



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Bioprocesamiento de Frijol Común (*Phaseolus vulgaris* L) para Obtener un Alimento Funcional con Potenciales Antioxidante e Hipoglucémico Altos

T E S I S

Que presenta
Jorge Rodolfo León Murillo

Para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIA
Y
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Directores
Dr Cuauhtémoc Reyes Moreno
Dr Roberto Gutiérrez Dorado

Culiacán, Sinaloa, México

Febrero de 2016

La presente investigación, titulada **“Bioprocesamiento de Frijol Común (*Phaseolus vulgaris* L) para Obtener un Alimento Funcional con Potenciales Antioxidante e Hipoglucémico”** se realizó en el Laboratorio de “Bioprocesos y Alimentos Funcionales”, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Los Doctores Cuauhtémoc Reyes Moreno y Roberto Gutiérrez Dorado, participaron como Directores de Tesis. El tesista, Jorge Rodolfo León Murillo, recibió “Beca de Estudios de Maestría” de CONACyT para la realización de esta investigación.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán de Rosales, Sinaloa el día 04 del mes Febrero del año 2016 el (la) que suscribe IBQ. Jorge Rodolfo León Murillo, alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos con número de cuenta 1231177-4, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Roberto Gutiérrez Dorado y Dr. Cuauhtémoc Reyes Moreno y cede los derechos del trabajo titulado "Bioprocesamiento de frijol común (*Phaseolus Vulgaris* L)", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jorge R. León M.

IBQ. Jorge Rodolfo León Murillo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme fuerzas para lograr llegar hasta donde estoy ahora.

Agradezco al programa de **Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos**, de la facultad de Ciencias Químico Biológicas, de la Universidad Autónoma de Sinaloa por aceptarme en el posgrado.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada.

A los docentes del programa de **Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos**, por contribuir en mi formación y por compartir su tiempo y experiencia.

Al **Dr Roberto Gutiérrez Dorado**, por su dirección, por su apoyo, palabras de aliento, consejos y por siempre compartir su vasto conocimiento en la ciencia y por guiarme siempre por el camino correcto para el desarrollo y culminación de este proyecto.

Al **Dr Cuauhtémoc Reyes Moreno**, por la dirección y asesoría del presente proyecto, por siempre apoyarme y alentarme.

A la **Dr Luis Martin Sánchez Magaña**, por su gran apoyo durante las primeras etapas del proyecto.

A la **Dra Janitzio Xiomara Korina Perales Sánchez**, por ser no una jefa sino una líder y hacer mis problemas parte de los suyos y ayudarme a resolverlos.

A mis compañeros de laboratorio. A **Daniel** por enseñarme que la creatividad si paga, a **Fernando** que me enseñó que con la herramienta adecuada y un poco de creatividad puedes hacer funcionar todo, a **Mario** que me enseñó a llevármelo todo con calma, a **Julieta** que me enseñó a ver los problemas con buena cara y

esforzarme para resolverlos, a **Denisse, Jonathan, Alfa, Celeste y Álvaro**. Gracias a todos por ayudarme y apoyarme, por compartir esos momentos de plática, reflexión y risas en el pasillo.

A **Brenda**, que se quebró la cabeza conmigo durante el desarrollo del proyecto, por compartir esos momentos de angustia y éxito, por ayudarme a resolver algunos problemas que se me atravesaron. Gracias por tu gran apoyo.

A mis compañeras de generación **MCTA 2013-2015** por los consejos y el apoyo brindado, por los viajes y diversión que tuvimos. En especial **Fernanda, Anayanci, Karen y Ana María**.

A mi madre **Nazaria Murillo Roman** que siempre me ha estado apoyando desde siempre, por educándome y ayudarme en mis problemas

A mi padre **Jorge León Zazueta**, que siempre me guio desde pequeño, por siempre enseñarme a ser honrado y seguir el camino correcto.

A mis hermanos **Ernestina, Guillermo y Nancy** por el apoyo durante la investigación, por la fe y confianza que depositan en mí. Ustedes son una parte fundamental de mi vida, gracias por todo.

Por ultimo pero no menos importante **María de Lourdes Valenzuela Ponce** a mi musa de inspiración, a la reina de mi corazón, el sol que me ilumina y guía mi camino, por todo tu apoyo y siempre animarme, por ser la que me ayuda a levantarme cuando caigo por la derrota, por ser paciente y quererme, Muchas gracias. ***Yer anni atthirari jalan, Shieraki gori ha yeraan!. Avy jorrāelan.***

ÍNDICE GENERAL

	ÍNDICE DE CUADROS	vii
	ÍNDICE DE FIGURAS	ix
I	INTRODUCCIÓN	1
II	REVISIÓN DE LITERATURA	2
A	ESTRÉS OXIDATIVO	2
1	Radicales libres	2
2	Especies reactivas de oxígeno (ROS)	3
3	Daños por ROS a biomoléculas	3
a	Lípidos	3
b	Proteínas	4
c	Ácido desoxirribonucleico (ADN)	4
B	DIABETES	5
1	Generalidades	5
2	Prevalencia de la diabetes	6
3	Mecanismos de la diabetes	7
4	Relación entre dieta y enfermedad	8
C	ESTRATEGIAS CONTRA DIABETES	11
1	Inhibidores enzimáticos	11
2	Inhibidores enzimáticos comerciales	12
3	Fitoquímicos con propiedades hipoglucémicas	13
D	ALIMENTOS FUNCIONALES	15
1	Definición	15
2	Alimentos nutraceuticos	15
a	Compuestos antioxidantes	16
1)	Evaluación de la actividad antioxidante	19
E	FRIJOL (<i>Phaseolus vulgaris</i> L)	19
1	Origen	19
2	Estructura del grano de frijol.	20
3	Composición y valor nutritivo	22
a	Proteína	24

1) Calidad proteínica	25
b Carbohidratos	25
c Lípidos	26
d Vitaminas y minerales	26
e Fibra dietaría total	27
f Almidón resistente	27
4 Valor nutricional	28
5 Fitoquímicos del frijol	28
a Compuestos fenólicos en el frijol	29
1) Flavonoides	29
2) Taninos	29
3) Isoflavonas	31
b Saponinas	33
c Factores antinutricionales del frijol común	34
6 Actividad antioxidante del frijol	36
7 Propiedades nutraceuticas del frijol	38
a Antioxidante	38
b Efectos anticarcinogénicos y antimutagenicas	39
c Antihipertensiva	40
d Propiedades antidiabéticas y antiobesidad	40
F FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO (FES)	41
1 Generalidades	41
G TEMPE	43
1 Características	43
2 Sustrato	43
3 Inoculo	44
a <i>Rhizopus oligosporus</i>	44
1) Actividad enzimática	46
4 Manufactura del tempe	47
b Limpieza	47
c Remojo y fermentación láctica	47

d	Descascarillado	48
e	Cocción parcial	48
f	Drenado/enfriado	48
g	Inoculación	49
h	Contenedor de fermentación	49
i	Incubación	50
H	CAMBIOS QUÍMICOS DURANTE LA PRODUCCIÓN DE TEMPE	50
1	Proteínas y calidad nutricional	51
2	Carbohidratos	53
3	Lípidos	53
4	Vitaminas	54
5	Minerales	55
6	Fibra dietaria total	56
7	Almidón resistente (AR)	56
I	EFFECTO DE FES SOBRE EL VALOR NUTRICIONAL DEL SUSTRATO	57
1	Perfil de aminoácidos	57
2	Digestibilidad	57
3	Valor biológico de las proteínas	58
4	Factores antinutricionales	60
J	EFFECTO DE FES SOBRE PERFILES DE FITOQUÍMICOS	61
K	EFFECTO DE LA FES SOBRE PROPIEDADES NUTRACÉUTICAS DE LOS SUSTRATOS	64
1	Capacidad antioxidante	64
2	Propiedades antidiabéticas	66
3	Propiedades anticancerígena	67
4	Propiedades antihipertensivas	68
III	JUSTIFICACIÓN	69
IV	HIPÓTESIS	70
V	OBJETIVOS	71
A	OBJETIVO GENERAL	71
B	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	71

VI	MATERIALES Y MÉTODOS	72
A	MATERIALES	72
B	MÉTODOS	72
1	Características físicas	72
a	Dimensiones	72
b	Peso de 100/1000 granos	72
c	Peso hectolitrico	72
d	Calibre	73
2	Composición química	73
a	Proteína cruda	73
b	Lípidos	73
c	Cenizas	73
d	Carbohidratos	73
e	Fibra dietaría total	74
3	Propiedades fisicoquímicas	74
a	Actividad de agua (aw)	74
b	Diferencia de color (ΔE)	75
c	pH	75
d	Índice de absorción de agua (IAA)	75
e	Índice de solubilidad en agua (ISA)	76
f	Índice de formación (IFE) y estabilidad de espuma (EFE)	76
g	Índice de actividad y estabilidad de emulsión (IAE, EAE)	76
h	Capacidad de absorción de aceite (CAA)	77
i	Índice de dispersabilidad	77
4	Actividad antioxidante (AAox) hidrofílica total	78
a	Extracto de fitoquímicos libres	78
b	Extracto de fitoquímicos ligados	78
c	ABTS para compuestos hidrofílicos	79
d	ORAC para compuestos hidrofílicos	80
e	Compuestos fenólicos totales	81
5	Potencial hipoglucémico	82

a	Índice de inhibición de α -amilasas (IIAA)	82
b	Índice de inhibición de α -glucosidasa (IIAG)	82
6	Optimización proceso de fermentación en estado sólido (FES)	83
a	Metodología de superficie de respuesta (MSR) y diseño experimental	83
b	Obtención de harinas de frijol común bioprocesado (HFCB)	84
1)	Preparación del sustrato	84
2)	Inoculo	84
3)	Fermentación	86
c	Actividad antioxidante, compuestos fenólicos totales e índice de inhibición de α -amilasa de la harina de frijol común bioprocesada (HFCB)	86
1)	Obtención de los extractos	86
a)	Extractos de fitoquímicos libres	86
b)	Extractos de fitoquímicos ligados	86
2)	ABTS para compuestos hidrofílicos	87
3)	Compuestos fenólicos totales	87
4)	Índice de inhibición de α -amilasa (IIAA)	87
d	Análisis de varianza y regresión	87
e	Optimización	88
7	Propiedades de la harina de frijol común bioprocesado optimizada (HFCBO)	89
a	Composición química	89
b	Propiedades fisicoquímicas	90
c	Actividad antioxidante	90
1)	Extractos de fitoquímicos libres	90
2)	Extractos de fitoquímicos ligados	90
3)	ABTS para compuestos hidrofílicos	90
4)	ORAC para compuestos hidrofílicos	90
d	Compuestos fenólicos totales (CFT)	91
e	Índice de inhibición de α -amilasa (IIAA)	91
f	Índice de inhibición de α -glucosidasa (IIAG)	91

8	Análisis estadístico	91
VII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	92
A	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS GRANOS DE FRIJOL COMÚN VAR AZUFRAO HIGURA	92
B	MEJORES CONDICIONES PARA LA PRODUCCIÓN DE HARINA DE FRIJOL COMÚN BIOPROCESADA OPTIMIZADA (HFCBO)	94
1	Modelo de predicción	94
a	Actividad antioxidante (AAox)	94
b	Compuestos fenólicos totales (CFT)	99
c	Índice de inhibición de α -amilasa (IIAA)	103
2	Optimización	105
C	EFFECTO DEL BIOPROCESAMIENTO SOBRE COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL FRIJOL COMÚN	108
D	EFFECTO DEL BIOPROCESAMIENTO SOBRE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES DE FRIJOL COMÚN	114
E	EFFECTO DEL BIOPROCESAMIENTO SOBRE POTENCIAL HIPOGLUCÉMICO DE FRIJOL COMÚN	117
VIII	CONCLUSIONES	122
IX	BIBLIOGRAFIA	124
	ABREVIATURAS	146

ÍNDICE DE CUADROS

No.	Descripción	Pág
1	Clasificación de antioxidantes según su sitio de acción	17
2	Clasificación de antioxidantes según su origen	18
3	Composición química en granos de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L)(% bs)	23
4	Fitoquímicos en granos de frijol común	30
5	Efecto de la fermentación de leguminosas sobre composición química	52
6	Efecto de la fermentación de leguminosas sobre valor nutricional	59
7	Efecto de la fermentación de leguminosas sobre fitoquímicos	62
8	Efecto de la FES sobre propiedades nutraceuticas de los sustratos	65
9	Diseño central compuesto rotatable mostrando los tratamientos (combinación de los niveles de las variables de proceso) utilizados para producir harinas de frijol bioprocesado por fermentación en estado sólido.	85
10	Características físicas de los granos de frijol común	93
11	Diseño central compuesto rotatable mostrando los tratamientos (combinación de los niveles de las variables de proceso) utilizados para producir harinas de frijol bioprocesado por fermentación en estado sólido y resultados experimentales para las variables de respuesta	95
12	Coeficientes de regresión y análisis de varianza de los modelos experimentales de predicción mostrando la relación entre las variables de respuesta (AAox, CFT, IIAA) y variables del proceso (TF, tF) para la	96

producción de harinas de frijol común bioprocesado (**HFCB**).

