

MICROBIOTA PRESENTE DURANTE LA FERMENTACIÓN NATURAL DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) VAR. PINTO AMERICANO

Cárdenas Cárdenas M. C. *, Espinoza Mata A., Alanís Guzmán M. G. J.

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Av. Pedro de Alba s/n, Ciudad Universitaria, C.P. 66450, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. *gfb.cardenas@gmail.com

RESUMEN:

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es una leguminosa que representa una importante fuente de carbohidratos complejos y de proteína, además de aportar compuestos bioactivos a la dieta de los latinoamericanos. Sin embargo, presenta factores que limitan su consumo, los cuales disminuyen significativamente por la fermentación natural, mejorando además la calidad nutritiva. Adicionalmente, este bioproceso puede incrementar el potencial de *P. vulgaris* como ingrediente funcional en alimentos. El objetivo de este trabajo fue determinar los niveles de indicadores microbiológicos y bacterias ácido lácticas presentes durante un proceso de fermentación natural de frijol (*P. vulgaris*) var. Pinto americano, además de aislar e identificar bacterias ácido lácticas fermentadoras presentes durante el proceso. El frijol fue fermentado naturalmente a 42 °C por 72 h, se determinaron indicadores de calidad microbiológica, pH y bacterias ácido lácticas (BAL) durante el proceso. Los niveles de mesófilos aerobios y coliformes totales se mantuvieron, mientras que los enterococos totales y las BAL aumentaron. El pH se redujo en un 20 %. Las BAL aisladas fueron identificadas como *Enterococcus* spp.

ABSTRACT:

Bean (*Phaseolus vulgaris*) is a legume that is an important source of complex carbohydrates and protein, in addition it provides bioactive compounds to the diet of Latin Americans. However, there are some consumption limiting factors, which are significantly reduced by natural fermentation, further improving nutritional quality. Additionally, this bioprocess can increase the potential of *P. vulgaris* as a functional ingredient in food. The aim of this study was to determine microbiological indicators levels and the lactic acid bacteria during a natural fermentation process of bean (*P. vulgaris*) var. Pinto americano, in addition to isolate and identify fermentative lactic acid bacteria in the process. Bean was naturally fermented at 42 °C for 72 h, microbiological quality indicators, pH and lactic acid bacteria (LAB) were determined during processing. The mesophilic aerobes and total coliforms levels were maintained, while total enterococcus and LAB were increased. The pH value was reduced by 20 %. The LAB isolates were identified as *Enterococcus* spp.

Palabras clave:

Frijol, fermentación, BAL.

Keyword:

Bean, fermentation, LAB.

Área: Microbiología y biotecnología.

INTRODUCCIÓN

Phaseolus vulgaris, conocido comúnmente como frijol 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.

Nutricionalmente, la ingesta de frijol, además de 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, 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 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. 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 aceptación 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).

El objetivo de este trabajo fue determinar los niveles de indicadores microbiológicos y bacterias ácido lácticas presentes durante un proceso de fermentación natural de frijol (*Phaseolus vulgaris*) var. Pinto americano, además de aislar e identificar bacterias ácido lácticas fermentadoras presentes durante el proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

El proceso y los análisis se realizaron en frijol (*P. vulgaris*) var. Pinto americano proporcionado por la Facultad de Agronomía de la UANL. El frijol crudo se limpió y lavó tres veces con agua destilada. Después, se colocó en relación 1:4 (frijol:agua, m/v) con agua destilada y se dejó en remojo por 16 h. Posteriormente, el líquido se drenó, se colocó nuevamente al frijol en relación 1:4 y fue sometido a procesamiento por fermentación natural. Una vez concluido el proceso de fermentación natural el frijol se secó y se molió asépticamente.

Fermentación natural

El frijol crudo se colocó en relación 1:4 (frijol:agua, m/v) y se fermentó a 42 °C por 72 h. Al tiempo cero y cada 24 horas se tomó muestra del líquido de fermentación para determinar cuentas de indicadores microbiológicos y bacterias ácido lácticas, además de monitoreo del pH. Concluido el tiempo de fermentación, el material fermentado fue drenado, se secó a 55-60 °C por 24 h en una estufa de secado y se molió asépticamente.

Determinación de microorganismos indicadores y de bacterias ácido lácticas

Las muestras de frijol se analizaron al tiempo cero y cada 24 horas durante el proceso de fermentación natural para cuantificar los siguientes microorganismos indicadores: mesófilos aerobios, coliformes totales y enterococos totales, además de bacterias ácido lácticas.

