fermentación inducida de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano entero. Se observa que los niveles de BAL disminuyeron en 0.79 unidades logarítmicas netas manteniendo una cuenta inicial y final de 5.67×10^5 y 9.14×10^4 UFC/g, respectivamente.

Previo a la fermentación inducida, la cuenta total de indicadores (mesófilos aerobios, coliformes totales y enterococos) fue de menos de 1 UFC/g.

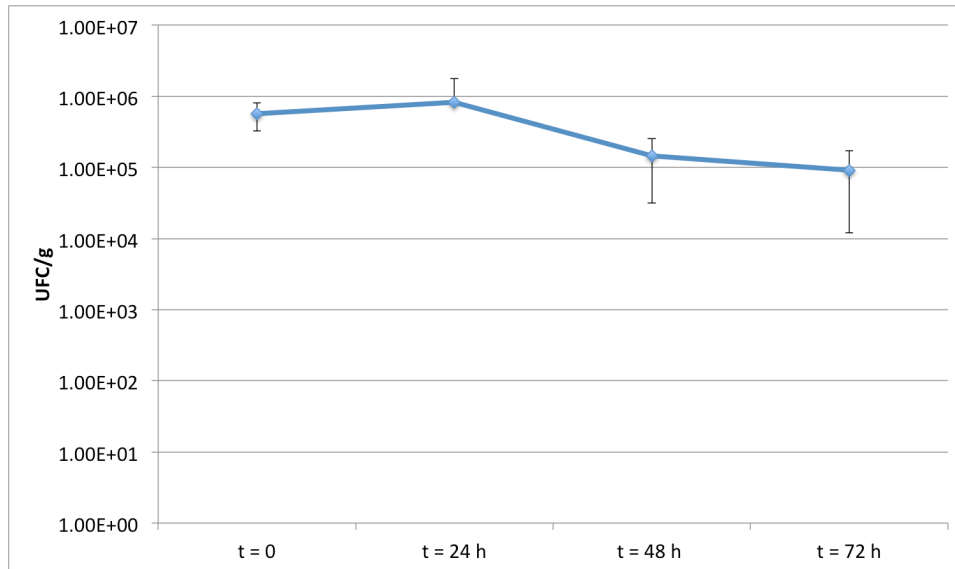


Figura 18. Niveles de BAL durante fermentación inducida de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano entero.

El pH monitoreado durante este proceso varió de 5.37 al inicio a 4.20 al final (Figura 19), ocurriendo una disminución de pH estadísticamente significativa ($p < 0.01$) en las primeras 24 h de la fermentación.

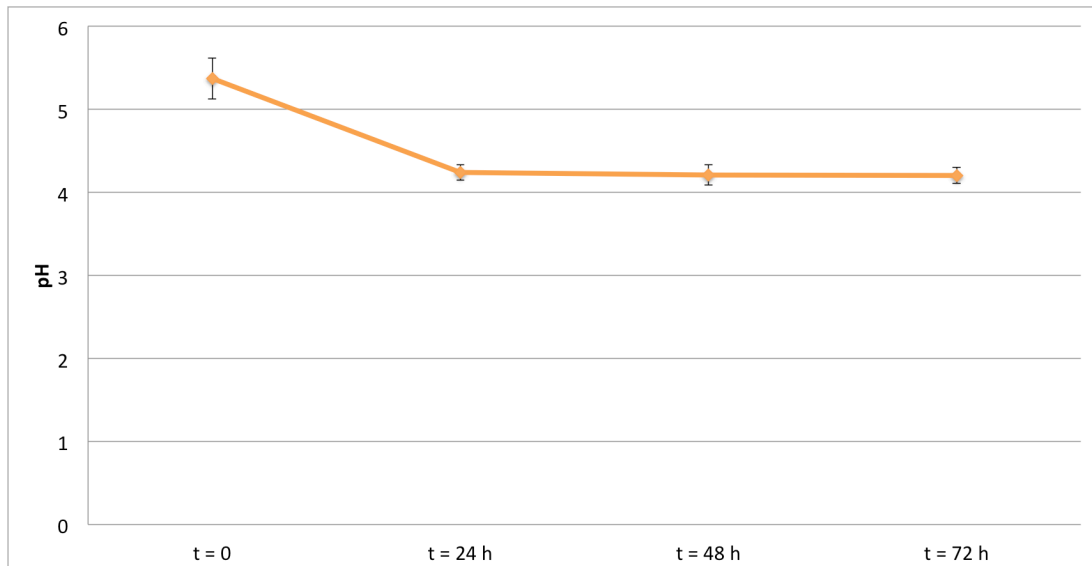


Figura 19. Variación de pH durante la fermentación inducida de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano entero.

El proceso de fermentación inducida para frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano molido (Figura 20) presentó un aumento neto de 1 unidad logarítmica en la población de BAL, presentando una población inicial de 2.05×10^6 y una población final de 2.03×10^7 UFC/g.

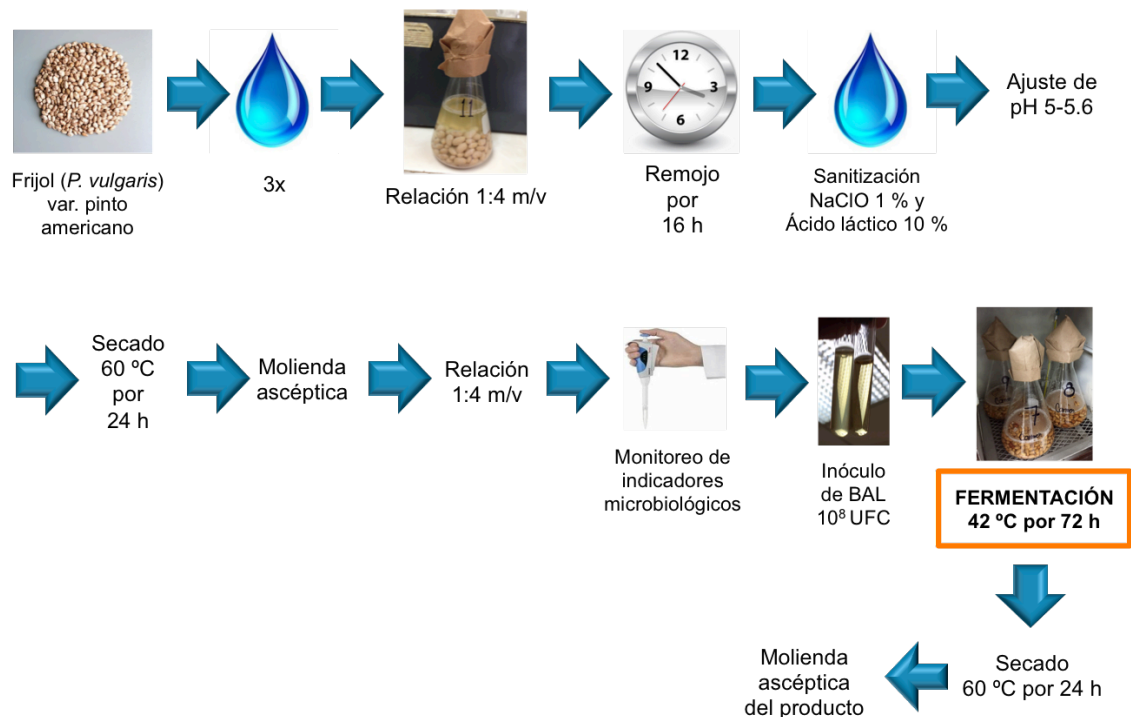


Figura 20. Proceso de fermentación inducida de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano molido.