- | | | |
|----|---|-----|
| 13 | Efecto del bioprocesamiento sobre composición química y propiedades fisicoquímicas de frijol común | 109 |
| 14 | Efecto del bioprocesamiento sobre la actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos de frijol común | 115 |
| 15 | Efecto del bioprocesamiento sobre el potencial hipoglucémico de frijol común | 119 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig	Descripción	Pág
1	Proceso de digestión de los carbohidratos.	9
2	Hidrolisis de carbohidratos e inhibición por acarbosa.	14
3	Estructura del grano de frijol.	21
4	Gráficas de contornos (A) y superficie de respuesta (B) mostrando el efecto de las variables de proceso de fermentación TF y tF sobre la AAox ($\mu\text{mol ET/ 100 g}$ de muestra, bs) de las harinas de frijol común	98
5	Gráficas de contornos (A) y superficie de respuesta (B) mostrando el efecto de las variables de proceso de fermentación TF y tF sobre los CFT (mg EAG/100 g de muestra, bs) de las harinas de frijol común	101
6	Gráficas de contornos (A) y superficie de respuesta (B) mostrando el efecto de las variables de proceso de fermentación TF y tF sobre el IIAA de las harinas de frijol común bioprocesado (HFCB)	104
7	Gráfica de deseabilidades individuales (d_i) para las variables de respuesta (AAox ; CFT ; IIAA) y deseabilidad global obtenidas durante la optimización del proceso de fermentación para la obtención de harina de frijol común bioprocesado optimizado (HFCBO) con AAox , CFT e IIAA altos. TF = temperatura de fermentación; tF = tiempo de fermentación	106

- 8 Gráficas de contornos (**A**) y superficie de respuesta (**B**) mostrando el efecto de las variables de proceso de fermentación **TF** y **tF** sobre la deseabilidad global de las variables de respuesta (**AAox**, **CFT** y **IIAA**) empleada para la optimización del proceso de fermentación para la obtención de harina de frijol común bioprocesado optimizado (**HFCBO**). 107

RESUMEN

El frijol provee beneficios a la salud debido a la presencia de compuestos bioactivos antioxidantes. Una manera efectiva de incrementar el contenido de estos compuestos bioactivos es mediante la fermentación en estado sólido (**FES**), la cual consiste en el crecimiento de microorganismos sobre materiales alimenticios sólidos en ausencia, o casi ausencia, de agua libre superficial. Algunos investigadores afirman que la **FES** es un proceso efectivo para incrementar la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos de los granos, a su vez, incrementar sus propiedades nutraceuticas como el potencial hipoglucémico. Anteriormente, la **FES** fue optimizada para obtener una harina funcional a partir de frijol común negro con potencial actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos totales alto. Sin embargo, no existe ningún reporte de investigación sobre la optimización de la **FES** para incrementar el valor antioxidante, compuestos fenólicos totales e índice de inhibición de α -amilasa de frijol común var. azufrado higuera. Por lo cual, este estudio fue llevado a cabo para encontrar las mejores condiciones de **FES** de frijol común var. azufrado higuera que maximice los valores de actividad antioxidante, contenido de fenólicos totales e índice de inhibición de α -amilasa y obtener una harina funcional con potencial antioxidante e hipoglucémico incrementado. El método de deseabilidad numérica de la metodología de superficie de respuesta (**MSR**) fue utilizada para optimizar las condiciones del bioproceso de **FES**. Se utilizó un diseño central compuesto rotatable con dos factores [temperatura de fermentación (**TF**=22-45°C)/ tiempo de fermentación (**tF**=6-108h)] y cinco niveles (13 tratamientos). Las variables de respuesta fueron actividad antioxidante (**AAox**), contenido de compuestos fenólicos totales (**CFT**) e índice de inhibición de α -amilasa (**IIAA**), usando como

criterios de optimización maximizar estas respuestas. Los cotiledones bioprocesados de cada tratamiento fueron secados, molturados y mezclados con sus respectivas testas previamente secadas y molturadas. La mejor combinación de **TF/tF** para obtener una harina funcional fueron 33.5°C/ 108h. La **FES** incrementó la actividad antioxidante (de 5,214 a 13,429 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g, bs}$) medida por el método de ABTS, el contenido de compuestos fenólicos totales (**CFT**) (de 108 a 262 mg EAG/100 g, bs), el índice de inhibición de α -amilasa (**I_{AA}**) (4.64 a 7.65) y el índice de inhibición de α -glucosidasa (**I_{AG}**) (7.31 a 10.6). En conclusión, la optimización de las condiciones de **FES** de frijol común var. azufrado higuera es una buena estrategia para producir una harina funcional con potencial antioxidante e hipoglucémico incrementado.

ABSTRACT

The common bean provides health benefits due to the presence of antioxidants bioactive compounds. An effective way to increase the content of these bioactive compounds is by the solid state bioconversion (**SSB**), which consists in the growth of microorganisms on solid materials in the absence, or near absence, of free water surface. Researches claim that **SSB** is an effective process to enhance the antioxidant activity and phenolic content of grains, also, increase the nutraceutical property like the hypoglycemic potential. Previously, the **SSB** conditions were optimized to obtain functional flour from black common bean with potential antioxidant activity and high total phenolic content. However, there isn't any research about the optimization of the **SSB** to enhance the antioxidant value of common bean var. azufrado higuera. Therefore, this study was conducted to find the best solid state bioconversion conditions of common bean var. azufrado higuera that would maximize the antioxidant activity and total phenolic content and α -amylase inhibition index, and obtain functional flour with enhanced antioxidant and hypoglycemic potential. The desirability numerical method of the response surface methodology (**RSM**) was used to optimize the conditions of the **SSB** bioprocess. A central composite experimental design with two factors [fermentation temperature (**FT**)=22-45°C/fermentation time (**Ft**)=6-108 h] and five levels was used (13 treatments). The response variables were antioxidant activity (**AAox**), total phenolic content (**TFC**) and α -amylase inhibition index (**AAII**) using as optimization criteria maximize these responses. The bioprocessed cotyledons from each treatment were dried, milled, and blended with its previously dried-milled seed coats. The best combination **FT/Ft** of **SSB** to obtain the

functional flour was 33.5°C/108 h. **SSB** increased antioxidant activity (from 5,214 to 13,429 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g, dw}$), total phenolic content (**TPC**) (from 108 to 262 mg GAE/100 g, dw), α -amylase inhibition index (**AAII**) (from 4.64 to 7.65) and α -glucosidase inhibition index (**AGII**) (from 7.31 to 10.6). In conclusion, the optimizing of **SSB** conditions of common bean var. azufrado higuera is an effective strategy to produce functional flour with enhanced antioxidant and hypoglycemic potential.

I INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico caracterizado por hiperglucemia o azúcar en la sangre. La hiperglucemia puede ser manejada con éxito con uso de medicamentos sintéticos que inhiben enzimas relacionadas con la hidrólisis de carbohidratos, sin embargo tienen efectos adversos como distensión abdominal, flatulencia y posible diarrea, por ello, ha surgido el interés en inhibidores de origen natural presentes en leguminosas, como el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L). Además, existen muchos estudios en los cuales se ha demostrado otros beneficios a la salud del frijol común, debido a la presencia de compuestos bioactivos, principalmente antioxidantes. Una forma de incrementar el contenido de estos compuestos es mediante la fermentación en estado sólido (FES), la cual consiste en el crecimiento de microorganismos en materiales sólidos en ausencia, o casi ausencia, de agua libre superficial. Este bioproceso mejora las propiedades nutraceuticas y actividad antioxidante de los alimentos. Sin embargo, no existen reportes en la literatura donde el proceso de FES haya sido optimizado para obtener harina de frijol con valor nutraceutico alto. Debido a ello, en el presente estudio se pretende encontrar la mejor combinación de temperatura (TF) y tiempo (tF) de FES para obtener una harina de frijol bioprocesado con potenciales antioxidante e hipoglucémico altos. Se aplicara el método gráfico de la MSR para encontrar las mejores condiciones del bioproceso de FES para obtener la harina de frijol bioprocesado optimizada (HFCBO) con potenciales antioxidante e hipoglucémico altos. A la HFCBO se le evaluará composición química, propiedades fisicoquímicas y nutricionales, niveles de fitoquímicos, capacidad antioxidante e índice de inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa.

II REVISIÓN DE LITERATURA

A ESTRÉS OXIDATIVO

Todos los organismos aeróbicos están expuestos a estrés oxidativo ya que producen energía mediante el uso de oxígeno. Este se define como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas; esto tiene como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistemas o grupos celulares específicos el cual solo se hace evidente por el brote de ciertas enfermedades (Ames 1993; Pietta 2000), siendo el exceso de radicales libres la principal causa de estrés oxidativo (Josko 2012).

1 Radicales libres

Los radicales libres se definen como compuestos que contienen uno o más electrones no apareados y es esta capa de electrones incompleta lo que le confiere una alta reactividad. Los radicales libres pueden generarse a partir de muchos elementos, pero en los sistemas biológicos el oxígeno y nitrógeno son los más importantes. Cuando la formación de radicales libres excede la capacidad de defensa ante ellos se pierde el balance oxidativo y se produce daño en lípidos, proteínas y ADN. Por lo tanto, el estrés oxidativo se define como el efecto adverso de las reacciones oxidativas inducidas por radicales libres dentro de los sistemas biológico (Elejalde 2001).

2 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

El término “especies reactivas de oxígeno” se aplica tanto a los radicales libres y sus intermediarios no radicales. En condiciones fisiológicas, el radical libre de oxígeno más común es el anión superóxido ($O_2 \bullet^-$). La transferencia de electrones a lo largo de las enzimas de la cadena respiratoria no es totalmente eficiente, en particular de los complejos I y III, resultado en la formación de $O_2 \bullet^-$. La velocidad de formación se determina por el número de electrones presentes en la cadena y así se eleva bajo condiciones de hiperoxia y de glucosa elevado, como en la diabetes. Sin embargo, también se aumenta en condiciones de hipoxia, cuando la reducción de la disponibilidad de oxígeno para actuar como el aceptor final de electrones para el complejo IV hace que los electrones se acumulan. En condiciones normales, 2% de oxígeno consumido se convierte en $O_2 \bullet^-$ en las mitocondrias en lugar de ser reducida al agua (Pacher y col 2007).

3 Daños por ROS a biomoléculas

a Lípidos

Los radicales hidroxilos son capaces de causar la peroxidación lipídica en la membrana plasmática. Por la obtención de hidrógeno de la cadena lateral de hidrocarburo de un ácido graso, que crean un radical de carbono-central C. Si el oxígeno está presente, este puede reaccionar para formar un radical (radical -C-O-O·) peroxilo, que a su vez es capaz de extraer hidrógeno a partir de un ácido graso adyacente, lo que propaga la reacción produciendo hidroperóxidos que se propagan más allá de la vía de los radicales libres. (Halliwell y Gutteridge 1999). Los hidroperóxidos tienen efectos tóxicos sobre las células tanto directamente como a

través de la degradación del radical hidroxilo altamente tóxico. Estos también pueden reaccionar con metales de transición como el hierro o el cobre para formar aldehídos que puedan dañar las membranas celulares. (Maritim y col 2003)

b Proteínas

Los aminoácidos, tanto libres como en las proteínas, son un objetivo para el daño oxidativo. La oxidación directa de las cadenas laterales conduce a la formación de grupos carbonilo (aldehídos y cetonas) y prolina, arginina, lisina y treonina son particularmente vulnerables a los ataques (Dalle-Donne y col 2003).

La extracción de iones de hidrógeno del grupo tiol de la cisteína puede conducir a la formación de enlaces disulfuro y los plegamientos anormales de proteínas. Plegamiento anormal no solo puede conducir a la pérdida de la función, sino también la agregación de proteínas y la muerte celular. Por último, el peroxinitrito reacciona con residuos de tirosina para formar 3-nitrotirosina. En los niveles fisiológicos, se cree que la nitración de proteínas a ser un proceso selectivo y reversible, conduce a la activación de una manera análoga a la fosforilación, pero a niveles más altos puede ser perjudicial (Myatt 2010).

c Ácido desoxirribonucleico (ADN)

El ADN es atacado principalmente por los radicales OH y una variedad de productos puede ser generada a través de reacciones con cualquiera de las bases de ADN o los azúcares de desoxirribosa. Los ataques contra los restos de azúcar pueden causar roturas de cadena, mientras que los de las proteínas histonas puede conducir a enlaces cruzados que interfieren con el plegamiento de la cromatina, la

reparación del ADN y la transcripción. Por lo tanto, pueden dar lugar a la mutación o la expresión génica irregular (Halliwell y Gutteridge 1999).

El ADN mitocondrial es particularmente vulnerable a los ataques ROS debido a su proximidad al radical O₂ generado de la cadena de transporte de electrones, debido a la falta de protección de las histonas y los mecanismos mínimos de reparación que existen (Richter y col 1988). Como el ADN mitocondrial codifica varias proteínas, incluyendo las enzimas de la cadena de transporte de electrones, las mutaciones pueden conducir a la alteración de la producción de energía y el riesgo de una mayor fuga de electrones, lo que agrava la tensión inicial. Una fuente importante de radicales libres es la oxidación de la glucosa. En su forma enediol, la glucosa se oxida catalizada por metales de transición, a un anión radical enediol causando la reducción de oxígeno molecular que da lugar a cetoaldehídos e intermediarios oxidantes provocando la producción de radicales hidroxilo muy reactivos (Maritim y col 2003).

B DIABETES

1 Generalidades

A nivel mundial, los trastornos nutricionales más comunes son el sobrepeso y la obesidad. Una persona que padece de obesidad tiene un mayor riesgo de padecer enfermedades del tipo crónico degenerativas tales como artritis, dislipidemia, hipertensión, enfermedad de las arterias coronarias y diabetes (Rosak y Mertes 2009) La diabetes mellitus es un trastorno metabólico caracterizado principalmente por hiperglicemia, es citado en el informe de la FID como la cuarta o quinta causa de muerte en la mayoría de los países de altos ingresos y una enfermedad epidémica

en ciudades económicamente en desarrollo e industrializadas (Najafian y col 2010). Los tipos de diabetes conocidos son: Diabetes de tipo 1 que se caracteriza por una producción deficiente de insulina y requiere la administración diaria de esta hormona; Diabetes de tipo 2 que se debe a una utilización ineficaz de la insulina. Representa el 90% de los casos mundiales y se debe en gran medida a un peso corporal excesivo y a la inactividad física; y Diabetes gestacional que es un estado hiperglucémico que aparece o se detecta por vez primera durante el embarazo. Se cree que el incremento del estrés oxidativo aumenta el desarrollo y progresión de la enfermedad, usualmente la diabetes está acompañada de un incremento en la producción de radicales libres y deterioro de las defensas antioxidantes. (Maritim y col 2003; Mora y Ospina 2009).

2 Prevalencia de la diabetes

La prevalencia global de diabetes tipo 2 está aumentando rápidamente por el envejecimiento, la urbanización y los cambios asociados al estilo de vida (Zimmet y col 2001). Es una causa importante de morbilidad y mortalidad prematura en todo el mundo. En el año 2012, la Federación Internacional de Diabetes (IFD, por sus siglas en inglés) estimó que más de 371 millones de personas vivían con dicha enfermedad y que 4.8 millones de personas mueren a causa de la misma. Por otro lado a nivel mundial se estima que para el año 2030 el número de personas diabéticas se incremente a 439 millones. En México, de 1998 al 2012 se ha observado una tendencia al incremento del 4.7%, pasando de una tasa de morbilidad de 342.1 a 358.2 casos por cada 100 mil habitantes, específicamente en el año 2012 se reportaron 418,797 pacientes diagnosticados con diabetes (0.4% de

la población mexicana), el 59% de los casos fueron del sexo femenino entre 50-59 años, con una tasa de morbilidad de 1,237.90 casos por cada 100 mil habitantes y está creciendo, si la tendencia permanece igual se espera para el año 2030 un aumento del 37.8% en el número de casos y 23.9% en la tasa de morbilidad (IFD 2012; SVEHDMT2 2013).