Para la determinación de mesófilos aerobios se siguió la metodología descrita en la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994; en tanto que para la determinación de coliformes totales se utilizó la metodología descrita en el Manual de Análisis Bacteriológico (FDA-BAM, Food and Drug Administration – Bacteriological Analytical Manual). Para la cuantificación de bacterias ácido lácticas se siguió la metodología de Granito and Álvarez (2006) con algunas modificaciones. En el caso de los enterococos totales se empleó el procedimiento descrito por Cárdenas (2012) (DOF, 1995; FDA, 1998; Granito and Álvarez, 2006; Cardenas, 2012).

Identificación de bacterias ácido lácticas aisladas en el proceso de fermentación natural

Las bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas durante el proceso de fermentación natural se sometieron a pruebas bioquímicas (Cowan and Steel, 1974) para identificación de género: morfología (tinción de Gram), motilidad, catalasa, oxidasa, oxidación/fermentación, hemólisis, crecimiento a 45 °C, sobrevivencia a 60 °C durante 30 min, crecimiento en pH 9.6, arabinosa (ácido) y glicerol (ácido).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de microorganismos indicadores y de bacterias ácido lácticas

Las cuentas de indicadores de calidad microbiológica durante el proceso de fermentación natural de frijol (*P. vulgaris*) var. Pinto americano fueron los siguientes: mesófilos aerobios 1.38×10^8 (inicial) a 3.40×10^8 UFC/g tras 72 h de fermentación, coliformes totales de 1.27×10^8 a 9.57×10^7 UFC/g y enterococos totales de 1.91×10^1 a 1.72×10^9 UFC/g. En cuanto a las bacterias ácido lácticas, sus niveles fueron en aumento, de 2.81×10^2 a 1.33×10^8 UFC/g (Figura 1).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Granito and 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.

En cuanto al monitoreo de pH, se obtuvo una reducción significativa de 20 %. El pH final fue de 4.51 tras 72 h de fermentación natural a 42 °C (Figura 2), 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; como el ácido láctico es el principal subproducto del proceso de fermentación, el pH del fermentado siempre es menor de 5 (Chelule *et al.*, 2010).

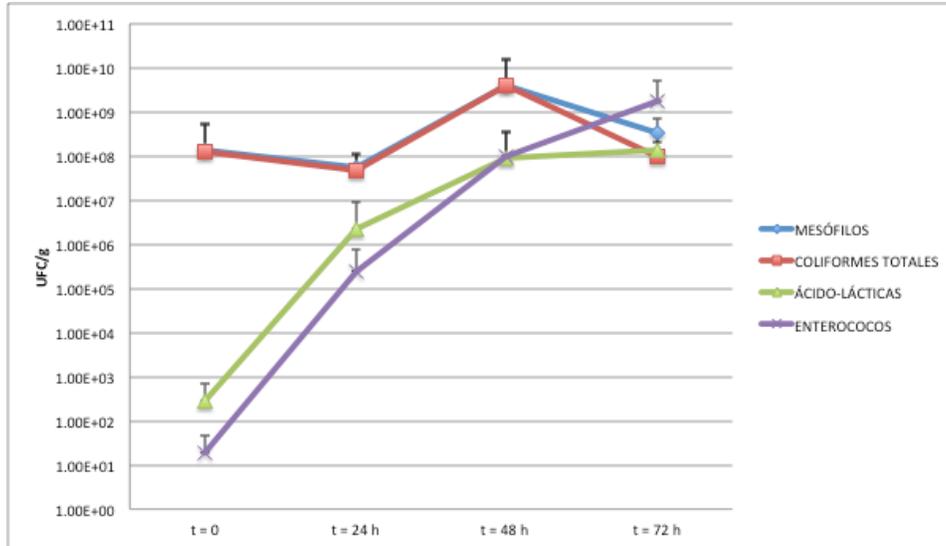


Figura 1. Niveles de microorganismos indicadores de calidad microbiológica y de bacterias ácido lácticas durante la fermentación natural de frijol (*P. vulgaris*) var. Pinto americano.