Esto representa aumento en un 90% de la población (Figura 21). Los resultados del análisis de microorganismos indicadores (mesófilos aerobios, coliformes totales y enterococos) previo a fermentación fue de menos de 1 UFC/g.

El pH monitoreado durante este proceso disminuyó de 5.97 a 4.52 (Figura 22), ocurriendo una disminución de pH estadísticamente significativa ($p < 0.01$) en las primeras 24 h de la fermentación.

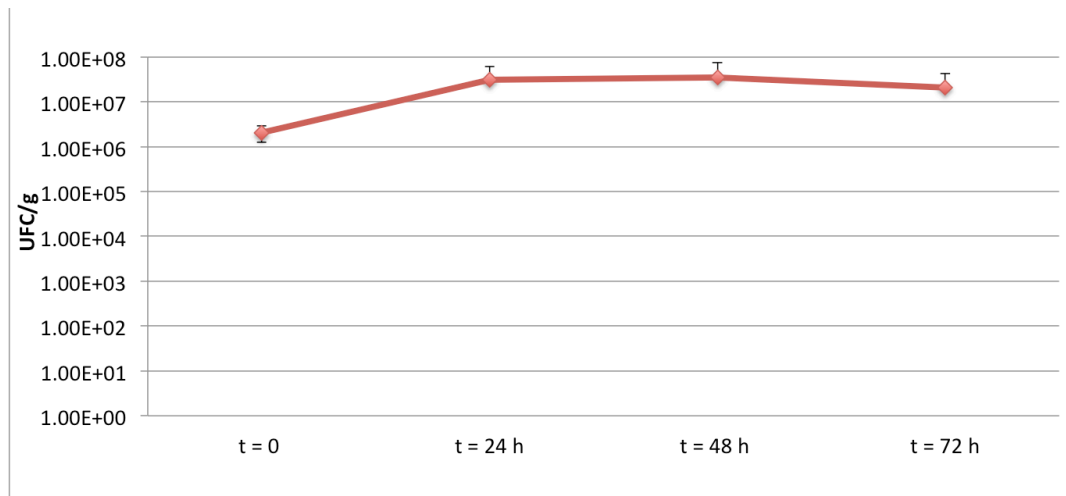


Figura 21. Niveles de BAL durante fermentación inducida de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano molido.

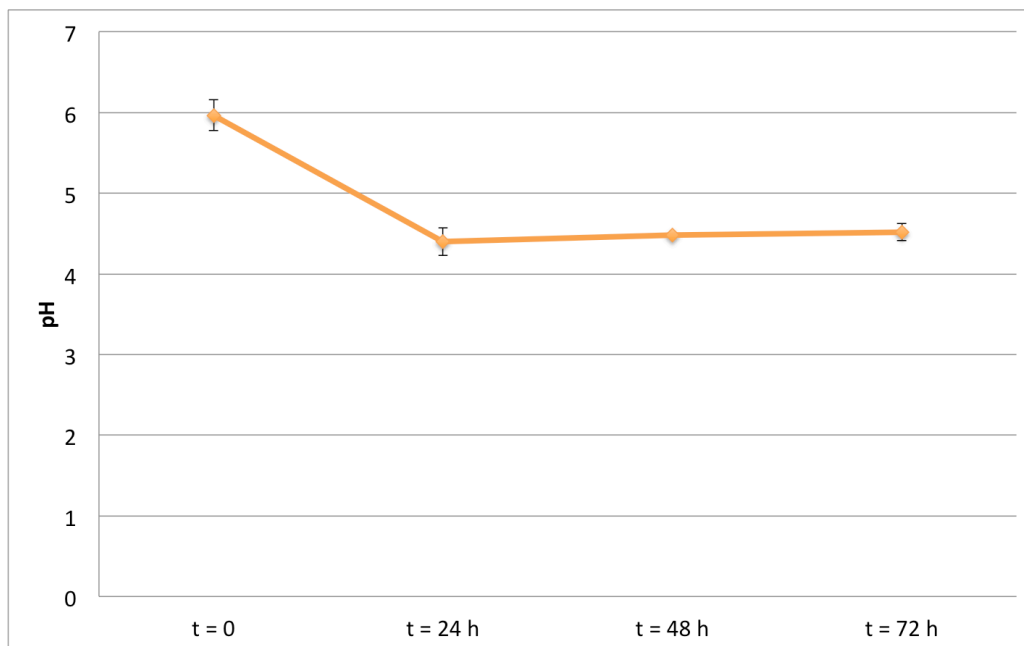


Figura 22. Variación de pH durante la fermentación inducida de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano molido.

Estos resultados demostraron que la fermentación inducida con frijol molido, promueve un mayor crecimiento de BAL y, por lo tanto, presenta una disminución

mayor del pH; mientras que la fermentación del frijol entero, no promovió el crecimiento y por lo tanto la disminución del pH fue menor.

7.5 ANÁLISIS QUÍMICO-NUTRICIONAL

Las muestras de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano sin procesar y de frijol fermentado fueron evaluadas nutricionalmente.

7.5.1 Análisis proximal

En la Tabla 6 se muestra la composición proximal y de fibra dietética total, soluble (FDS) e insoluble (FDI) de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano. En la proteína hubo un aumento significativo ($p < 0.05$) al procesar el frijol por fermentación natural, pero no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) al procesarlo por fermentación inducida con BAL.

La proteína aumenta (18.90 a 20.89 %) significativamente ($p < 0.05$) en la fermentación natural de frijol, sin embargo, en la fermentación inducida no ocurrieron cambios estadísticamente significativos ($p > 0.05$). En cambio, entre la fermentación natural (20.89 % de proteína) y la fermentación inducida (18.93 % de proteína) de frijol molido sí se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$).

La ceniza disminuyó (4.13 a 2.10 %) significativamente ($p < 0.05$) en la fermentación natural de frijol. En el extracto etéreo del frijol no ocurrieron cambios estadísticamente significativos ($p > 0.05$).

Las determinaciones de fibra dietética y de carbohidratos disponibles se realizaron por duplicado, por lo que no se expresan sus desviaciones estándar (DE).

Tabla 6. Composición proximal y fibra dietética total, insoluble (FDI) y soluble (FDS) de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano. Resultados expresados en porcentaje (%) en base seca.