Según las cifras de la INEGI del 2012, esta enfermedad es la segunda causa de muerte en la población mexicana, con una tasa de mortalidad de 75 defunciones por cada 100 mil habitantes. Para el primer trimestre del año 2013, los resultados del sistema de vigilancia epidemiológica hospitalaria de diabetes mellitus tipo 2 (SVEHDMT2), registró 5,020 casos en todos los grupos de edad siendo el Estado de México el que presento más casos con el 9.1%, seguido de Tabasco, con el 8.1 % y en tercer lugar Hidalgo con el 7.8%. Con respecto al sexo, predomina el sexo femenino con el 54.9% de los casos registrados.

3 Mecanismos de la diabetes

La diabetes tipo 2 causa resistencia a la acción de la insulina por las células periféricas que se traduce en la hiperglucemia, como resultado de alta glucosa (Notkins 2002). En condiciones fisiológicas normales, la insulina se libera como respuesta a la entrada de glucosa en las células β del páncreas y es transportado por la sangre a los tejidos periféricos. Las células receptoras de insulina la detectan y conducen a la captación de glucosa por las células y su metabolismo en energía química o como energía almacenada.

4 Relación entre dieta y enfermedad

El principal macronutriente consumido en la mayoría de las dietas carbohidratos, siendo la principal fuente de calorías. La inhibición del metabolismo de los carbohidratos o absorción puede disminuir la ingesta de calorías para promover la pérdida de peso y combatir la obesidad. También es un mecanismo para reducir la hiperglucemia en sujetos diabéticos. Antes de ser absorbida por el cuerpo, los carbohidratos deben desglosarse en monosacáridos.

Antes de ser absorbida por el cuerpo, los carbohidratos deben ser hidrolizados en monosacáridos. La hidrolisis ocurre debido a dos importantes enzimas: la α -amilasa y α -glucosidasa. La α -amilasa (α -1,4-glucano 4-glucanohidrolasa, EC 3.2.1.1) es una enzima que participa en la digestión de almidón de la dieta y el glucógeno. La amilasa hidroliza los enlaces α -1,4-glicosídicos polímeros como almidón, amilosa, amilopectina varios maltooligosacáridos. La hidrolisis ocurre mediante un "ataque múltiple" en el que la α -amilasa actúa sobre los enlaces glicosídicos α (1-4) de una cadena de almidón produciendo inmediatamente la formación de maltodextrinas de bajo peso molecular, tales como maltosa, maltotriosa y maltotetraosa (Moran y col 2011; Yoon y col 2007). La digestión de los hidratos de carbono comienza en la boca (Figura 1), con la amilasa secretada por las glándulas salivales. Esta acción representa sólo alrededor del 5% de la descomposición de los carbohidratos. El proceso se detiene en el estómago debido a la alta acidez lo que conlleva a la inactividad de la amilasa. Cuando el alimento entra en el intestino, el pH ácido se neutraliza por la liberación de bicarbonato secretada por el páncreas y por la mucosa que recubre las paredes del intestino

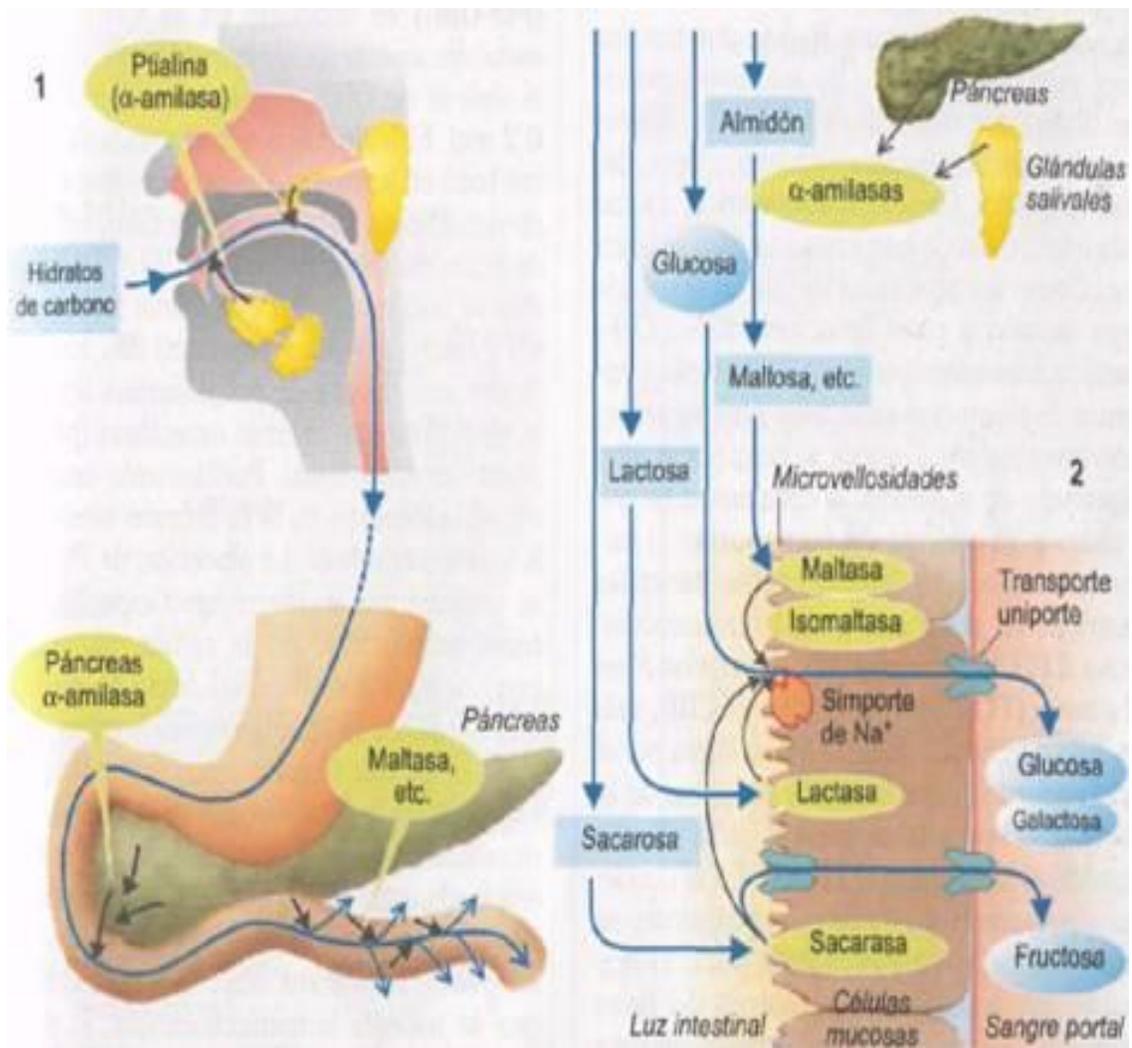


Figura 1. Proceso de digestión de los carbohidratos

. La amilasa es secretada en el intestino delgado por el páncreas. Las enzimas α -glucosidasa se encuentran en el borde de las vellosidades del intestino delgado. La amilasa descompone los carbohidratos en oligosacáridos. Las enzimas glucosidasa (incluyendo lactasa, maltasa y sacarasa) completan el desglose unidades y liberación de monosacáridos. Sólo las unidades de monosacáridos son absorbidos por el cuerpo en el intestino delgado (Obiro 2008).

Aquellos carbohidratos de la dieta que se componen en su mayoría de unidades de monosacáridos son absorbidos con mayor rapidez y llegan más rápido al torrente sanguíneo, es por ello que se dice que poseen un "alto índice glucémico". Los carbohidratos en forma polimérica se absorben más lentamente y se dice que tienen un "índice glucémico bajo". El índice glucémico (IG) se define como el área bajo la curva incremental de glucosa en sangre después de la ingestión de un alimento, expresada como un porcentaje del área correspondiente después de una carga equivalente de un carbohidrato de referencia, ya sea (trigo) glucosa o pan blanco (Mahmood 2014). Los alimentos con IG bajo (<55) son las verduras, yogur sin azúcar y los espaguetis de proteína enriquecida. Algunos ejemplos de alimentos de IG alto (> 70) son el pan blanco, papas al horno y los lácteos. Después de consumo de alimentos de IG alto, hay un aumento grande, rápido en los niveles de azúcar en la sangre, y en respuesta, se observa un rápido aumento en los niveles de insulina. La insulina promueve la captación de glucosa de la sangre a las células en el hígado y el tejido muscular esquelético para luego almacenarla como glucógeno. La insulina también aumenta la síntesis de ácidos grasos y puede resultar en la acumulación de lípidos. La acumulación de lípidos en el músculo esquelético y el hígado está

asociada con una disminución de la sensibilidad a la insulina. Dicha resistencia a la insulina aumenta la probabilidad de desarrollar diabetes tipo 2 y enfermedades del corazón. Hiperglucemia postprandial y resistencia a la insulina se cree que desempeñan un papel central en el desarrollo y progresión de la enfermedad cardiovascular en sujetos con la intolerancia a la glucosa (Barclay y col 2008; Brand-Miller y col 2009).

El riesgo de incidencia de diabetes aumenta al doble cuando se padece de sobrepeso y se triplica cuando se padece obesidad. Siendo, aproximadamente, el 80% de los pacientes de diabetes obesos. La aparición de diabetes está vinculada con el estilo de vida sedentario, factores dietéticos, el estrés, la urbanización y factores socioeconómicos (OMS1990). Debido a que la absorción de carbohidratos es más lenta en la parte intestinal se han desarrollado medicamentos que evitan la hidrólisis de carbohidratos limitando su absorción.

C ESTRATEGIAS CONTRA DIABETES

1 Inhibidores enzimáticos

Existen algunos productos que ayudan a minimizar la digestión del almidón impidiendo su completa degradación y absorción en el intestino, usando sustancias que permitan mantener un control de dichas enfermedades (Jiang y col 2008; Tormo y col 2004). Una alternativa para una dieta con un IG bajo es a través del uso de algunos productos que actúan sobre las enzimas responsables de la digestión inhibiéndolas provocando una absorción más lenta de los hidratos de carbono. Un método beneficioso para el tratamiento de la diabetes y la obesidad es evitando la absorción de azúcar en el intestino delgado. Entre las que se encuentran los

inhibidores de α -glucosidasas, que inhiben la hidrólisis de los hidratos de carbono en el tracto digestivo y retrasan su absorción o inhibidores de α -amilasa que inhiben la degradación de carbohidratos complejos a nivel intestinal. Los inhibidores de esta enzima pueden ser usados en el tratamiento de la diabetes y la obesidad. Algunos estudios demuestran que la inhibición de la α -amilasa ayuda a que los niveles de glucosa en sangre en pacientes diabéticos sean más bajos (Da Ros y col 2005; Preuss 2009).

2 Inhibidores enzimáticos comerciales

Existen tres inhibidores de alfa amilasas en el mercado: acarbosa, viglitol y miglitol, sin embargo, estos medicamentos sintéticos tienen efectos adversos como distensión abdominal, flatulencias y posible diarrea (Bros y Pegragós 2007; Córdova-Villalobos y col 2008).

El primer inhibidor de α -amilasa y α -glucosidasa comercializado fue acarbosa. La acarbosa en concentraciones micromolares es un inhibidor de α -amilasa y α -glucosidasa, además de que se ha demostrado su seguridad y puede mantener su efecto a largo plazo. El efecto de la acarbosa en el control de la hiperglucemia postprandial funciona como un potencial preventivo de complicaciones metabólicas (Godbout y Chiasson 2007).

La acarbosa es un producto obtenido a partir de varias especies de *Actinoplanes* y es un potente inhibidor de la α -amilasa (Yoon y Robyt 2003). La acarbosa es un seudotetrasacárido, [4,5,6-trihidroxi-3- (hidroximetil) -2-ciclohexen-1-il] en el extremo no reductor, ligado al nitrógeno del ácido 4- amino-4,6 -didioxi-D-glucopiranososa (4-

amino-4-desoxi-Dquinovopiranosas), unido a una molécula de maltosa por enlace α -1-4 (Figura 2). Se ha postulado que el mecanismo de la inhibición de α -amilasa es debido al anillo de ciclohexeno insaturado y el nitrógeno glucosídico, que se protona, por lo general, para dar un átomo de nitrógeno cargado positivamente. La estructura, se piensa, imita el estado de transición para la escisión de enlaces glicosídicos.

3 Fitoquímicos con propiedades hipoglucémicas

En la actualidad, algunos inhibidores de la α -amilasa disponibles en el comercio se extraen del trigo o del frijol común blanco (*Phaseolus vulgaris*). Dicho inhibidor interfiere en la hidrólisis del almidón y por lo tanto reducen los niveles de glucosa sanguínea. En humanos, los inhibidores de amilasa han mostrado disminuir la absorción de los carbohidratos al reducir su actividad intestinal, usándose complemento en el tratamiento de éstas enfermedades (Rodríguez-García 2014).

Inhibidores de la α -amilasa naturales ofrecen un enfoque terapéutico atractivo para el tratamiento de la hiperglucemia por la disminución de la liberación de glucosa a partir de almidón. Randhir y Shetty (2007) mostraron que los extractos de fenólicos obtenidos de frijol mungo tratado con fermentación en estado sólido producen la inhibición de amilasa. Estos hallazgos sugieren que los fenólicos pueden jugar un papel en la mediación de la inhibición de amilasa y por lo tanto tienen el potencial de contribuir al control de la diabetes tipo 2 (Correia y col 2004). Ranilla y col (2010) investigaron diferentes plantas de América Latina para sus perfiles fenólicos, asociando la actividades inhibitoras de la α -glucosidasa los fenólico total y su actividad antioxidante de las plantas medicinales.