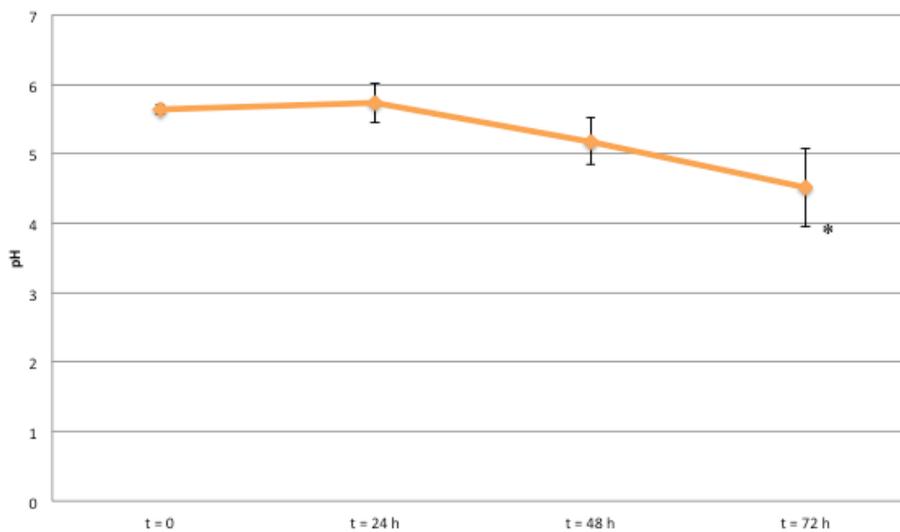


Figura 2. Variación de pH durante el proceso de fermentación natural de frijol (*P. vulgaris*) var. Pinto americano. *: $p < 0.05$ Tukey.

Identificación de bacterias ácido lácticas aisladas en el proceso de fermentación natural

Las BAL aisladas del proceso de fermentación natural de frijol (*P. vulgaris*) var. Pinto americano se sometieron a pruebas bioquímicas y mostraron las siguientes características: cocos Gram positivos (Figura 3), catalasa negativos, oxidasa negativos, motilidad negativa y metabolismo fermentativo (Figura 4) (Tabla I). Estas bacterias presentan α -hemólisis o no la presentan (Figura 5), capacidad de crecer a 45 °C, viabilidad a 60 °C durante 30 min, crecimiento en pH 9.6, y metabolizan arabinosa y glicerol (Tabla II). Estas características las ubican en el género *Enterococcus* spp.

Tabla I. Pruebas bioquímicas primarias

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

Tabla II. 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)
α / -	+	+	+	+	-

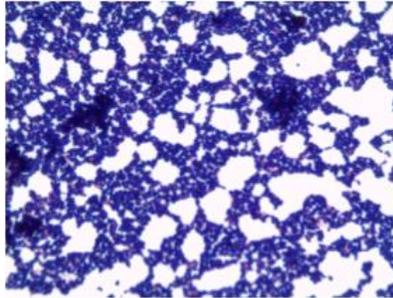


Figura 3. Morfología de bacterias ácido lácticas aisladas: cocos Gram positivos.



Figura 4. Prueba de O/F: Metabolismo fermentativo.

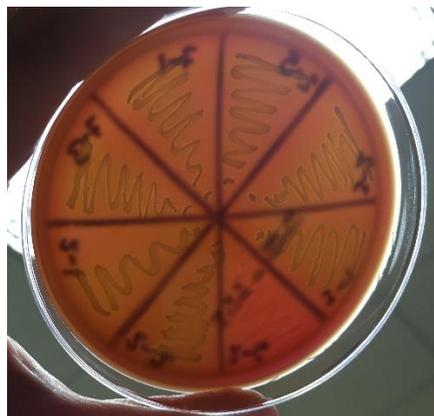


Figura 5. Placa de agar sangre donde las bacterias ácido lácticas presentan α -hemólisis; en el cuadrante inferior derecho de la placa se observa un resultado negativo para hemólisis.

Se ha reportado que las bacterias aisladas en procesos de fermentación natural pueden pertenecer a alguno de los siguientes géneros: *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus*,

Pediococcus y *Micrococcus*, entre otros (Granito and Álvarez, 2006; Chelule *et al.*, 2010), lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

CONCLUSIONES

Los niveles de los indicadores de calidad microbiológica, coliformes totales y mesófilos aerobios, fueron de 8 log durante el proceso de fermentación natural de frijol (*P. vulgaris*) var. Pinto americano; mientras que los enterococos totales aumentaron en 8 log, a la par de las bacterias ácido lácticas, las cuales se incrementaron 6 log. Durante el proceso de fermentación natural del frijol, el pH se redujo significativamente en 20 %, siendo de 4.51 al final del proceso. Durante el proceso se lograron aislar e identificar bacterias ácido lácticas pertenecientes al género *Enterococcus* spp.

BIBLIOGRAFÍA

- Cardenas MC. 2012. Identificación de fuentes de contaminación durante la producción de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el estado de Nuevo León, México. Departamento de Microbiología e Inmunología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León: Monterrey, Nuevo León, pp. 129.
- Chelule PK, Mokoena MP and 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 pp. 1160-1167.
- Cowan ST and Steel KJ. 1974. Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. Compañía Editorial Continental: México, pp. 320.
- DOF. 1995. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. S. de Salud: México, D. F., pp. 5.
- FDA. 1998. Bacteriological Analytical Manual (FDA-BAM). U. S. Food and Drug Administration.
- Granito M and 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, 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.
- Porres JM, Aranda P, Lopez-Jurado M and 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.