<i>Determinación</i>	<i>Tratamientos</i>				
	Sin fermentar + remojo	Fermentación natural	Sin fermentar + sanitización con NaClO 1 % y ácido láctico 10 %	Fermentación inducida	Fermentación inducida en frijol molido
Ceniza	4.13 ± 0.35c	2.10 ± 0.28b	1.58 ± 0.05a	1.33 ± 0.05a	1.65 ± 0.05a
Extracto Etéreo	2.32 ± 0.35a	2.03 ± 0.30a	2.07 ± 0.75a	1.99 ± 0.11a	2.22 ± 0.54a
Proteína	18.90 ± 1.70a	20.89 ± 0.21b	20.60 ± 0.55ab	19.36 ± 0.93ab	18.93 ± 0.57a
Fibra Dietética Total	40.05	41.13	44.14	44.49	34.60
FDI	37.13	36.09	43.51	45.37	36.75
FDS	2.92	5.04	0.63	0.00	2.15
Carbohidratos disponibles	34.60	33.85	31.61	32.83	42.59

Los resultados que tienen la misma letra indican que son estadísticamente semejantes.

7.5.2 Digestibilidad *in vitro* de la proteína

En el fermentado natural aumentó en 36.12 % la digestibilidad *in vitro* del frijol var. pinto americano; el frijol fermentado entero inducido, la aumentó en 84.90 % y el frijol fermentado molido presentó un aumento de 128.74 % en la digestibilidad *in vitro* de la proteína del frijol var. pinto americano.

Tabla 7. Porcentajes de digestibilidad proteica *in vitro* y de proteína digerible en frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano con distintos tratamientos. Resultados expresados en porcentaje (%) \pm DE.

Tratamiento	Sin fermentar + remojo	Fermentación natural	Sin fermentar + sanitización con NaClO 1 % y ácido láctico 10 %	Fermentación inducida	Fermentación inducida en frijol molido
<i>Digestibilidad (%)</i>	23.31 \pm 4.92a	31.73 \pm 0.16b	37.48 \pm 1.75bc	43.10 \pm 4.59c	53.32 \pm 2.38d
<i>Proteína digerible (%)</i>	4.40	6.63	7.72	8.34	10.1

Los resultados que tienen la misma letra indican que son estadísticamente semejantes.

7.6 PROPIEDADES TECNOFUNCIONALES

Se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos para las propiedades funcionales, excepto para absorción de aceite ($p > 0.05$) y gelificación (+, -, +/-), que sólo se expresa cualitativamente.

La absorción de agua y la capacidad emulsificante fueron las propiedades tecnofuncionales mejoradas significativamente ($p < 0.05$) con los procesos de fermentación (natural e inducida por BAL); la capacidad espumante disminuyó significativamente ($p < 0.05$) tras las fermentaciones. Resultados mostrados en Tabla 8.

Tabla 8. Propiedades tecnofuncionales de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano con distintos tratamientos. Resultados expresados en porcentaje (%) \pm Desviación Estándar. Menor Concentración de Gelificación (MCG): la menor concentración de la muestra a la cual esta no se desliza o no se cae en tubo de prueba invertido.

Propiedades tecnofuncionales	Tratamiento				
	Sin fermentar + remojo	Fermentación natural	Sin fermentar + sanitización con NaClO 1 % y ácido láctico 10 %	Fermentación inducida	Fermentación inducida en frijol molido
Absorción de Agua (mL/g)	1.02 \pm 0.08a	2.25 \pm 0.25b	1.98 \pm 0.21b	3.03 \pm 0.09c	2.27 \pm 0.21b
Absorción de Aceite (mL/g)	1.28 \pm 0.24a	1.17 \pm 0.23a	1.28 \pm 0.16a	1.03 \pm 0.23a	1.07 \pm 0.29a
Capacidad Emulsificante (%)	79.36 \pm 1.53a	81.31 \pm 0.13b	83.02 \pm 0.88c	82.16 \pm 0.71bc	82.06 \pm 0.84bc
Capacidad Espumante (%)	18.13 \pm 1.85b	1.33 \pm 2.07a	1.00 \pm 1.67a	0.00 \pm 0.00a	1.99 \pm 1.79a
Densidad Aparente (g/mL)	0.84 \pm 0.003ab	0.83 \pm 0.0002ab	0.85 \pm 0.02b	0.84 \pm 0.01ab	0.82 \pm 0.02a
Gelificación (MCG en %)	14	14	16	12	16

7.7 CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN DE FRIJOL (*P. vulgaris*) VAR. PINTO AMERICANO

Los análisis de microorganismos indicadores fueron llevados a cabo en el producto final obtenido de los diferentes procesos fermentativos. Para el producto obtenido por fermentación natural se obtuvieron 1.20×10^7 UFC/g de mesófilos aerobios, 1.30×10^4 UFC/g de coliformes totales y de 50 UFC/g de mohos y levaduras (Figura 23).

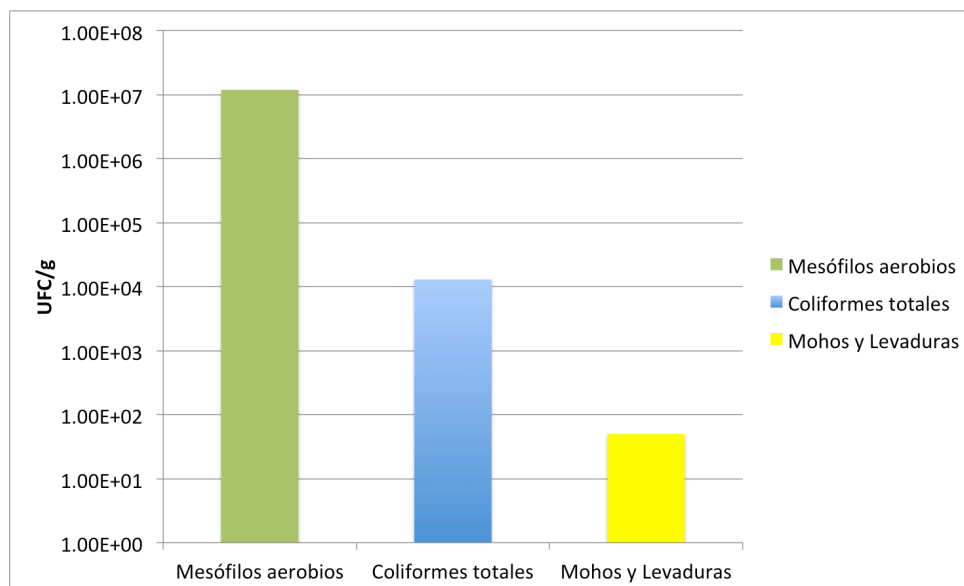


Figura 23. Microorganismos indicadores en frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano procesado por fermentación natural.

Los niveles de microorganismos indicadores en el producto obtenido de la fermentación inducida de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano entero, fueron de 5.50×10^2 UFC/g de mesófilos aerobios, 10 UFC/g de coliformes totales y de 29 UFC/g de mohos y levaduras (Figura 24); presentando una disminución en comparación con el fermentado natural.