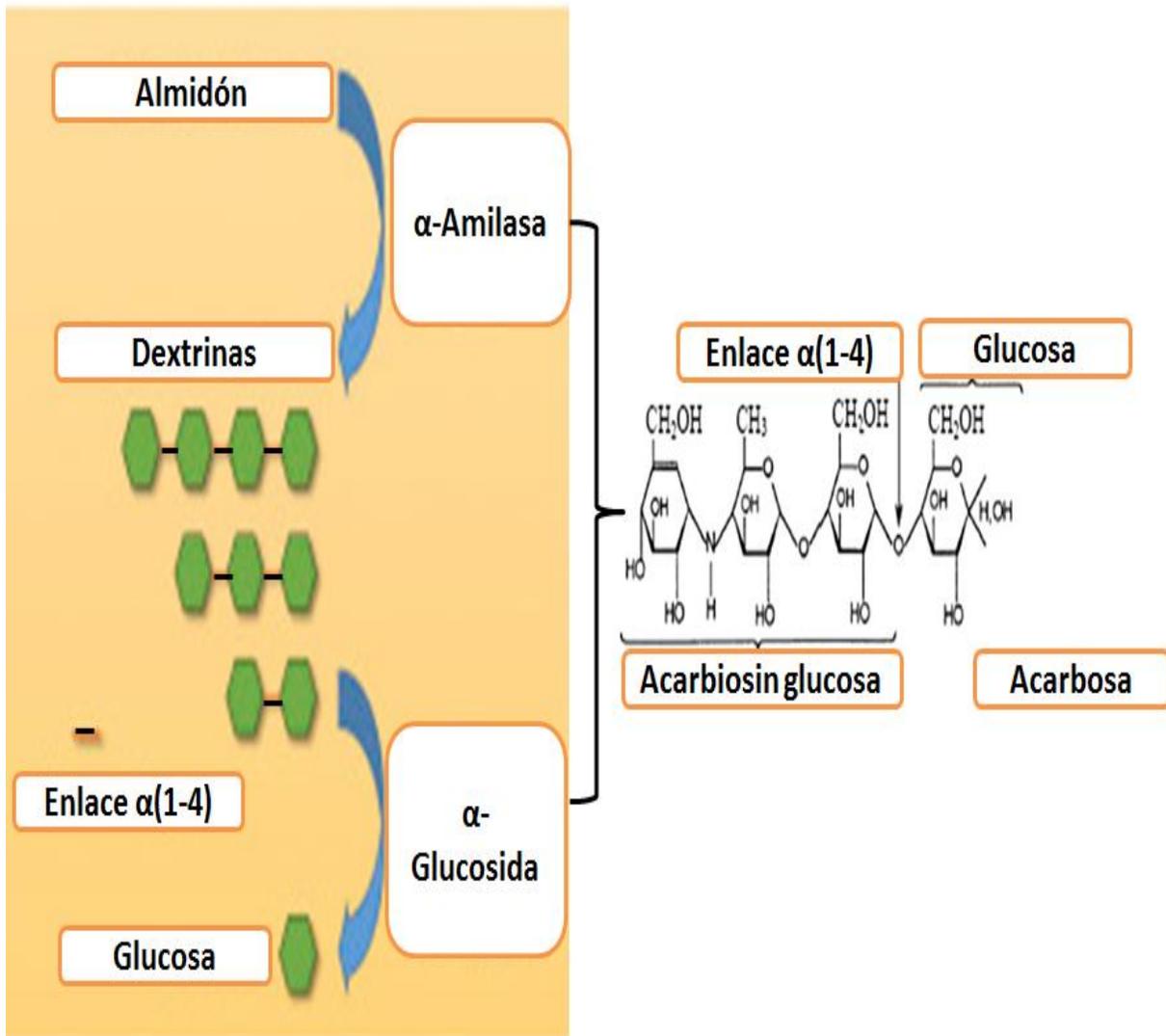


Figura 2. Hidrolisis de carbohidratos e inhibición por acarbosa

Wongsa y col (2012) evaluaron el efecto de los fenólicos en extractos de plantas de Tailandia, relacionando la inhibición de α -glucosidasa con el contenido de fenólicos totales. Por ello, ha surgido interés en obtener inhibidores enzimáticos naturales, siendo las leguminosas una buena fuente de fitoquímicos con capacidad inhibitoria, como el frijol común.

D ALIMENTOS FUNCIONALES

1 Definición

Los alimentos funcionales son alimentos no procesados o procesados que se asemejan a los tradicionales, pero que se diferencian de ellos ya que contiene ingredientes que desempeñan un papel específico en las funciones fisiológicas del organismo humano, ofreciendo beneficios más allá de su valor nutrimental y energético (Hasler 2002). Dentro de las principales funciones de estos alimentos están relacionadas con la actividad normal de los sistemas cardiovasculares, prevención de enfermedades hepáticas y protección del sistema gastrointestinal, entre otros; aportando principalmente antioxidantes (Shahidi 2002; Zhao 2007). Estos ingredientes se les conocen como nutraceuticos.

2 Alimentos nutraceuticos

Los compuestos nutraceuticos son producto aislados o purificados de materiales biológicos, que provee beneficios fisiológicos y ha demostrado proporcionar protección contra enfermedades crónicas. Los nutraceuticos pueden consumirse en la dieta normal ya que, además de contener nutrientes, contienen compuestos fitoquímicos benéficos para la salud, tales como: aditivos alimenticios; suplementos vitamínicos y minerales; alimentos completos; hiervas; fitonutrientes y probióticos y

pueden ser obtenidos de fuentes animales, vegetales, marinas y microbianas (Shi y col 2002).

Existen muchos compuestos que son investigados debido a sus propiedades nutraceuticas, con especial interés en sus capacidades antimutagenicas, anticarcinogénicas y antioxidantes (Liu 2004).

a Compuestos antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos que pueden donar electrones fácilmente o un átomo de hidrogeno a un radical hidróxido o alcoholóxico para terminar una reacción peroxilipidica en cadena o para generar un compuesto fenólico, que puede quelar metales prooxidantes (Cuadro 1). Los antioxidantes al estar presentes en bajas concentraciones comparadas con sustrato oxidable (grasas, proteínas, carbohidratos, ADN) retardan o previenen su oxidación (Cuadro 2) (Halliwell y Gutteridge 1998). Algunas investigaciones han evaluado el efecto de diversos procesamientos sobre la capacidad antioxidante de cereales y leguminosas. Reyes-Bastidas (2008) estudió el efecto de la fermentación en estado sólido (FES) sobre la capacidad antioxidante de garbanzo y frijol para consumo humano. Observaron que la FES incrementaba el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de estos granos. Esta investigación sugiere que la harina de tempe de frijol y garbanzo pudiera ser empleados solos o mezclados con cereales, para la elaboración de alimentos para consumo humanos de alto valor nutricional/nutraceutico y causar gran aceptabilidad.

Cuadro 1. Clasificación de antioxidantes según su sitio de acción.

Intracelular	Membrana	Extracelular
Superóxido dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	β -carotenos	Transferinas
Peroxidasa	Ubiquinol-10	Latoferroinas
DT-deafarasa		Albúminas
GSH		Vitamina C
Proteínas que ligan metales		Haptoglobulinas
Sistemas proteolíticos		Ácido úrico
Vitamina C		Vitamina E

Veneteo-Gutiérrez (2002).

Cuadro 2. Clasificación de antioxidantes según su origen

Origen	Acción
Exógenos	
Vitamina E	Neutraliza el oxígeno singulete Captura radicales libres hidroxilo Captura O ₂ Neutraliza peróxidos
Vitamina C	Neutraliza el oxígeno singulete Captura radicales libres hidroxilo Captura O ₂ Regenera la forma oxidada de la vitamina E
β-carotenos	Neutraliza el oxígeno singulete
Flavonoides, licopenos	
Endógenos	
Enzimáticos	
Superóxido dismutasa	Cofactor
Catalasa	Cobre, sodio, manganeso
Glutación peroxidasa	Hierro
	Selenio
No enzimáticos	
Glutación	Barreras fisiológicas de oxígeno a las células
Coenzima Q	
Ácido Tioctico	Transportadores de metales (transferina y ceruloplasmina)

Venero-Gutiérrez (2002)

1) Evaluación de la actividad antioxidante

La acción protectora de frutas y vegetales ha despertado el interés en la evaluación de la actividad antioxidante de estos alimentos y su relación con los beneficios que aporta a la salud como las vitaminas (ácido ascórbico, α -tocoferol y β -tocoferol) (Prior y Cao, 2000). Sin embargo, numerosos estudios reportan mayor actividad antioxidante de compuestos como taninos, fenoles, flavonoides isoflavonas, flavonas, antocianinas, catequinas e isocatequinas que en vitamina C, E y β -caroteno (Kahkonen y col, 1999). Xu y Chang (2007) realizaron estudios en frijol, chícharo, lenteja y garbanzo y reportaron que la composición fenólica de los extractos hidrofílicos de las leguminosas está relacionada con su actividad antioxidante. Mora-Rochin y col (2010) estudiaron el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de tortillas producidas a partir de maíces pigmentados procesados por nixtamalización y extrusión. Reportaron que las tortillas preparadas con diferentes maíces elaboradas por el método de nixtamalización y extrusión presentaban diferentes compuestos fenólicos, ácidos ferulícos, antocianinas y actividad antioxidante.

E FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L)

1 Origen

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) pertenece a la familia de FABACEAE, tribu Phaseolus, subfamilia Papilionoideae. El frijol común forma parte de la familia de las leguminosas, ampliamente distribuidas por todo el mundo. Es de gran importancia en Latinoamérica y África ya que forma parte de la alimentación básica de la población,

su consumo junto con el maíz satisface en gran parte los requerimientos básicos necesarios para la alimentación. Es la segunda leguminosa con mayor producción y consumo a nivel mundial. En México, es la segunda fuente de proteínas, carbohidratos, vitaminas (ácido fólico, niacina y tiamina) y minerales (Fe y Zn) (Herrera-Hernández y col 2014).

La semilla puede ser de forma redonda, elíptica, algo aplanada o redonda-alargada y de una gran variedad de colores. En la zona norte de México se consume las variedades azufradas, que se cultivan principalmente en Sinaloa mientras que una gran parte de frijol negro se cultiva en Nayarit y Zacatecas, con una demanda mayormente concentrada en las zonas centro y sur del país.

La mayoría de las variedades de frijol cultivados en Europa, Estados Unidos y México pertenecen al género *Phaseolus*. Este género comprende un amplio número de especies que incluyen hierbas anuales, perennes, erectas y volubles. Se conocen 180 especies del género *Phaseolus*, de los cuales 126 provienen del continente americano, 53 del sur de Asia y oriente de África, 2 de Australia y 1 de Europa (Adams y col 1985; AMSDA 2007).

2 Estructura del grano de frijol.

La semilla de frijol ésta compuesta de dos partes: la testa (cascara) y dos cotiledones (Figura 3). La testa sirve como barrera protectora entre los cotiledones y el exterior. A su vez, el frijol pose otras características físicas externas como el hilio (hillum), el micrópilo y rafe. El hilio es una cicatriz ovalada, que se encuentra a la

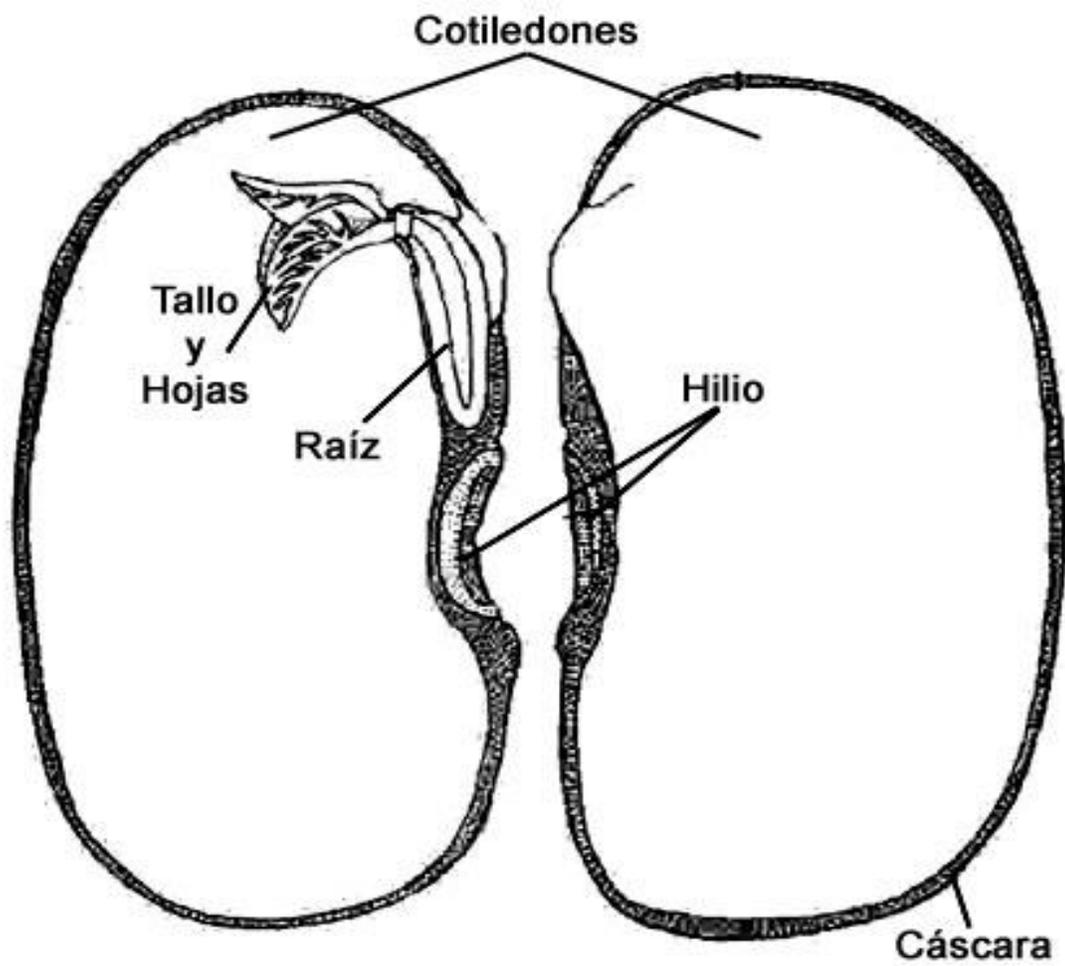


Figura 3. Estructura del grano de frijol.

mitad de una orilla y es lo que queda al separar el pedúnculo de la vaina. La testa y el hilio han sido relacionados con la permeabilidad al agua de las semillas de leguminosas. La estructura y composición de la testa (taninos y fibra dietaria) parece tener una gran influencia en la calidad de cocción de las leguminosas (Cárabez-Trejo y col 1989). El micrópilo es una pequeña abertura del grano, a un lado del hilio. El rafe es una pequeña costilla al lado del hilio, opuesta al micrópilo y representa la base del pedúnculo. (Cubero 1987).

3 Composición y valor nutritivo

Las leguminosas son una fuente importante de energía y nutrientes en el mundo, en especial países en desarrollo. La disponibilidad de nutrientes en las leguminosas depende de su contenido y factores tales como manejo poscosecha, métodos y condiciones de procesamiento, presencia de factores antinutricionales y/o tóxicos y posibles interacciones de nutrientes con otros compuestos (Salunkhe y col 1989). Las semillas contenidas por cada 100 g de semillas secas: 62.9 g de carbohidratos, proteínas 22.4 g, 44.12 g de almidón resistente, 6.9 g de fibra, 61 mg catequinas, 56 mg saponinas, 45 mg antocianinas, quercetina 31 mg, inhibidores de tripsina 7 mg, 4 mg fasina, ácido fítico 3 mg. Además de ser una buena fuente dietética. Además de ser una fuente de vitaminas hidrosolubles (tiamina, riboflavina, niacina, piroxina y ácido fólico) y minerales (Ca, Fe, Cu, Zn, K, P y Mg) y ácidos grasos poliinsaturados (Cuadro 3) (Sathe y col 1985).

Cuadro 3. Composición química en granos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L)(% bs)

Indicadores	Contenido	Requerimientos mínimos diarios (mg/día) (2-5 años)
Proteína	14-33	
Lípidos	2-7.5	
Fibra total	14-21	
Insoluble	8-13	
Soluble	3-8	
Cenizas	3-5	
Carbohidratos	52-76	
Almidón total	52-76	
Almidón resistente	35-60	
Digestibilidad (%)	52-75	
Relación de eficiencia proteica	0.7-2	
Aa esenciales (g/100 g proteína)		
Fenilalanina + Tripsina	5-8.55	6.3
Isoleusina	3-6	2.8
Leucina	5-10	6.6
Lisina	6-8	5.8
Metionina + Cisteína	1-3	2.5
Treonin	3.5-7	3.04
Triptófano	1.23	1.1
Valina	3.5-7	3.5
Histidina	2.45	1.9
Vitaminas (mg/100g)		
Tiamina (B1)	0.81-1	2
Riboflavina (B2)	0.1-0.3	2
Niacina (B3)	1-3	0.02
Piridoxina (B6)	0.3-0.6	2
Ácido fólico	0.2-0.6	0.5
Minerales (mg/100g)		
Calcio	9-200	800-1000
Cobre	0.7-1	
Fósforo	460	800-1000
Hierro	4-8	15
Magnesio	200	300-400
Zinc	2-4	15

Paredes-López 2006.

a Proteína

Se ha reportado contenidos de proteína del 14- 33% (Paredes-López 2006). La proteína de frijol se caracteriza por su deficiencia en aminoácidos azufrados y triptófano (Bressani y Blanco 1991). Su variedad genética de proteínas depende, además de genes que controlan la síntesis y acumulación de proteínas, de genes que controlan el suministro de nutrientes, vigor de la planta, maduración, tamaño y rendimiento de semillas y la acumulación y síntesis de almidón de la semilla. Su localización geográfica y época del año juegan un papel importante en el contenido proteína (Obsnorn 1988).

Las principales proteínas en la semilla de frijol son faseolinas, lectinas y arcelinas (Obsnorn 1988). Las faseolinas representan del 40-60% de las proteínas totales del frijol. Son solubles en soluciones de NaCl al 0.5 M a casi cualquier pH; presentando tres coeficientes de sedimentación: 3.05 s (pH=12.0), 7.15 s (pH=7.0) y 18.2 s (pH=3.6), que corresponden a péptidos (44 KD), protómeros (163 KD) y tetrámeros de protómeros (653 KD). La gasolina está glicosilada con 3-5% de azúcares y contiene residuos de ácidos y amidas y un 1% de residuos que contienen azufre (Sun y Hall 1975).

Las lectinas, conocidas como hemaglutininas o fitohemaglutininas, son glicoproteínas de origen no inmune. Presentan actividad aglutinante debido a interacciones entre sitios de unión de la lectina y carbohidratos de glicoproteínas o glicolípidos (Goldstein y col 1980). Nutricionalmente, tienen la capacidad de fijarse a receptores de la pared intestinal produciendo interferencia en la absorción de

nutrientes (Sathe y col 1985). Son consideradas proteínas de reserva del grano y representan el 10% de la proteína total.

Las arcelinas pueden encontrarse en líneas que contienen faseolina y lectinas; precipitan como proteínas G-2, aunque se ha reportado su presencia en albuminas y globulinas . Poseen subunidades de 35 KD y 42 KD, dependiendo de la variedad. Su composición química se parece a las lectinas, aunque las arcelinas contienen más metionina, cisteína y residuos básicos de aminoácidos y residuos glucosilados (Obsorn y col 1988).

1) Calidad proteínica

Está influenciada por el patrón de aminoácidos y la digestibilidad así como la cantidad y calidad de otras proteínas consumidas. Presenta baja digestibilidad *in vitro* debido a la presencia de inhibidores de proteasas, los complejos almidón-proteína, las interacciones proteína-proteína y la presencia de fitatos y taninos (Bressani, 1975). La digestibilidad del frijol fresco oscila de 25 a 60%, pero el frijol cosido presenta un digestibilidad de 65 a 80% dependiendo de la variedad y del método de cocción utilizado.

b Carbohidratos

Los carbohidratos representan la principal fracción de los granos de leguminosas, varía entre 50-60% del peso en base seca. Los polisacáridos más importantes en las leguminosas son el almidón (35-60%), siendo este el principal, los polisacáridos de la pared celular o fibra cruda (3-10%) y los oligosacáridos de la familia de las rafinosas (2-6%). Además de sustancias pépticas, xiloglucanos y arabigalactanos (Reddy y Col

1984; Sathe y col 1985). El contenido de fibra dietaría varia de 14-19% del peso en base seca, se ha reportado que tiene efectos benéficos en la reducción del colesterol en la sangre. La fibra dietaría consta de dos fracciones: soluble (pectinas, hemicelulosa y otros polisacáridos) e insoluble (lignina, celulosa y alguna hemicelulosas). (De León y col 1989).

c Lípidos

El contenido de lípidos del frijol varía de 1-3%. Los lípidos neutros se encuentran en mayor proporción (32-35%); los fosfolípidos son componentes importantes de la membrana y representan el 28-34% de los lípidos en la semilla.. los ácidos grasos insaturados representan el 65-87% de los lípidos totales; oleico (7-12%), linoleico (21-28) y linolénico (37-54%); entre los ácidos grasos saturados el más importante es el palmítico (10-15%). El contenido de lípidos puede variar dependiendo los climas, condiciones ambientales y el tipo de suelo (Paredes-López y col 2006; Campos-Vega y col 2010).

d Vitaminas y minerales

El frijol es fuente importante de vitaminas solubles, como tiamina (0.86 a 1.12 mg/100g), riovoflavina (0.136 a 0.266 mg/100g), niacina (1.16 a 2.68 mg/100g), vitamina B₆ (0,338 a 0.636 mg/100g) y ácido fólico (0.171 a 0.579 mg/100g). También contiene una cantidad importante de minerales como Ca (0.09 a 0.2%), Fe (3.83 a 7.55 mg/100g), Zn (2.2 a 4.4 mg/100g), P (0.46%), K (1.54%), Mg (0.20%). (Sathe y col 1985).

e Fibra dietaría total

Las semillas de las leguminosas presentan un contenido de fibra dietaría que varía entre un 14-20%, por lo que se considera al frijol como una fuente importante de fibra dietética en la alimentación humana. La fibra se deriva de la testa, que se compone de fibra insoluble (75-89%) y de las fracciones internas del grano, que se componen de 4-6.5% de fibra insoluble y 7.5-9% de fibra dietaría soluble (Dalghetty y Baik 2003). La pared celular del cotiledón contiene polisacáridos, sustancias pépticas, celulosa y gránulos de almidón. La cubierta de la semilla (fibra exterior) contiene grandes cantidades de celulosa y pocas de hemicelulosa y pectinas (Pfoertner y Fischer 2001). La fibra de leguminosas contiene polisacáridos únicos, incluyendo la hemicelulosa arabinoxilano y pectina xilogalacturona, que presentan efectos prebióticos (Rocha-Guzmán y col 2006).

f Almidón resistente

La importancia de almidón resistente en alimentos procesados es de importancia debido a sus efectos benéficos en la salud humana, debido a las propiedades para reducir el cáncer de colon y la obesidad. Kutos y col (2003) evaluaron el almidón resistente en muestras el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) crudos sometidos a distintos métodos de procesamiento y comprobaron que la cantidad encontrada fue casi dos veces mayor en las muestras crudas en relación a las muestras sometidas a remojo y cocción. En otra investigación, Tovar y Melito (1996), al estudiar el efecto del tratamiento térmico en algunas variedades de frijoles crudos y cocidos (convencional y en la alta presión), encontraron valores de almidón resistente tres a

cinco veces mayor en las muestras cocidas principalmente por retrogradación de amilosa (Osório-Díaz y col 2003)

4 Valor nutricional

El contenido nutricional del frijol puede llegar a tener 33% de proteína; sin embargo, el nivel de digestibilidad de proteína (52 a 75%) y la relación de eficiencia proteínica (PER) (0.7-1.5) es menor comparado con la caseína, que es la proteína de referencia (digestibilidad = 90.2%). El PER mide la relación que existe entre la ganancia en peso y la cantidad de proteína ingerida (Guzmán-Maldonado y Paredes-López 1999). Las proteína del frijol presentan un contenido alto de lisina (6.4 - 7.6 g/100 g de proteína) y de fenilalanina más tirosina (5.3-8.2 g/100 g de proteína) lo que satisface los requerimientos recomendados por la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO); sin embargo, el frijol es deficiente en los aminoácidos metionina y cistina (Reyes-Moreno y Paredes-López 1993).

5 Fitoquímicos del frijol

Las semillas de *Phaseolus vulgaris* contienen componentes bioactivos tales como alcaloides, antocianinas, catequina, flavonoides, fasina , ácido fítico, quercetina , saponinas, esteroides, taninos y terpenoides y los inhibidores de la tripsina. Además de ser una buena fuente dietética. Las semillas de *Phaseolus vulgaris* tienen una gama rica y diversa de compuestos bioactivos que imparten los posibles beneficios de salud a través de actividades biológicas, tales como efecto antioxidante; anticancerígeno, anti hipercolesterolémicos; actividades actividad antidiabética y antihiperglucémicos. También se ha informado anteriormente que terpenoides, que

son componentes bioactivos precisos responsables de la actividad antidiabética de *P. vulgaris* semillas (Cuadro 4) (Lim 2012).

a Compuestos fenólicos en el frijol

Existe una gran variedad de compuestos fenólicos reportados en *P. vulgaris* lo cual se debe a las variedades, condiciones de cultivo, almacenamiento y métodos de extracción y cuantificación utilizados (Mujica y col 2009; Golam y col 2011) estudiaron 29 variedades de frijol común de diferentes colores y orígenes. Observaron que el contenido de antocianinas, polifenoles y la actividad antioxidantes variaba ampliamente.

1) Flavonoides

Son los compuestos fenólicos primarios en el frijol integral y testa (Aparicio-Fernández y col 2005). El grupo de flavonoides de mayor distribución en el frijol incluyen proantocianidinas. Se ha reportado la presencia de antocianinas en frijol de color negro y azul-violeta (Aparicio-Fernández y col 2005; Lee y col 2008). Recientemente diversas clases de frijol se diferencian por la presencia de 3 antocianinas (delfinidina, petunidina y alvidina) en frijoles negros; Kaempferol en pintos (incluyendo Othello); y quercetina y Kaempferol en frijol rosa; los flavonoides se detectaron en menor cantidad en frijol blanco (Heimier y col 2005).

2) Taninos

Se encuentran en mayor proporción en la testa y en pocas proporciones en los cotiledones; poseen pesos moleculares 500-5000 daltones, con grupos hidroxilo que.

Cuadro 4. Fitoquímicos en granos de frijol común

Fitoquímicos	Cotiledones	Testa
Catequina (mg/mg de proteína) ¹	0.4	
Saponinas (mg/mg de proteína) ¹	0.4	
Antocianinas (mg/mg de proteína) ^{1,3}	0.01-0.03	
Quercetina (mg/mg de proteína) ¹	0.03	
Inhibidores de tripsina ¹	0.005	
Inhibidores de α -amilasas UIA ^a /mg de proteína ³	0.09-0.4	
Ácido fitico (%) ^{2,3}	0.5-1.6	
Lectinas (UAH ^b /mg de proteína) ³	8.57	
Flavonoides (mgEC ^c /g) ^{1,2,3,4}	2-2.49	
Taninos solubles (mg/g) ^{1,2,3,4}		8-27.9
Taninos insolubles (mg/g) ^{1,2,3,4}		1.5-5.4
Taninos totales (mg/g) ^{1,2,3,4}		10.7-30.9
Monómeros de galocatina (mg/g) ²		14.9-49.1
Monómeros de afzelequina (mg/g) ²		1.51-32.8
Ácidos fenólicos (mg/100g) ³		
<p>ρ-Cumárico</p>	1.7-17	
Ferúlico	9.4-26.6	
Sinápico	3.5-30.4	
Totales	19.1-48.3	
Lignanós (µg/100 g muestra bs) ³		
Secoisalariresinol	70-85	
Enterodiol	53-266	
Enterlactona	173-864	
Totales	223-1956	

¹Ocho-Anin y col, 2010; ²Díaz y col, 2010; ³Campos-Vega y col, 2010; ⁴Xu y Chang, 2007

^aUIA: unidad inhibitoria de alfa amilasa definida como la disminución en un 50% de la actividad de la enzima a 37°C/5min después de adicionar almidón al 1%; ^bUAH=Unidades de actividad hemaglutinante; ^cEC=Equivalentes de catequina

forman redes estables con proteínas. Los taninos han sido divididos en taninos hidrolizables y condensables. Los taninos interactúan con las proteínas formando taninos-proteínas y provocando la inactivación de enzimas digestivas e insolubilidad de las proteínas. De acuerdo a Aparicio-Fernández y col (2005) las harinas de cotiledones y testas de frijol crudo sin tratamiento contienen 13.7 ± 1.2 y 222.41 ± 16 mg de taninos condensados equivalentes de catequina/g, respectivamente. Díaz y col (2010) obtuvieron en un estudio que el promedio general de taninos condensados en la testa del frijol común eran del 20.4%. Estos compuestos contienen catequina (60.3%), galocatequina (25%) y afzelequina (14.7%) como unidades monoméricas.

Existen variaciones en los contenidos de taninos de acuerdo a la variedad del frijol. Los taninos son metabolitos secundarios por lo que su presencia se ve afectado por las condiciones ambientales (Naczki y Shahidi 2006). Se cree que los tratamientos de cocción reducen el contenido de taninos después de someterse a tratamiento térmico. De acuerdo a Aparicio-Fernández y col (2005), los taninos se reducen un 70% después de la cocción del frijol por 2.5 h a temperatura de ebullición.

3) Isoflavonas

Las isoflavonas son fitoestrógenos que pueden actuar como los estrógenos y reducir las molestias de la menopausia. Las isoflavonas están presentes solo en alimentos de origen vegetal, siendo las leguminosas, en especial la soya (*Glycine max*) y en menor grado el frijol (*Phaseolus vulgaris*) fuentes de isoflavonas (Messina,

1999). El carácter de alimentos funcionales de leguminosas está fuertemente marcado por la presencia de fitoquímicos (Franke y col 1994).