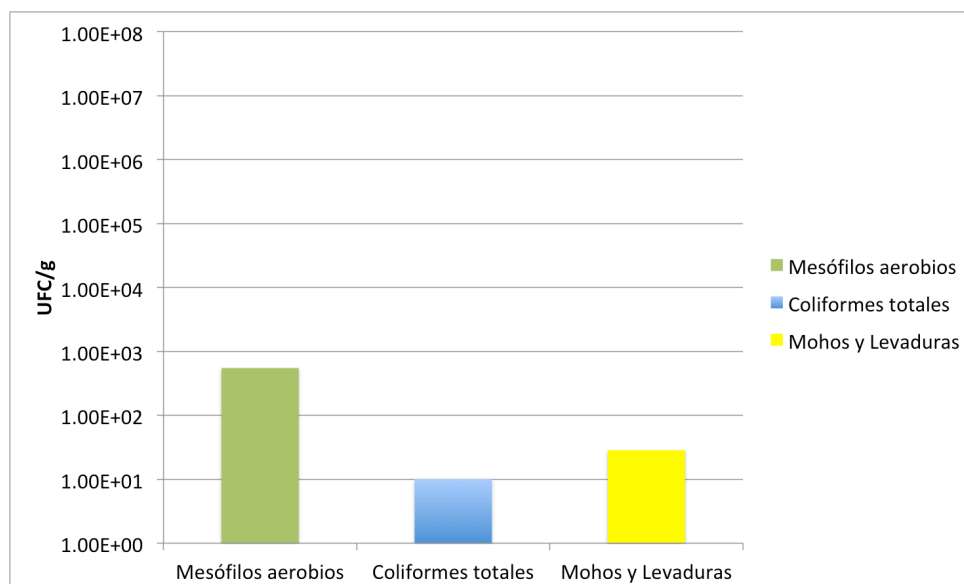


Figura 24. Microorganismos indicadores en frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano procesado por fermentación inducida por BAL.

Los niveles de microorganismos indicadores en el producto obtenido de la fermentación inducida del frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano molido se cuantificaron en 3.50×10^2 UFC/g de mesófilos aerobios, 10 UFC/g de coliformes totales y de 30 UFC/g de mohos y levaduras (Figura 25), manteniéndose en el mismo nivel que el producto fermentado entero.

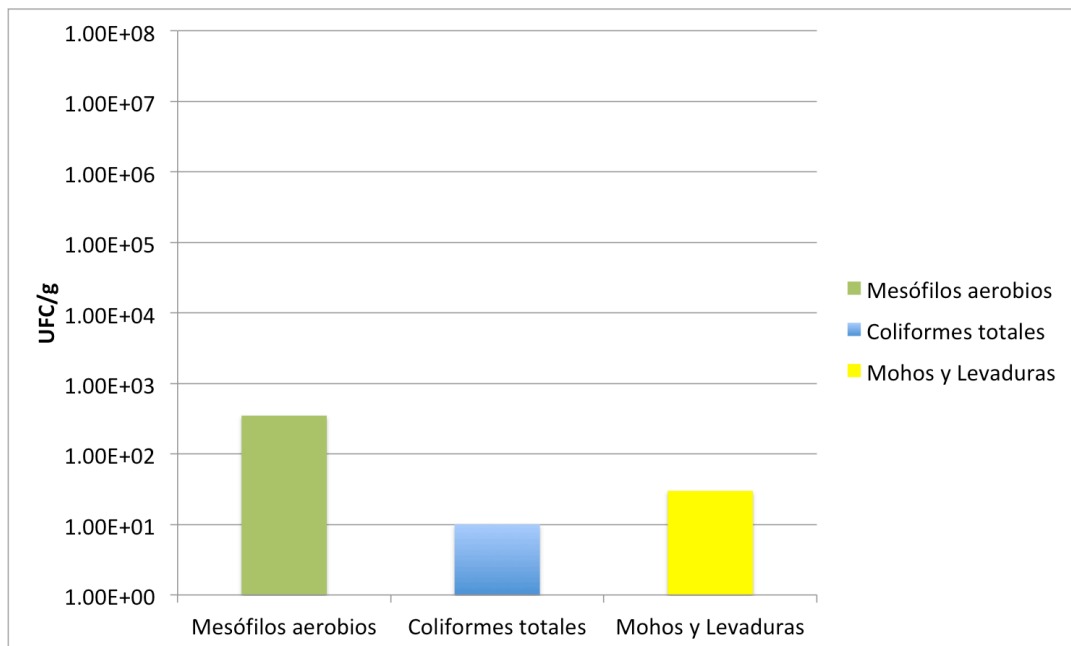


Figura 25. Microorganismos indicadores en frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano molido y procesado por fermentación inducida por BAL.

DISCUSIÓN

8.1 FERMENTACIÓN NATURAL

Los resultados de esta investigación, coinciden con lo reportado por Granito y Álvarez (2006), quienes encontraron mayor cantidad de coliformes totales (62 %) que de lactobacilos (36 %) en la población total de microorganismos tras fermentación natural frijol negro (*P. vulgaris* var. L-140) a 42 °C por 48 h.

La disminución de pH encontrada en la fermentación natural, fue de 20%, a diferencia de lo reportado por Porres *et al.* (2003), quienes reportan una disminución de pH de 30 % en fermentación natural de *P. vulgaris* L. var. Carrilla. Esto pudiera deberse al aumento de la población de coliformes y mesófilos, que pueden actuar como competidores y limitar el crecimiento de BAL y por lo tanto, la producción de ácido láctico (Chelule *et al.*, 2010).

Con respecto a los resultados obtenidos en el proceso de fermentación natural con agitación a 140 ciclos/min (Figuras 10 y 11), se evidenció que la agitación no fue favorable para el crecimiento de las BAL, esto fue debido a que las BAL son anaerobias, por lo que se recomienda una fermentación natural sin aireación (Porres *et al.* 2003; Martín-Cabrejas *et al.* 2004).

8.2 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN NATURAL

Se ha reportado que, de acuerdo a la morfología que presentaron los aislados de fermentación, las bacterias presentes en el proceso de fermentación natural podían pertenecer a alguno de los siguientes géneros: *Leuconostoc*, *Streptococcus*,

Enterococcus, *Pediococcus* y *Micrococcus*, entre otros (Granito y Álvarez, 2006; Chelule *et al.*, 2010). En este trabajo, según los resultados arrojados por las pruebas bioquímicas primarias y de segunda etapa, el género prevaleciente correspondió a *Enterococcus* spp. y presuntivamente a la especie *Enterococcus faecium* (Cowan y Steel, 1974). No se encontraron otros géneros en el proceso de fermentación natural, esto podría estar influenciado por varios factores, como tipo de frijol, cultivo, proceso de lavado, etc.

8.3 CONDICIONES ÓPTIMAS DE FERMENTACIÓN PARA LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Los resultados obtenidos de las pruebas realizadas a las BAL aisladas del proceso fermentativo natural (Tabla 5), señalan que las condiciones óptimas de temperatura fueron 42 y 45°C en presencia de O₂ y CO₂, con un pH de 5. A pesar de que a pH 4 no se presentó crecimiento, el pH final de la fermentación siempre es menor a 5 en el medio (Chelule *et al.*, 2010), como se observa en las Figura 9 con la fermentación natural, donde el pH fue de 4.51.