En su estructura general, las isoflavonas presentan dos los bencénicos (identificados como anillos A y B) con grupos hidroxilos, cuyo número y ubicación varia. El anillo está unido, en forma condensado, con un pirano. El anillo B se une al de pirano en posición 3, unión que define al compuesto como isoflavona. Son cuatro las principales isoflavonas: genistin daidzin, genisteina y daidzeina. Las dos últimas son las que están presentes en leguminosas, especialmente en soya (*Glycine max*) y sus derivados y en *Phaseolus vulgaris* (Messina 1999).

Se le atribuidos beneficios a la salud a la isoflavonas por una ingesta apropiada de leguminosas como parte de una dieta balanceada. En poblaciones que tienen alto consumo de alimentos que contienen isoflavonas, se ha detectado una baja incidencia de cáncer, por su actividad antimutagenica y anticancerígena. Sin embargo, se requieren mayores estudios epidemiológicos para aclarar los mecanismos celulares de acción de las isoflavonas y su incidencia en la prevención de enfermedades. Todas estas acciones beneficiosas atribuidas a los compuestos fenólicos acentúan la importancia de las leguminosas como potenciales alimentos funcionales (Sangronis y col 2002).

La fermentación de leguminosas parece afectar la estructura de las isoflavonas. Chiou y Chen (2001) determinaron que los contenidos de genisteina y daidzeina aumentaban en soya cuando era remojadas en agua durante 4 h y que a su vez, el

contenido de genistin y daidzin (isoflavonas glicosidadas) disminuía. El mismo comportamiento fue observado cuando las semillas fueron cocidas con vapor, inoculadas con *Aspergillus oryzae* e incubadas a 28°C por 3 días. Los resultados demostraron que las enzimas tipo β -glucosidasas provenientes de la soya como de *Aspergillus oryzae* hidrolizan las isoflavonas glicosidadas produciendo genisteína y daidzeína. Dueñas y col (2012) estudiaron el efecto de la fermentación sólida de la soya usando como inóculo *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oryzae* y de *Bacillus subtilis* en compuestos fenólicos bioactivos. El proceso de fermentación produjo cambios importantes en los compuestos flavonoides, con una formación significativa en el contenido de agliconas de isoflavona tales como daidzeína, gliciteína y genisteína como consecuencia de la actividad glucosidasa de los microorganismos en este proceso.

b Saponinas

Las saponinas son metabolitos secundarios de las plantas que existen en una amplia variedad de leguminosas comestibles (Shi y col 2004). Están presentes en pequeñas cantidades en el frijol común, aproximadamente siete veces menor que en comparación con la soja. Estas son moléculas anfifílicas unidos a una aglicona triterpenoides e hidratos de carbono unidos a través de enlaces éter y éster en uno o más sitios de glicosilación. Se pueden dividir en los grupos A, B o E sobre la base de las estructuras de agliconas. Saponinas A tienen grupos glicosilos unidos a las posiciones C-3 y C-22 de la aglicona, mientras que los que pertenecen a los grupos B y E están glicosiladas sólo en la posición C-3. Grupo E saponinas contienen una

cetona en C-22 en lugar del grupo hidroxilo que se encuentra en homólogos que pertenecen al grupo de las saponinas B. Los grupos B también existen en la planta en forma de conjugados de 2,3-dihidro-2,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona (DDMP) en C-22. Los conjugados DDMP son térmicamente lábiles y pueden ser fácilmente degradados debido a su relativamente débil enlace covalente (Guajardo-Flores y col 2012). Las saponinas se han demostrado aumentar los esteroides fecales en el hombre y en los animales experimentales y en algunos casos para reducir el colesterol en plasma, probablemente como resultado de la unión de ácidos biliares (Yoshiki y col 1998).

En un estudio de Chávez-Santoscoy y col (2013) evaluaron el efecto de los flavonoides y las saponinas del frijol negro (*Phaseolus vulgaris L*) en el control del colesterol. Ellos encontraron una correlación positiva en la inhibición del colesterol micelar soluble y su absorción, relacionando al grupo B de las saponinas con la fracción con mayor inhibición de colesterol micelar soluble. Demostrando que la reducción de colesterol depende mayormente de las saponinas conjugadas al grupo C-22

c Factores antinutricionales del frijol común

El ácido fitico obstaculiza la biodisponibilidad de los minerales (calcio, zinc, hierro y magnesio) debido a su fuerte poder quelante, por estas razones, la biodisponibilidad de otros minerales, como hierro, calcio y magnesio también puede mejorar durante la fermentación. El ácido fitico se encuentra localizado en los

cotiledones con escasa o nula presencia en testa, siendo la principal reserva de fosforo, representa el 80% del mismo (Reddy y col 1984).

Los valores de ácido fitico en los frijoles son de 0,6 a 2.7% en los cotiledones (Campos-Vega y col 2010). La interacción de ácido fitico-proteína es uno de los principales factores que merman el valor nutricional de estos (Knuckles y col, 1985). Se sabe que el ácido fitico inhibe enzimas como pepsina, α -amilasa y tripsina. El ácido fitico tiene propiedades quelantes ligando minerales y volviéndolos insolubles o parcialmente disponibles, principalmente zinc y calcio (Maga, 1982). Las sales de ácido fitico (fitatos) han sido usadas en la reducción de colesterol y otros lípidos debido a su presencia en dietas altas en fibra (Campos-Vega y col 2010).

En las leguminosas los inhibidores de proteasa se encuentran en los cotiledones. Son abundantes en cereales y leguminosas crudas, pero pueden ser inactivadas por tratamientos hidrotermicos (Champ 2002), Iniesta-González y col (2005) evaluaron 16 variedades de frijol común y encontraron que los frijoles de colores, negros y rosados presentan valores altos de inhibidores de tripsina que variedades de colores dorado o café, blanco y amarillo. El contenido de inhibidores de α -amilasas difiere mucho entre las leguminosas, encontrando en frijoles secos la mayor concentración de inhibidores.

Se ha comprobado que los principales causantes de flatulencia en el frijol común son el almidón resistente, los oligosacáridos de la familia de la rafinosa y los compuestos de la fibra. Las rafinosas no son digeribles y no se absorben debido a la carencia de α -1-6-galactosidasa, siendo entonces utilizados y metabolizados por la

microflora del intestino. Un estudio por Reddy y col (1984) señalan que el contenido de oligosacáridos varía de 2 a 6% en frijol. Estaquiosa fue el α -galactósidos predominante en muestras de frijol. La rafinosa también estaba presente en cantidades significativas, pero verbascosa, glucosa y fructosa no se detectaron en las muestras. Las concentraciones observadas para la digestibilidad de la proteína y factores antinutricionales, variaron significativa entre las variedades (Lim 2012).

6 Actividad antioxidante del frijol

Las actividades químicas de polifenoles en términos de sus propiedades como eliminadores de radicales libres (antioxidantes) es determina por su reactividad como un agente donador de electrones, el destino del antioxidante que se rige por su capacidad de estabilizar el electrón no apareado, su reactividad con otros antioxidantes y su potencial quelante. Los polifenoles poseen una estructura química ideal para las actividad contra radicales libres, y han demostrado ser antioxidantes más eficaces *in vitro* que las vitaminas E y C sobre una base molar. Además, la quelación de metales, como el hierro y cobre, apoya el papel de los polifenoles como antioxidantes preventivos en términos de inhibición de metal de transición que catalizada la formación de radicales libres (Rice-Evans y col 1997).

Muchos documentos demuestran que algunos compuestos en el frijol tienen capacidad antioxidante, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, como vitamina C y E, carotenoides, flavonoides y otros compuestos polifenólicos (Saura-Calixto y col 2007). Entre los polifenoles con capacidad antioxidante destacan los flavonoides, los ácidos fenólicos (hidroxinámico, hidroxibenzóicos, cafeícos, clorogénicos), taninos,

chalconas y curmarinas. Los cuales contribuyen a la fracción polifenólica de una gran diversidad de alimentos, incluyendo las leguminosas (Martínez-Flores y col 2002), demostrando además, su gran potencial como antimutagénicos (Cardador-Martínez y col 2002)

Los polifenoles contenidos en el frijol actúan como antioxidantes, los cuales pueden tener efecto atrapando radicales libres que puedan dañar moléculas. Los compuestos fenólicos en la testa del frijol poseen actividad antioxidante, antimutagenica (Aparicio-Fernández y col 2006) y anticarcinógenicas. Los taninos, compuestos de la familia de los polifenoles. Iniesta-Gonzáles y col (2005), demostraron, al evaluar cultivos de frijol común con testa de diferentes coloraciones, que existe una relación directa entre el color de la testa y la concentración de taninos (3.5–115.4 mg/g en base seca) y que ésta a su vez, se relaciona con la actividad antioxidante detectada en el material de estudio, siendo el frijol Flor de Mayo y pinto.

Por otro lado, las lectinas del frijol disminuyen el crecimiento de linfomas y pueden ser utilizadas para el diagnóstico como marcadores de tumores al identificar células que se encuentran en etapas tempranas de diferenciación de células cancerígenas. El ácido fitico reduce el riesgo de contraer cáncer, especialmente de colon y seno (Goldschmidt 1997). Los oligosacáridos han sido señalados como importantes prebióticos que alteran favorablemente la flora intestinal del colon y se han demostrado que limitan el crecimiento de bacterias dañinas como *Escherichia coli*, entre otras (Campos-Vaga y col 2010).

Beninger y Hosfield (2003) evaluaron la capacidad de extractos metanólicos de testa de frijol modificado genéticamente para inhibir la peroxidación de lípidos. La actividad antioxidante fue atribuida a los flavonoides, los cuales estaban directamente relacionados con el color de testa. Juan y Chou (2010) evaluaron los extractos metanólicos y etanólicos de frijol negro fermentado concluyendo que esta aumento el contenido de antocianinas y flavonoides y, a su vez, la actividad antioxidante, sin embargo, este vario con respecto a los extractos.

7 Propiedades nutraceuticas del frijol

Semillas de *Phaseolus vulgaris* tienen una gama rica y diversa de compuestos bioactivos que confieren beneficios potenciales para la salud a través de actividades biológicas, tales como la mejora del efecto bifidogénico (Queiroz-Monici y col 2005.); Antioxidante (Heimler y col 2005.); Anticancerígeno (Hangen y Bennink 2002), antihipercolesterolémico (Shutler y col 1989; Winham y Hutchins 2007), actividad contra la diabetes e hiperglucemia (Carai y col 2009; Tormo y col 2004; Ocho-Anin y col 2010).

a Antioxidante

Existen diversas investigaciones que han documentado que algunos compuestos presentes en frijol común exhiben capacidades de inhibir o erradicar el daño provocado por la formación de radicales libres tanto en líneas celulares *in vivo* como *in vitro*, demostrando además, su gran potencial como agente antimutagénico.

Cardador-Martínez y col (2002) estudiaron el potencial antioxidante en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* cv. Flor de Mayo, testa de color roja) utilizando diferentes

métodos de extracción; en extractos metanólicos, acetato de etilo/acetona y acetona, utilizando modelos *in vitro*, el β -caroteno-limoleato y el 2,2-difenil-2-priacil-diazil butanol (DPPH). La capacidad antioxidante de estas muestras se relacionó con el contenido polifenoles de manera dependiente de la dosis.

b Efectos anticarcinogénicos y antimutagenicas

Varios investigadores (Guzmán-Maldonado y Paredes-López 1998; Iniestra-Bastidas y col 2005; Xu y col 2007; Campos-Vega y col 2010) han reportado al frijol común como alimentos nutraceutico, por el papel que algunos de sus compuestos (fenólicos, fibra dietaría, ácidos grasos esenciales, etc.) tienen efectos benéficos a la salud. Se ha reportado que las que las lectinas activan el sistema inmune mediante la proliferación de linfocitos (Lyu y col 2002) y que estimulan la diferenciación de células de cáncer de colon (Jordinson y col 1999).

Oomah y col (2010) estudiaron la actividad biológica de compuestos fenólicos presentes en la testa de 4 cultivares de frijol; los compuestos bioactivos se extrajeron con dos disolventes (acetona (70%) y agua). Se evaluaron actividades antioxidante y antiinflamatoria en relación con el contenido de fenólicos. La actividad antiinflamatoria de la testa del frijol dependía del contenido fenólico y actividad antioxidante; estos dos últimos parámetros fueron afectados significativamente por los cultivos y métodos de extracción utilizados, resultando ser la acetona el mejor disolvente.

c Antihipertensiva

Actividades antihipertensivos y antioxidantes se han encontrado previamente en la proteína de frijol se concentra después de la digestión con varias preparaciones de enzimas de calidad alimentaria. Torruco-Uco y col (2009) evaluaron la actividad inhibitoria de ECA-I de hidrolizados de proteínas producidas por hidrólisis enzimática con Alcalase y Flavourzyme individualmente, obteniendo valores de IC50 de 0.061 y 0.127 mg de proteína mL⁻¹, respectivamente. Akillio glu y Karakaya (2009) evaluaron la actividad inhibitoria ECA-I de extractos de proteínas de frijoles secos comunes. Evaluaron los efectos de los diferentes periodos de tratamiento de calor y se determinaron la estabilidad de la actividad inhibitoria de ECA-I. Sus resultados revelaron que el tratamiento térmico aumenta la liberación de péptidos de la inhibidor ECA-I con valores de CI50 entre 0.78 y 0.83 mg de proteína mL⁻¹, que eran resistentes a la digestión gastrointestinal in vitro. Hernández-Álvarez y col (2013) estudiaron los hidrolizados de los granos estropeados, estos presentaban actividad inhibitoria ECA-I (IC50 0.0191 mg de proteína mL⁻¹) y eran muy similares a las de los granos de control en cuanto a la inhibición de la ECA-I.

d Propiedades antidiabéticas y antiobesidad

El frijol contiene inhibidores de amilasa conocidos, siendo la isoforma 1 de inhibidores de α -amilasas (α -AI1) la que presenta mayor actividad y se utiliza para evitar la obesidad y la diabetes (Obiro y col 2008). Existen reportes de que la ingesta de los inhibidores de α -amilasas del frijol disminuye la hidrolisis del almidón reduciendo la obesidad. Serrano y Goñi (2004) reportaron que el frijol disminuye los

niveles de glucosa sanguínea y la respuesta a insulina, atribuyéndolo al contenido de carbohidratos complejos y compuestos fenólicos. Estudios han demostrado que extractos acuosos de frijol son capaces de reducir los niveles de glucosa sanguínea en ratas normales y con diabetes. Esto puede ser atribuido al contenido de fitoquímicos solubles (Luka y col 2013).

Los efectos hipoglucémicos del frijol se han atribuido al contenido de fibra. Estudios realizados en harinas de frijol con contenido de fibra similares presentaron efectos hipoglucémicos diferentes. Sin embargo, se observó un contenido diferente de compuestos fenólicos. En un estudio en el que se le dio a ratas diabéticas un extracto acuoso rico en compuestos fenólicos de vainas de *Phaseolus vulgaris*, produjo un incremento en los niveles de insulina en el plasma. Los compuestos fenólicos se han relacionado con la regeneración de células β -pancreáticas dañadas, además disminuyen las actividades de enzimas gluconeogénicas, las cuales están incrementadas en pacientes diabéticos (Reynoso-Camacho y col 2007).

F FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO (FES)

1 Generalidades

La fermentación es un proceso antiguo de procesamiento en alimentos, la cual implica el empleo de microorganismos, tales como bacterias, levaduras y hongos filamentosos (mohos) para llevar a cabo transformaciones de la materia orgánica catalizadas por enzimas (Bourdichon y col 2012). El proceso de fermentación altera la naturaleza de los alimentos de cinco formas diferentes: (1) Enriquece la dieta

humana a través del desarrollo de una gran diversidad de sabores, aromas y texturas en alimentos; (2) Preservación de los alimentos por fermentación ácido láctica, alcohólica, ácido acética, alcalina y fermentaciones altas en sal; (3) Enriquecimiento de los alimentos con vitaminas, proteínas, aminoácidos esenciales y ácidos grasos esenciales; (4) Desintoxicación de los alimentos por el proceso de fermentación y (5) la disminución de tiempos de cocción y requerimientos energéticos (Steinkraus 2002).

La definición de fermentación en estado sólido más general y reciente plantea “que consiste en el crecimiento microbiano y la formación del producto en partículas sólidas en el ausencia (o casi ausencia) de agua, sin embargo, el sustrato contiene la suficiente humedad para permitir el crecimiento de microorganismos y el metabolismo (Pandey 2003). Hongos, levaduras y bacterias se puede utilizar en los procesos de FES, sin embargo, debido al bajo contenido de humedad en el medio de fermentación, los hongos filamentosos son los microorganismos más usados con gran potencial para producir compuestos bioactivos. Algunas ventajas de FES son: 1) menor volumen de fermentación; 2) esterilización más barata; 3) aireación facilitada; 4) menor costo al recuperar el producto o secarlo; 5) menor volumen de solventes para extraer producto; 6) reduce o elimina los costos de tratamientos de efluentes; 7) ambiente menos favorables para bacterias (Nigam y Pandey 2009).

G TEMPE

1 Características

El tempe es un producto de alto valor nutricional obtenido a partir de legumbres, principalmente la soya, por fermentación en estado sólido de semillas cocidas, también se puede utilizar frijol. Usando como inóculo el hongo *Rhizopus oligosporus*. Este produce gruesas micelas blancas, uniendo las semillas en forma de pastel compacto que se puede rebanar. El tempe es un alimento tradicional de Indonesia conocido en los países occidentales como un producto sustituto de la carne en las dietas vegetarianas, que se sirve ya sea como plato principal o como ingrediente de ensaladas. Su popularidad en Europa del Este continúa aumentando debido al creciente interés en la multicultural cocina (Nout y Kiers 2005; Dinesh y col 2009; Starzyńska-Janiszewska y col 2014).

2 Sustrato

La soya es el sustrato más común y preferido para el tempe. Sin embargo, otros sustratos como el frijol (Starzynska-Janiszewska y col 2014), frijol rojo (Chung y col 2002), cebada (Feng y col 2007), judías (Randhir y col 2007), maíz (Cuevas-Rodríguez y col 2004) han sido usadas. Los sustratos tienen algo en común: su estructura molecular (Nigam y col 2009). La estructura macromolecular (celulosa, almidón, pectinas, lignocelulosa, fibras, etc.) permiten que el sustrato adquiera propiedades de un sólido, generando una matriz inerte en donde se absorbe la fuente de carbono y energía (azúcares, lípidos, ácidos grasos y carbohidratos). En general, el sustrato debe tener una gran área de superficie por unidad de volumen

(10^3 a 10^5 m^2/cm^3), a mayor área de superficie (menor tamaño) mayor rendimiento del producto, favoreciendo el intercambio de gases (aire-humedad-dióxido de carbono) y la transferencia de calor y masa. A un tamaño menor de 10^3 m^2/cm^3 los sustratos presentan poca porosidad que limita el crecimiento y utilización de sustratos por efecto de compactación que reduce el área de superficie efectiva (Raimbault 1988).

3 Inoculo

La microflora del tempe tradicional es muy compleja, ya que es el resultado de la fermentación de una mezcla de cultivos mixtos de microorganismos, incluyendo hongos, levaduras, bacterias ácido lácticas y otras bacterias diferentes (Steinkraus 2002; Nout y Kiers 2005). Sin embargo los hongos filamentosos representan el grupo más utilizado en este tipo de fermentación, debido a sus propiedades fisiológicas, enzimáticas y bioquímicas. La facilidad de adaptación de estos microorganismos se debe principalmente al crecimiento de hifas, tolerancia a bajas actividades de agua y condiciones de presión osmótica elevadas, lo que los vuelve eficientes y competitivos para la bioconversión de sustratos sólidos (Raimbault 1988). El género de mayor importancia es *Rhizopus spp* con diferentes especies como *R. microsporus*, *R. oryzae* y *R. oligosporus* (Nout y Kiers 2005).

a *Rhizopus oligosporus*

Rhizopus oligosporus pertenece al reino Fungi, phylum Zygomycota, orden mucorales, familia mucoraceae, genero *Rhizopus*. Algunas características morfológicas, como largo del rizoide y esporangiospora, diámetro del esporangio,

forma de colmena, tamaño, forma y textura de la superficie de la esporangiospora ayuda en la diferenciación entre dichas especies (Larone 1995). Las hifas pueden o no ser septadas (6-15 μm en diámetro), las esporangiosporas son de color café y no presentan ramificación, encontrándose solas o formando racimos; los rhizoides se localizan en el punto de unión entre estolón y esporangiospora. El esporangio (40-350 μm en diámetro) se localiza en la punta de la esporangiospora unicelular, en forma redonda u ovalada, la textura es suave a estriada (Larone 1995).

El crecimiento de hifas proporciona al hongo la capacidad de penetrar en la mayoría de los sustratos solidos hasta 1 mm o 25% del cotiledón, manteniéndolos unidos (Hutkins 2006); secretando de la punta de las hifas las enzimas hidrolíticas que penetran directamente en el sustrato (Raimbault 1988).

Estos hongos tienen la capacidad de crecer muy rápido a temperaturas relativamente altas (37-45°C) y condiciones de humedad bajas (60-80%). El hongo utiliza el oxígeno disponible y produce CO_2 , el cual inhibe el crecimiento de microorganismos potencialmente contaminantes. Las variables de proceso que afectan su desarrollo son el tratamiento previo y de tamaño de partícula de sustratos, medio de crecimiento, la esterilización, contenido de humedad, actividad de agua (A_w), la densidad del inóculo, temperatura, pH, agitación y aireación (Nigam y Pandey 2009). Entre éstos, el contenido de humedad y A_w tiene un papel importante. (Pérez-Guerra y col 2003).

La combinación de pH relativamente bajos (5.3 a 4.5), agua no libre y temperaturas altas permite a *Rhizopus oligosporus* desarrollarse rápidamente; este

penetra y une al sustrato dándole forma de pastel, originando una cohesión de los granos enteros (Miskiewicz y col 2003). *Rhizopus oligosporus* se considera un microorganismo seguro (“GRAS” generally recognized as safe), por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en ingles) de los Estados Unidos de América. Además, la cepa *Rhizopus* a utilizar presenta cualidades, como biosíntesis vitaminas (vitamina B12, vitamina B6, riboflavina, tiamina, ácido nicotínico y nicotinamida) e inhibición de producción de aflatoxinas (Keuth y col 1993).

1) Actividad enzimática

Los hongos filamentosos han recibido una gran atención debido a su capacidad en la producción de enzimas termoestables de alto valor científico y comercial, tales como amilasas, pectinasas, xilanasas, celulasas, quitinasas, proteasas, lipasas, β -galactosidasas y otros (Martins Y col 2002).

La presencia de factores antinutricionales (ej. Ácido fitico) en los alimentos fermentados disminuye la biodisponibilidad de minerales, solubilidad, funcionalidad y digestibilidad de proteínas por la formación de complejos (Reddy y col 1994). Además también interactúa con enzimas como: tripsina, pepsina, α -amilasas y β -galactosidasas, como resultado una disminución de su actividad. El proceso de FES disminuye la concentración de factores antinutricionales por la acción de fitasas en el hongo, sin embargo ésta puede ser obstaculizada por valores de pH y la composición del sustrato (Eklund-Jonsson y col 2006).

Lipasas, es otra enzima sintetizada por *R. oligosporus*, responsable de hidrolizar la tercera parte de los lípidos neutros durante el proceso de fermentación. Entre las

enzimas relacionadas con la degradación del almidón se encuentran: glucoamilasas, α y β -amilasas, pululanasa e isoamulasa, siendo glucoamilasa y α -amilasas las más importantes en FES (Raimbault 1988).

4 Manufactura del tempe

El proceso involucrado en la producción de tempe difiere en un amplio rango para diferentes lugares y países, así como de otros factores (Steinkraus 1983; Nout y Kiers 2005). Las principales operaciones del proceso que difieren de acuerdo al uso de diferentes sustratos utilizados en fermentación de tempe son la selección de tratamientos óptimos previos, como descascarillado, tiempo de remojo y cocción (Roubos-van den Hil 2010).

Los procesos generales de producción y etapas para la producción de tempe son: (1) Limpieza, (2) Hidratación y fermentación láctica, (3) Descascarillado, (4) Cocción parcial, (5) Drenado/enfriado, (6) Inoculación, (7) Colocación en contenedores e (8) Incubación.

b Limpieza

Esta etapa es llevada a cabo para remover granos sucios, quebrados, dañados y descompuestos, así como toda materia extraña presente.

c Remojo y fermentación láctica

El remojo es un proceso en el cual los granos se remojan en exceso de agua por 12 o 15 h a temperatura ambiente para facilitar la penetración del micelio. Durante la fermentación ácida bacteriana, el pH de los granos disminuye de 5.3 a 4.5. Esto no

afecta el crecimiento de *Rhizopus*, pero previene el desarrollo de bacterias indeseables que pueden deteriorar el tempe. Se ha documentado que el crecimiento del hongo se mantiene estable en un pH superior a 3.5 y un poco más lento cuando el sustrato es acidificado mayor a ese valor de pH (Dinesh y col 2009). La importancia de un pH bajo en el inicio de la fermentación fúngica fue reportado por Ko (1985) que demostró que un pH < 5 inhibe el crecimiento de *Pseudomonas cocovenenans*, microorganismo productor de una toxina letal en tempe bongkrrek, el cual es elaborado de residuos de leche de coco.

d Descascarillado

Debido a que el hongo no puede crecer en el grano entero, el descascarillado es esencial en la producción del tempe. De esta manera el hongo es capaz de alcanzar los nutrientes de los cotiledones. El descascarillado puede ser manual separando la resta de los cotiledones facilitado por la hidratación anterior o por abrasión mecánica.

e Cocción parcial

La cocción parcial es necesaria para destruir la contaminación parcial de bacterias que puedan interferir con la fermentación, destruir factores antinutricionales (inhibidores de tripsina, quimotripsina y fitatos) y liberar algunos de los nutrientes necesarios para el crecimiento del hongo. El tiempo de cocción varía de 10 min a 3 h a temperatura de ebullición (Steinkraus y col 1965).

f Drenado/enfriado

Tradicionalmente, el agua de cocción es drenada y los cotiledones son extendidos en bandejas de bambú, mallas de alambre o cestos perforados. El exceso

de agua favorece el crecimiento de bacterias y deterioro del tempe; así que, un inapropiado drenado de los granos disminuye la vida de anaquel del producto (Steinkraus y col 1965)

g Inoculación

La fuente de inoculación puede ser obtenida a través de: (1) Lote previo de tempe, (2) Sepas puras de *Rhizopus* liofilizado o suspendido en agua. Para obtener una fermentación rápida y óptima, Wang y col (1975) sugieren que inocular a con 1×10^6 esporas a 100 g de sustrato cocido produce resultados satisfactorios. La principal especie de hongos para elaborar tempe es *Rhizopus oligosporus* porque presenta una fuerte actividad de lipasas y proteasas (Shurtleff y Aoyagi 2001). Sin embargo, otras especies, como *R. oryzae*, *R. Chinensis*, *R. arrhizus* y *R. stolinifer* también han sido utilizados en la producción de tempe a partir de diferentes sustratos (Steinkraus 1994).

h Contenedor de fermentación

Tradicionalmente, los granos son empacados en hojas marchitas de plátano perforadas que permiten un suministro limitado de aire. Un contenedor es apropiado mientras permita el paso de oxígeno suficiente para el crecimiento del hongo, pero no demasiado que permita la esporulación y oscurecimiento del micelio; la temperatura puede ser controlada, el sustrato retiene la humedad durante la fermentación, no existe agua libre en contacto con el grano y la fermentación ocurre en condiciones higiénicas (Steinkraus 1994). Hoy en día, bolsas de plástico, tubos flexibles o cajas

de plástico duro con orificios de perforación adecuada se utilizan para el crecimiento del hongo (Roubos van den Hil 2010).

i Incubación

Temperatura, tiempo de fermentación y humedad relativa son tres factores que inciden en el resultado de la fermentación para la elaboración del tempe. La fermentación puede llevarse a cabo a temperaturas de 25 a 37°C; sin embargo, el tiempo requerido para llevarse a cabo la fermentación disminuye cuando aumenta la temperatura (Steinkraus 1983). Usmani y Noorani (1986) reportaron que una humedad relativa óptima de 60-65%. Se ha observado que a una humedad relativa > 75% se da una esporulación indeseable del hongo.

Algunas investigaciones (Reyes-Bastidas y col 2010; Guzmán-Uriarte y col 2013; Abu-Salem y Abu-Arab 2011; Reyes-Moreno y col 2004; Angulo-Bejarano y col, 2008; Cuevas-Rodriguez y col 2004; 2006) han utilizado la FES para mejorar las propiedades fisicoquímicas de harinas de cereales y leguminosas. Durante la producción de tempe se incrementa la absorción de agua de las harinas producidas y la dispersabilidad, alcanzando valores cercanos al 100%. Esto permite al tempe ser utilizado en alimentos hechos de pasta. Sin embargo, durante la producción del tempe disminuye la solubilidad de la harina, relacionado con los procesos de cocción que ocasionan la desnaturalización proteínica.