El tratamiento térmico aplicado (80 °C por 20 min) para la sanitización del frijol antes de inducir el proceso fermentativo, logró reducir significativamente los niveles de coliformes totales y mesófilos aerobios hasta en 5 log mientras que las poblaciones de enterococos y BAL permanecieron constantes (Figura 15). Un tratamiento de 80 °C por 20 min o más permite destruir las formas vegetativas de las bacterias y toxinas que pudieran estar presentes (Casp y Abril, sf) en el frijol, sin embargo este tratamiento puede dañar la proteína del frijol, por lo que se probó un tratamiento químico de sanitización. El tratamiento químico de sanitización aplicado con NaClO 1 % y ácido láctico 10 % logró reducir los niveles de coliformes totales, mesófilos aerobios, enterococos y bacterias ácido lácticas a menos de 1 log (Figura 16), lo cual es favorable para utilizar el frijol en un proceso de fermentación inducida, tras la sanitización.

8.4 FERMENTACIÓN INDUCIDA DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) VAR. PINTO AMERICANO

El pH inicial para los procesos de fermentación inducida de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano se ajustó a un rango de 5-5.64 debido a que según las pruebas de viabilidad realizadas a distintos valores de pH (3, 4 y 5) la BAL crece a pH 5 (Tabla 5), además que en los procesos de fermentación natural de los cuales se aisló la bacteria fermentadora, el pH inicial fue de 5.64 en promedio (Figura 9). Al final de la fermentación inducida, el pH fue de 4.20, debido a la producción de ácido láctico (Chelule *et al.*, 2010).

El proceso de fermentación inducida con BAL en frijol molido mostró un mejor desempeño que en el frijol entero, ya que los niveles de BAL en el frijol entero disminuyeron en 0.79 unidades logarítmicas durante el proceso, mientras que en el frijol molido aumentaron 1 unidad logarítmica, que representa un aumento en el 90% de la población de BAL (Figuras 18 y 21). Las poblaciones presentes en los procesos fermentativos fluctuaron entre 6 y 7 log, niveles similares a los reportados por Pérez y Granito (2012) durante la fermentación inducida de la leguminosa *Dolichos lablab* con las bacterias *Streptococcus salivarius* sub *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* sub *bulgaricus*.

La mayor disminución en el pH se encontró en el proceso inducido en frijol molido ($p < 0.05$), mientras que una disminución menor se encontró en el entero (Figuras 19 y 22). Esto debido a que el crecimiento se vio favorecido en el frijol molido, y con ello ocurrió una producción mayor de ácido láctico. La fermentación usualmente se asocia con la disminución del pH, debido a la producción de ácidos orgánicos que son inherentes al proceso (Chelule *et al.*, 2010).

8.5 ANÁLISIS QUÍMICO-NUTRICIONAL

Las muestras de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano sin procesar y de frijol fermentado fueron evaluadas nutricionalmente.

8.5.1 Análisis proximal

En la proteína, hubo un aumento significativo ($p < 0.05$) al procesar el frijol por fermentación natural, pero no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) al procesarlo por fermentación inducida con BAL. Anteriormente, se ha reportado que la proteína total de las harinas fermentadas no se afecta significativamente tras la fermentación (Martín-Cabrejas *et al.*, 2004) o aumenta ligeramente (Tabera *et al.*, 1995).

Se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el contenido de proteína entre el frijol fermentado naturalmente y el frijol molido y fermentado por BAL, a diferencia de lo reportado por Pérez y Granito (2012), quienes informan una reducción en el contenido de cenizas y de proteína tras procesos de fermentación natural e inducida de la leguminosa *Dolichos lablab*. En el presente trabajo encontramos una reducción significativa ($p < 0.05$) de cenizas sólo al procesar el frijol var. pinto americano por fermentación natural.

El contenido de grasa permaneció sin cambios significativos ($p > 0.05$) tras las fermentaciones, al igual que lo reportado por Granito *et al.* (2004).

8.5.2 Digestibilidad *in vitro* de la proteína

La digestibilidad *in vitro* de la proteína aumenta tras las fermentaciones natural e inducida por BAL. El aumento en la digestibilidad *in vitro* de frijol y otras leguminosas ha sido reportado en investigaciones anteriores (Granito *et al.*, 2002; Granito y Álvarez, 2006; Shimelis y Rakshit, 2008; Pérez y Granito, 2012).

Han sido reportados menores incrementos de digestibilidad proteica *in vitro*, de 12.55 % en fermentación de frijol cocido (Granito y Álvarez, 2006) y de 51-83.3 % en fermentación natural de mijo perla por 72 h a 30 °C.

En el presente estudio, el fermentado natural aumentó en 36.12 % la digestibilidad *in vitro* de la proteína y en 50.68 % la proteína digerible del frijol var. pinto americano; mientras que el fermentado producido por BAL aumentó estos valores en 84.90 % (digestibilidad) y en 89.54 % (proteína digerible); y la molienda del frijol previo a ser fermentado por BAL permitió un aumento de digestibilidad de 128.74 % y de la proteína digerible un aumento de 129.54 %. Estos resultados son superiores a los reportados en los estudios mencionados.

A pesar de que no hay aumento significativo en la cantidad de proteína por el proceso de fermentación natural, al mejorar la digestibilidad de ésta se logra un incremento en la cantidad de proteína digerible del 50.68 % en la fermentación natural; el proceso de sanitización ya mejora la digestibilidad substancialmente (60.79 %), por lo que el incremento en la digestibilidad logrado en la fermentación inducida se debe en parte al efecto de la operación de santización, que emplea hipoclorito de sodio (1 %, v/v) y ácido láctico (10 %, v/v). El mecanismo de acción del hipoclorito de sodio es que actúa oxidando e hidrolizando proteínas, rompiendo así enlaces peptídicos y de esta forma disolviendo las proteínas (Sánchez-Ruiz, 2009; Porcel de Fernández *et al.*, 2013); el mecanismo de acción del ácido láctico es la desnaturalización de las proteínas por un cambio en el pH, lo que puede ocasionar modificaciones importantes en su conformación alterando la estructura nativa (Badui Dergal, 2006).

Debido al elevado valor nutricional de la proteína del frijol, sus harinas pueden ser procesadas por fermentación y ser empleadas como sustituto en algunos alimentos para personas celiacas (Romano *et al.*, 2015) u otros individuos.

8.6 PROPIEDADES TECNOFUNCIONALES

La absorción de agua y la capacidad emulsificante fueron mejoradas significativamente ($p < 0.05$) con los procesos de fermentación (natural e inducida por BAL); la capacidad espumante disminuyó significativamente ($p < 0.05$) tras las fermentaciones.

La propiedad de absorción de agua fue mejorada significativamente ($p < 0.05$) con los procesos de fermentación (natural e inducida por BAL). La fermentación aumenta la capacidad de absorción de agua; la capacidad para absorber agua es una propiedad funcional de las proteínas fundamental en alimentos viscosos (sopas, salsas, masas y productos horneados) productos donde se requiere una buena interacción proteína-agua (Granito *et al.*, 2004).

El tratamiento térmico húmedo desnatura las proteínas; esta desnaturación incrementa la accesibilidad a dicha proteína y en consecuencia a los aminoácidos polares, los cuales tienen una gran afinidad por el agua, produciéndose un incremento en la capacidad para absorber agua (Enwere *et al.*, 1998).

La capacidad emulsificante también fue una propiedad funcional mejorada significativamente ($p < 0.05$) con el proceso de fermentación. La capacidad de emulsificación es un parámetro importante en el desarrollo de formulaciones de productos de panificación, mantequilla, margarina, mayonesa, productos untables, aderezos para ensaladas, helados y otros postres congelados y embutidos (Badui Dergal, 2006; Siddiq *et al.*, 2010; García *et al.*, 2012).

La conformación nativa de las proteínas globulares presentes en los granos, donde los aminoácidos polares están expuestos hacia la fase acuosa, favorece la solubilidad y la emulsificación (Kinsella, 1976). A pesar de que la estructura compacta y rígida de las globulinas, principal fracción proteica de frijol (Enwere *et al.*, 1998) no las hace proteínas con un buen potencial para funciones emulsificantes y espumantes (Sathe,

2002), los resultados obtenidos indican que los procesos de fermentación mejoran la propiedad de emulsificación.

La desnaturalización parcial (desenrollamiento) de las proteínas (por ejemplo, en los procesos de fermentación) suele mejorar las propiedades emulgentes, debido al incremento de la flexibilidad molecular y de la hidrofobia superficial (Fennema, 2000).

En cuanto a la capacidad espumante, anteriormente ya se ha reportado disminución de esta propiedad funcional en harinas de frijol y otras leguminosas, en procesos de fermentación natural y procesamiento térmico húmedo. Esto puede deberse a la desnaturalización proteica en estos procesos que, adicionalmente al método de generación de espuma (batido a altas velocidades), puede disminuir el poder espumante de las harinas de frijoles tratadas por la agregación y precipitación de las proteínas (Fennema, 2000; Granito *et al.*, 2004). Otros autores han reportado efectos negativos de los tratamientos térmicos sobre la capacidad espumante (Yasumatsu *et al.*, 1972; Aguilera-Gutiérrez, 2009).

La fermentación aumenta el potencial de uso de este ingrediente en el desarrollo de los alimentos mencionados.

8.7 CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN DE FRIJOL (*P. vulgaris*) VAR. PINTO AMERICANO

El frijol fermentado naturalmente presentó 1.20×10^7 UFC/g de mesófilos aerobios, 1.30×10^4 UFC/g de coliformes totales y de 50 UFC/g de mohos y levaduras (Figura 23); el fermentado obtenido por proceso inducido del frijol entero presentó 5.50×10^2 UFC/g de mesófilos aerobios, 10 UFC/g de coliformes totales y de 29 UFC/g de mohos y levaduras (Figura 24); mientras que el fermentado a partir del frijol molido presentó 3.50×10^2 UFC/g de mesófilos aerobios, 10 UFC/g de coliformes totales y de 30 UFC/g de mohos y levaduras (Figura 25).

Los resultados del análisis de calidad microbiológica de esta investigación, indican que las harinas de frijol obtenidas por fermentación inducida son seguras para su uso en productos alimenticios, puesto que los niveles de indicadores microbiológicos están dentro de los límites permisibles señalados en la NOM-187-SSA1/SCFI-2002 para harinas para tortillas de trigo e integrales (100-500 UFC/g de coliformes totales) y en la NOM-247-SSA1-2008 para harinas de cereales, sémolas o semolinas (50,000 – 500,000 UFC/g de mesófilos aerobios; 50-100 UFC/g de coliformes totales; 100-1,000 UFC/g hongos) (DOF, 2003, 2009).

La harina obtenida por fermentación natural no cumple con las especificaciones de estas normativas, excepto para hongos y levaduras, esto se debe a que la fermentación natural involucra la microbiota total presente en el frijol y durante el proceso aumentan las poblaciones de mesófilos aerobios y de coliformes totales.

CONCLUSIONES

Los microorganismos presentes en fermentación natural de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano fueron mesófilos aerobios ($> 8 \log$ UFC), coliformes totales (8 log UFC), enterococos (9 log UFC) y bacterias ácido lácticas (8 log UFC).

El microorganismo presente en la fermentación natural fue *Enterococcus* spp.

La fermentación inducida, tiene mejores resultados cuando se realiza en el frijol molido.

La sanitización del frijol, tanto por el método térmico como por el método de hipoclorito y ácido láctico, es efectiva para la eliminación de microorganismos indicadores.

La fermentación, natural e inducida por bacterias ácido lácticas, de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano mejora las propiedades funcionales de absorción de agua y capacidad emulsificante, pero disminuye la capacidad espumante del mismo. Las modificaciones en estas propiedades funcionales permitiría aplicar las harinas fermentadas en el desarrollo de nuevos productos de panificación o sopas para mejorar su contenido proteico.

La composición proximal y la fibra dietética son alteradas al someter el frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano a procesos de fermentación, natural e inducida por acción de bacterias ácido lácticas. El contenido proteico no fue afectado significativamente en la fermentación inducida por la bacteria ácido láctica *Enterococcus* spp., pero sí se logró un aumento significativo tras la fermentación natural, y lo más importante, el aumento en la digestibilidad *in vitro* de las harinas fermentadas.

La calidad microbiológica de los productos de fermentación inducida de frijol es adecuada, y es necesario monitorear los parámetros de microorganismos indicadores previo a la adición de las harinas fermentadas como ingredientes en alimentos.

PERSPECTIVAS

El proceso de fermentación láctica desarrollado y estandarizado en esta investigación produjo resultados favorables al aumentar la digestibilidad *in vitro* de la proteína y, por lo tanto, la proteína digerible de frijol (*P. vulgaris*) var. pinto americano. Por lo anterior, se recomienda aplicar este bioproceso en otras variedades de frijol o en otras leguminosas, para después evaluar sus efectos frente a otros métodos como germinación o cocción en la composición proximal y digestibilidad *in vitro* de la proteína. Además, es aconsejable la evaluación de la digestibilidad *in vivo* al aplicar este proceso.

Es conveniente realizar un modelo automatizado para optimizar tiempo y recursos, para conocer la viabilidad a una escala industrial, ya que las principales desventajas experimentadas fueron los tiempos de procesamiento, uso de recursos y reactivos, además de mayor riesgo de contaminación (puntos críticos) al ser un método completamente manual.

En este trabajo se obtuvieron harinas fermentadas de frijol y pueden hacerse pruebas para fermentar mezclas de cereales con leguminosas con *Enterococcus* spp. para tener una harina mixta y lista para ser empleada en productos alimenticios, en vez de sólo agregar la harina fermentada de frijol a una harina de cereal. Por último, dando continuidad directa al presente proyecto, se pueden evaluar las modificaciones que ocurren a la proteína del frijol var. pinto americano a nivel molecular.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdullaev F, González de Mejía E. 1997. Actividad antitumoral de compuestos naturales: lectinas y azafrán. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 47:195-202.
- Aguilera Y, Estrella I, Benitez V, Esteban RM, Martín-Cabrejas MA. 2011. Bioactive phenolic compounds and functional properties of dehydrated bean flours. *Food Research International* 44:774-780.
- Aguilera-Gutiérrez Y. 2009. Harinas de leguminosas deshidratadas: caracterización nutricional y valoración de sus propiedades tecnofuncionales. Universidad Autónoma de Madrid: España, pp. 308.
- Alanís-Guzmán MG, Reyes-Sánchez R, Serna-Saldívar SO, García-Díaz CL. 2006. Efecto de polifenoles de frijol sobre lípidos séricos. In: IV Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica y XV Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, Colegio Mexicano de Ingenieros Bioquímicos, Morelia, Michoacán, México.
- Anónimo. 2013. Faseolina, proteína del frijol 90% más digerible para el humano. Agencia de Noticias, Universidad Nacional de Colombia [Online]. Disponible en: <https://www.mineducacion.gov.co/cvn/1665/w3-article-330294.html>.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists: Washington, D. C., USA, pp. 879.
- Badui Dergal S. 2006. Química de los Alimentos. Cuarta edición. Pearson Educación: México, pp. 736.
- Barbano DM, Lynch JM, Fleming JR. 1991. Direct and Indirect Determination of True Protein Content of Milk by Kjeldahl Analysis: Collaborative Study. *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 74:281-288.
- Bencini MC. 1986. Functional Properties of Drum-Dried Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Flours. *Journal of Food Science* 51:1518-1521.

- Belitz HD, Grosch W, López Buesa MO. 1997. *Química de Los Alimentos*. Acribia Editorial: España, pp. 1134.
- Beuchat LR. Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 25:258-261.
- Bressani R, Elías LG. 1984. Relación entre la digestibilidad y el valor proteínico del frijol común (*Phaseolus vulgaris*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 34:189-197.
- Carbonaro M, Cappelloni M, Nicoli S, Lucarini M, Carnovale E. 1997. Solubility–Digestibility Relationship of Legume Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:3387-3394.
- Cárdenas MC. 2012. Identificación de fuentes de contaminación durante la producción de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el estado de Nuevo León, México. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León: Monterrey, Nuevo León, México, pp. 129.
- Cárdenas-Quintana H, Gómez-Bravo C, Díaz-Novoa J, Camarena-Mayta F. 2000. Evaluación de la calidad de la proteína de 4 variedades mejoradas de frijol. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición* 14:22-27.
- Casp A, Abril J. sf. Claves de los tratamientos térmicos de vegetales. Universidad Pública de Navarra, pp. 6.
- Chelule PK, Mokoena MP, Gqaleni N. 2010. Advantages of traditional lactic acid bacteria fermentation of food in Africa. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology A*. Mendez-Vilas (Ed). FORMATEX, 2010 1160-1167.
- Cowan ST, Steel KJ. 1974. Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Médica. Segunda Edición. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V.: México, pp. 320.
- Cummings JH, Macfarlane GT. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology* 70:443-459.
- De Carli L, Rosso ND, Schnitzler E, Carneiro PIB. 2006. Study of stability of phytic acid with Ni(II) complex. *Food Science and Technology (Campinas)* 26:19-26.

- Delgado Vargas F, Fuentes Gutiérrez CI, Heredia JB, Muy Rangel MD, Medina Godoy S, Gutiérrez Dorado R, Reyes Moreno C, Valdez Ortiz A, López Valenzuela JA. 2011. Potencial nutracéutico de harinas precocidas de maíz y frijol obtenidas a partir de extrusión y fermentación en estado sólido. In: XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Querétaro, Qro., México.
- Deshpande SS, Sathe SK, Cornforth D, Salunkhe DK. 1982. Effects of dehulling on functional properties of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour. *Cereal Chemistry* 59:396-401.
- Dinnella C, Minichino P, D'Andrea AM, Monteleone E. 2007. Bioaccessibility and antioxidant activity stability of phenolic compounds from extra-virgin olive oils during *in vitro* digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:8423-8429.
- DOF Diario Oficial de la Federación. 1995a. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Secretaría de Salud: México, D. F., pp. 5.
- DOF Diario Oficial de la Federación. 1995b. Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Secretaría de Salud: México, D. F., pp. 6.
- DOF Diario Oficial de la Federación. 1995c. Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Secretaría de Salud: México, D. F., pp. 7.
- DOF Diario Oficial de la Federación. 2003. Norma Oficial Mexicana NOM-187-SSA1/SCFI-2002, Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. Información comercial. Métodos de prueba. Secretaría de Salud: México, D. F., pp. 29.
- DOF Diario Oficial de la Federación. 2009. Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de

- panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba. Secretaría de Salud: México, D. F., pp. 117.
- Doria E, Campion B, Sparvoli F, Tava A, Nielsen E. 2012. Anti-nutrient components and metabolites with health implications in seeds of 10 common bean (*Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus lunatus* L.) landraces cultivated in southern Italy. *Journal of Food Composition and Analysis* 26:72-80.
- Dueñas M, Hernández T, Estrella I. 2002. Phenolic composition of the cotyledon and the seed coat of lentils (*Lens culinaris* L.). *European Food Research and Technology* 215:478-483.
- Duranti M. 2006. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia* 77:67-82.
- Duszkiewicz-Reinhard W, Gujska E, Khan K. 1994. Reduction of Stachyose in Legume Flours by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Science* 59:115-117.
- Enwere NJ. 1998. Foods of plant origin: Processing and utilization with recipes and technology profiles. *Afro-Orbis Publication Ltd.* 194-199.
- FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. *Phaseolus* bean, Post-harvest Operations. Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Fennema OR. 2000. Química de los Alimentos. Segunda edición. Editorial Acirbia: Zaragoza, España, pp. 1280.
- FDA. 1998. Bacteriological Analytical Manual (FDA-BAM). U. S. Food and Drug Administration: USA.
- Fleming H, Mc Feeters R, Thompson R. 1983. Test for susceptibility of fermented vegetables to secondary fermentation. *Journal of Food Science* 48:982-983.
- García O, Aiello Mazzarri C, Peña Chirino MC, Ruiz Ramírez JL, Acevedo Pons IC. 2012. Caracterización físico-química y propiedades funcionales de la harina obtenida de granos de quinchoncho (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) sometidos a diferentes procesamientos. *Revista Científica UDO Agrícola* 12:919-928.
- González Quijada MR. 1999. Caracterización físicoquímica y valoración nutricional y funcional de un aislado proteico obtenido de la semilla de ébano (*Pithecellobium flexicaule* Benth). Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León: Monterrey, Nuevo León, México, pp. 167.

- González-Quijada MR, Alanís-Guzman MG, Serna-Saldivar SO. 2003. Ebony (*Phitecellobium flexicaule* Benth) and proteins fractionation, solubilization, characterization and production of an isolate. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 53:84-89.
- Granito M, Álvarez G. 2006. Lactic acid fermentation of black beans (*Phaseolus vulgaris*): microbiological and chemical characterization. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86:1164-1171.
- Granito M, Frias J, Doblado R, Guerra M, Champ M, Vidal-Valverde C. 2002. Nutritional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*) by natural fermentation. *European Food Research and Technology* 214:226-231.
- Granito M, Guerra M, Torres A, Guinand J. 2004. Efecto del procesamiento sobre las propiedades funcionales de *Vigna sinensis*. *Interciencia* 29:521-526.
- Granito M, Valero Y, Pérez S. 2009. Vida útil de granos *Phaseolus vulgaris* L. fermentados y listos para el consumo. *Revista de la Facultad de Agronomía* 26:88-106.
- Gray J. 2003. Hidratos de carbono: aspectos nutricionales y de salud. International Life Sciences Institute: Brussels, Bélgica, pp. 30.
- Idaho S. 2014. Información Nutricional. State of Idaho, USA.
- Kinsella JE. 1976. Functional properties of proteins in foods: a survey. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 7:219-280.
- Kozłowska H, Honke J, Sadowska J, Frias J, Vidal-Valverde C. 1996. Natural Fermentation of Lentils: Influence of Time, Concentration and Temperature on the Kinetics of Hydrolysis of Inositol Phosphates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71:367-375.
- Lamothe S, Azimy N, Bazinet L, Couillard C, Britten M. 2014. Interaction of green tea polyphenols with dairy matrices in a simulated gastrointestinal environment. *Food and Function* 5:2621-2631.
- Liener IE. 1994. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34:31-67.
- Lopes LCM, De Aleluia Batista K, Fernandes KF, De Andrade Cardoso SR. 2012. Functional, biochemical and pasting properties of extruded bean (*Phaseolus*

- vulgaris*) cotyledons. *International Journal of Food Science & Technology* 47:1859-1865.
- López A, El-Naggar T, Dueñas M, Ortega T, Estrella I, Hernández T, Gómez-Serranillos MP, Palomino OM, Carretero ME. 2013. Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry* 138:547-555.
- MacFaddin JF. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Tercera edición. Editorial Médica Panamericana, S. A.: Argentina, pp. 846.
- Martín-Cabrejas MA, Sanfiz B, Vidal A, Mollá E, Esteban R, López-Andréu FJ. 2004. Effect of Fermentation and Autoclaving on Dietary Fiber Fractions and Antinutritional Factors of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:261-266.
- Mussatto SI, Mancilha IM. 2007. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers* 68:587-597.
- Muñoz Saldaña R. 2010. Frijol, rica fuente de proteínas. CONABIO. *Biodiversitas*, 89:7-11
- Neogen. 2011a. KF Streptococcus Agar. Product Information.
- Neogen. 2011b. Lactobacilli MRS Agar. Product Information.
- Okaka JC, Potter NN. 1977. Functional properties of cowpea-wheat flour blend in bread making. *Journal of Food Science* 42:828-833.
- Pérez S, Granito M. 2012. Efecto de la fermentación sobre la composición proximal y calidad proteica del *Dolichos lablab*. *Revista de la Facultad de Agronomía* 29:273-292.
- Porcel de Fernández ND, Urueña R, Gaudio de Allori MC, De Castillo MEC. 2013. Bactericidia de hipoclorito de sodio sobre *Staphylococcus cohnii* productor de biofilm en una fábrica *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 47:693-700.
- Porres JM, Aranda P, Lopez-Jurado M, Urbano G. 2003. Effect of natural and controlled fermentation on chemical composition and nutrient dialyzability from beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:5144-5149.

- Rangel A, Domont GB, Pedrosa C, Ferreira ST. 2003. Functional Properties of Purified Vicilins from Cowpea (*Vigna unguiculata*) and Pea (*Pisum sativum*) and Cowpea Protein Isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:5792-5797.
- Romano A, Giosafatto CVL, Masi P, Mariniello L. 2015. Impact of dehulling on the physico-chemical properties and *in vitro* protein digestion of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food and Function* 6:1345-1351.
- Rubio LA, Rodríguez J, Fernández C, Crespo JF. 2004. Storage proteins: physiological and antigenic effects. In: Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds and oilseeds, Muzquiz M, Hill GD, Cuadrado C, Pedrosa MM and Burbano C (eds). Wageningen Academic Publishers: The Netherlands, pp. 159-175.
- SAGARPA Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Descripción frijol. México.
- Sánchez Ruiz FH, Furuya Meguro AT, Arroniz Padilla S, Gómez Moreno A, Gómez L. 2009. Comparación de la acción bactericida de hipoclorito de sodio y Microcyn 60 *Revista Odontológica Mexicana* 13:9-16.
- Sathe SK. 2002. Dry bean protein functionality. *Critical Reviews in Biotechnology* 22:175-223.
- Seená S, Sridhar KR. 2005. Physicochemical, functional and cooking properties of under explored legumes, Canavalia of the southwest coast of India. *Food Research International* 38:803-814.
- Shimelis EA, Rakshit SK. 2008. Influence of natural and controlled fermentations on α -galactosides, antinutrients and protein digestibility of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *International Journal of Food Science & Technology* 43:658-665.
- Siddiq M, Ravi R, Harte JB, Dolan KD. 2010. Physical and functional characteristics of selected dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours *LWT - Food Science and Technology* 43:232-237.
- Sotomayor C, Frias J, Vidal-Valverde C, Fornal J, Sadowska J, Urbano G. 1999. Lentil Starch Content and its Microscopical Structure as Influenced by Natural Fermentation. *Starch - Stärke* 51:152-156.

Syngenta. 2013. Frijol. México.

Tabera J, Frias J, Estrella I, Villa R, Vidal-Valverde C. 1995. Natural fermentation of lentils. Influence of time, concentration and temperature on protein content, trypsin inhibitor activity and phenolic compound content. *Z Lebensm Unters Forsch* 201:587-591.

Trinidad TP, Mallillin AC, Loyola AS, Sagum RS, Encabo RR. 2010. The potential health benefits of legumes as a good source of dietary fibre. *British Journal of Nutrition* 103:569-574.

Ulloa JA, Rosas Ulloa P, Ramírez Ramírez JC, Ulloa Rangel BE. 2011. El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. In: *Revista fuente*, pp. 5-9.

Vidal-Valverde C, Frias J, Prodanov M, Tabera J, Ruiz R, Bacon J. 1993. Effect of natural fermentation on carbohydrates, riboflavin and trypsin inhibitor activity of lentils. *Z Lebensm Unters Forsch* 197:449-452.

Yasumatsu K, Misaki M, Tawada J, Sawada K, Toda J, Ishii K. 1972. Utilization of soybean products in fish paste products. *Agricultural and Biological Chemistry* 36:737-744.

Yasumatsu K, Sawada K, Moritaka S, Misaki M, Toda J, Wada T, Ishii K. 1992. Studies on the functional properties of food grade soybean products: whipping and emulsifying properties of soybean products. *Agricultural and Biological Chemistry* 36:719-727.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Ma. del Carmen Cardenas Cardenas

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Alimentos

Tesis: DESARROLLO DE UN PROCESO ESTANDARIZADO DE FERMENTACIÓN LÁCTICA DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) VAR. PINTO AMERICANO PARA PRODUCCIÓN DE UN INGREDIENTE TECNOFUNCIONAL

Campo de estudio: Ciencia de Alimentos.

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 17 de abril de 1985, hija de Felipe de Jesús Cárdenas Guzmán y María del Carmen Cárdenas Herrera.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, título obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 2009 y grado de Maestría en Ciencias con Acentuación en Microbiología en 2012.

Experiencia Profesional: Docente de Asignatura en Escuela Preparatoria No. 8 de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 2011; Analista en el Departamento de Microbiología de Alimentos del Laboratorio Central Regional de Monterrey en Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Nuevo León, A. C. de 2008 a 2009.