H CAMBIOS QUÍMICOS DURANTE LA PRODUCCIÓN DE TEMPE

Durante la fermentación de los granos ocurren cambios químicos y bioquímicos que mejoran la calidad nutricional y sensorial del tempe. Durante la FES el micelio de

Rhizopus spp penetra dentro de varias capas de células (25% de profundidad) donde secreta enzimas hidrolíticas, invade el material intercelular y puede llegar a solubilizarse por la actividad de sus enzimas extracelulares (Nout y Rombouts, 1990). *Rhizopus oligosporus* produce poca actividad de pectinasa pero produce una gran actividad de poligalacturonasa (Cuadro 5) (Whitaker 1978). Produce una variedad de lipasas, proteasas y carboxilasas que transforman macromoléculas a sustancias de peso molecular más bajo, solubilizando proteínas; generando cambios en vitaminas, fitoquímicos y antioxidantes (Astuti 2000; Nout y Kier 2005).

1 Proteínas y calidad nutricional

Se ha visto que durante la fermentación existe un incremento en el contenido de proteína en el tempe con respecto al grano sin procesar (Hutkins 2006). Este incremento se ha reportado en cereales (Cuevas-Rodriguez y col 2004; Taylor 2012) como leguminosas (Angulo-Bejarano y col 2008). Lyimo (2000) trabajo FES con *R. oligosporus* a 37°C por 24-30 h, usando sorgo mezclado con maní bambara, sésamo, caupí, gandul, frijol, judías, soya o cacahuete y observó un ligero incremento en el contenido de proteínas, fibra dietaria y cenizas, a su vez un incremento la digestibilidad de la proteína. Sparriga y Owens (1999) evaluaron la proteína durante la fermentación de tempe a partir de soya. La cantidad de proteína hidrolizada a 48 h represento el 25% de la proteína inicial, de la cual se sugiere que aproximadamente 65% permaneció en tempe en forma de aminoácidos y péptidos, 25% se destinó a la producción de biomasa del hongo y 10% se oxidaron.

Cuadro 5. Efecto de la fermentación de leguminosas sobre composición química

Composición química (% bs)	Frijol común ^{1,2}		Garbanzo ^{3,4,5,6}	
	Crudo	Tempe	Crudo	Tempe
Proteína cruda	23.06-25.36	28.06-29.54	20.9 -24.63	26.1-28.85
Proteína Verdadera	19.61	21.4	19.7	25.7
Lípidos	1.64	1.01	79.2	33.69
Cenizas	4.47	2.56	5.71 - 6.1	2.6-2.84
Carbohidratos	70.83	68.37	2.98 -3.3	2.0-2.10
Almidón resistente	2.41	5.55	64.6 - 69.8	64.53-69.3
Fibra dietaría soluble	4.74	13.32	49.2	48.4
Fibra dietaría insoluble	11.3	22.51		7.6
Fibra dietaría total	16.02	35.83		
Ácidos grasos (% aceite)				
Linolenico			63.4	59.36
Palmitio			8.33	9.66
Esteárico			28.2	30.82

¹Reyes-Bastidas y col (2010); ²Guzmán-Uriarte y col (2013); ³Abu-Salem y Abou-Arab (2011); ⁴Reyes-Moreno y col (2004); ⁵Angulo-Bejarano y col (2008); ⁶Reyes-Moreno y col (2000b)

2 Carbohidratos

Los carbohidratos de la mayoría de las leguminosas son polisacáridos de la pared celular, fructosa, rafinosa y estaquiosa. Los azúcares pequeños (fructosa, rafinosa y estaquiosa) se eliminan con el remojo, cocción y fermentación (Egountley y Aworth 2003). Los polisacáridos insolubles de la pared (pectinas, celulosa y hemicelulosa) son parcialmente degradados por las enzimas de los hongos; aumentando su solubilidad en agua (Kiers y col 2000).

Las principales carboxilasas del *R. oligosporus* son poligacturonasas, celulasas, xilasas y arabinasas (Sarrette y col 1992). Egounlety y Aworh (2003) evaluaron el efecto del remojo, descascarillado, cocción en la penetración de *R. oligosporus* y la concentración de oligosacáridos en la elaboración de tempe a partir de soya, cowpea y groundbean, reportando pérdidas de sucrosa, rafinosa y estaquiosa durante estos pretratamientos. Sin embargo, los contenidos de galactosa, glucosa, fructosa y maltosa incrementa durante las primeras horas de fermentación (30 y 36 h); observando que estos pretratamientos son efectivos en la reducción de compuestos indeseables causantes de flatulencia.

3 Lípidos

R. oligosporus posee una fuerte actividad lipolítica, hidrolizando la tercera parte de los lípidos neutros durante el tercer día de fermentación, por la liberación de lipasas en las primeras etapas de la fermentación. Los ácidos grasos libres que son liberados son ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolenico, además el contenido de lípidos del sustrato se reduce ya que son usados por *R. oligosporus*

para su metabolismo, el ácido linoleico es utilizado por el hongo hasta en un 40% (Wagenknecht y col 1961). Ruíz-Terán y Owens (1996) han reportado que durante la fase de crecimiento del micelio (0-32 h) la masa total seca disminuye aproximadamente 10% (p/p) por la pérdida de grasa cruda (3%), proteína (0.5%) y otros compuestos (6.5%), siendo los ácidos grasos la principal fuente de energía y los aminoácidos como fuente menor.

Wiesel y col. (1997) elaboraron tempe de soya con mezclas de *R. oligosporus* y *R. oryzae* así como con *Citrobacter freundii* y *Brevibacterium epidermidis*. Las condiciones de incubación fueron 30°C durante 24 h. Reportaron que *R. oligosporus* y *R. oryzae* tienen una fuerte actividad lipolítica. Reyes-Moreno y col. (2004) y Reyes-Bastidas y col. (2010), elaboraron tempe a partir de garbanzo y frijol reportando una disminución en lípidos debido a la oxidación y utilización de las grasas como fuente de energía.

4 Vitaminas

Keuth y Bisping (1993; 1994) estudiaron la formación de vitaminas hidrosolubles (vitamina B12, vitamina B6, riboflavina, tiamina, ácido nicotínico y nicotinamida) durante la FES de tempe de soya. Se verificaron el efecto de varias cepas de *Rhizopus oligosporus*, *R. arrhizus* y *R. stolonifer* y el papel de varias bacterias en el proceso de formación de la vitamina. Las cepas de *Rhizopus* forman riboflavina, ácido nicotínico, nicotinamida y vitamina B6. Las concentraciones finales de estas sustancias dependían de las diferentes cepas implicadas y en el tiempo de

fermentación. Los aislamientos de *R. oligosporus* eran generalmente los mejores formadores de la vitamina.

Fernández-Orozco y col (2007) estudiaron el efecto de la FES y la fermentación líquida con *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oryzae*, *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus plantarum* en harina de soya, en el cual la FES provocó un fuerte aumento de δ , β y γ -tocoferoles, mientras que para α -tocoferol se observó una reducción. Como consecuencia la actividad de la vitamina E aumentó significativamente. Sin embargo, cuando se llevó a cabo el proceso en el fermentador líquido, α -tocoferol sufrió una drástica reducción, β y γ -tocoferol disminuyó ligeramente, pero δ -tocoferol aumentaron considerablemente.

Arcot y col (2002) evaluaron los efectos del proceso de elaboración de tempe de soya con el contenido de folato. Reportando que el remojo, cocción y lixiviación causan una pérdida significativa de vitaminas, siendo la lixiviación la etapa que más pérdida origina: además de encontrar un alto contenido de folato en el agua de remojo y cocción.

5 Minerales

Van der Riet y col (1987) fermentaron soya con *R. oligosporus*, por 24, 48 y 72 h y reportaron que la concentración de calcio, fósforo, hierro, cobre, zinc, magnesio y manganeso tienden a incrementarse con el tiempo de fermentación. Además, reduce la concentración de ácido fitico aumentando la biodisponibilidad de los minerales (calcio, zinc, hierro y magnesio). Pretratamientos de remojo, descascarillado y cocción en frijol de origen africano o garbanzo disminuyó el contenido de K, Ca, Na,

Mg, Cu, Fe y Zn. Tal vez por la eliminación de la testa y la lixiviación de minerales. (Azeke y col 2005; Abu-Selem y Abou-Arab 2011).

6 Fibra dietaría total

En un estudio realizado por Sánchez-Magaña y col (2014) sobre FES en frijol demostraron que tanto la fibra dietaría soluble, insoluble y total aumentaban después de la fermentación a por 108 h. El incremento fue de 4.74% a 13.32%, 11.30% a 22.51% y 28.02% a 39.17% respectivamente. Estos cambios pueden atribuirse a la lixiviación de compuestos durante el remojo y cocción y por el crecimiento del hongo, que se acompaña del consumo de carbohidratos y lípidos como fuente de energía y el desarrollo de un micelio rico en fibra.

7 Almidón resistente (AR)

Sánchez-Magaña y col (2014) estudio el efecto de la FES en frijol sobre el contenido de almidón resistente demuestran un incremento después de la fermentación (Hendrich 2010). De igual forma, Angulo-Bejarano y col (2008) evaluaron el efecto de la FES en garbanzo encontrando un comportamiento similar al incrementar el contenido de AR de 19 a 76 g/kg en garbanzo crudo y fermentado respectivamente. El efecto de las etapas previas al proceso como remojo, cocción y el efecto de la temperatura permiten la formación de enlaces de hidrógeno entre las cadenas moleculares dentro del gránulo de almidón. Uno de los efectos del almidón resistente es la capacidad de reducir el índice glucémico e insulinémico, obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares (Hasjim y Jane 2009).

I EFECTO DE FES SOBRE EL VALOR NUTRICIONAL DEL SUSTRATO

1 Perfil de aminoácidos

Stillings y Hackler (2007) observaron un incremento en el contenido de aminoácidos libres y nitrógeno conforme el tiempo de fermentación se incrementa. Según Fung y Crozier-Dodson (2008) existe un incremento en la calidad de aminoácidos libres de 1 a 85 veces en tempe de soya con respecto a soya cruda, en la elaboración de tempe con *R. oligosporus*. Sin embargo, el contenido de aminoácidos global puede disminuir por un 30% después de 48 h de fermentación. Esto indica que el hongo libera aminoácidos durante la fermentación y digiere aminoácidos aumentando el nitrógeno soluble. Existen reportes de un incremento de aminoácidos como lisina, metionina y triptófano durante la fermentación de tempe. Otros autores demostraron una disminución de aminoácidos durante las primeras 24 h de fermentación y durante los largos periodos de procesamiento.

2 Digestibilidad

La digestibilidad de cereales y leguminosas aumenta durante la fermentación y cocción debido a la liberación de enzimas proteolíticas (Kiers y col 2000). La cocción mejora la digestibilidad *in vitro* de soya y frijol de 37 a 45% y 15 a 41%, respectivamente. La fermentación realiza un pre-digestión de los macronutrientes del sustrato. Lyimo (2000) reportó un comportamiento parecido al elaborar tempe a partir de sorgo mezclado con leguminosas (garbanzo y frijol común) utilizando como inóculo *R. oligosporus*, con condiciones de 30°C por 24 y 30 h, encontrando que la

digestibilidad proteica *in vitro* aumento de 10 a 14%, la calificación química de aminoácidos de 62 a 69% y la energía aportada por proteína de 14 a 16%.

En otros estudios *in vivo* realizados con ratas y cerdos recién nacidos mostraron mejoras en crecimientos, ganancia de peso y eficiencia proteica cuando se alimentaron con tempe de soya y frijol en comparación con controles sin fermentar (Nout y Rombouts 1990).

3 Valor biológico de las proteínas

El valor nutricional o calidad de los distintos tipos de proteínas difiere de acuerdo a la composición de aminoácidos, relación de aminoácidos esenciales, susceptibilidad a hidrólisis durante la digestión, fuente y efecto de procesamiento (Cuadro 6) (Friedman 1996). La evaluación de la proteína comprende: análisis de nitrógeno, lisina disponible, perfil de aminoácidos, índice de aminoácidos esenciales (IAAE), digestibilidad *in vitro*, relación de eficiencia proteica (PER), relación de eficiencia proteica calculada (C-PER), digestibilidad verdadera, valor biológico, relación neta de proteína (NPR) y digestibilidad proteica corregida por perfil de aminoácidos (PDCAAS) (Friedman, 1996).

Wang y col. (1968) evaluaron tempe (en ratas) elaborado a partir de trigo y soya fermentada con *R. oligosporus* a 31°C/24 h y encontraron que el proceso no cambia la composición de aminoácidos esenciales, pero la relación de eficiencia proteica (PER) de las proteínas de trigo tenía una mayor biodisponibilidad.

Cuadro 6. Efecto de la fermentación de leguminosas sobre valor nutricional

Parámetro	Frijol común ¹		Garbanzo ^{2,3,4}		Soya ⁵		AAE 2-5 Años
	Crudo	Tempe	Crudo	Tempe			
AAE (g/100g proteína)							
His	2.45	2.62	2.43	2.54	2.4	2.4	1.9
Ile	3.09	3.33	3.19	3.56	4.9	4.9	2.8
Leu	7.21	7.18	7.14	7.22	7.9	6.6	6.6
Lys	6.52	6.31	6.39	6.09	6.5	5.8	5.8
Met+Cys	2.28	2.51	2.18	2.59	2.7	2.5	2.5
Phe+Tyr	8.55	9.39	8.8	9.87	9	8.7	6.3
Tre	3.52	3.78	3.46	3.85	3.8	3.9	3.04
Trp	1.23	1.14	1.1	1.06	0.85	0.95	1.1
Val	3.53	3.69	3.54	3.76	5.2	5.2	3.5
Total	38.38	39.97	38.23	40.5			33.9
Limitante	Met+Cys		Met+Cys	Trp	Trp	Trp	
Calificación química	91	100	0.87	0.96			
Digestibilidad proteica	69.25	75.14	66.19	82.54			
In vitro (%)			72.2	83.2			

¹Reyes-Bastidas y col (2010); ²Abu-Salem y Abou-Arab (2011); ³Reyes-Moreno y col (2004); ⁴Angulo-Bejarano y col (2008); ⁵Smith y col (1964)

NPR=Utilización neta de la proteína, C-PER=Relación de eficiencia proteínica calculada, PDCAAS=Digestibilidad proteínica corregida por la calificación de aminoácidos

Cuevas-Rodríguez y col, (2004) estudiaron el efecto FES sobre las propiedades nutricionales de maíz de calidad proteica, encontrando que la fermentación mejora la digestibilidad *in vivo*, PER, C-PER, NPR y PDCAAS. Resultados similares fueron reportados en tempe de garbanzo (Angulo-Bejarano y col, 2008) y tempe de frijol (Reyes-Bastidas y col, 2010). Estos cambios se pueden explicar por la eliminación de factores antinutricionales (ej. Hidrolisis de ácido fitico durante la fermentación) y a la desnaturalización de las proteínas durante la etapa de cocción, haciendo a la proteínas más vulnerables a la acción enzimática.

4 Factores antinutricionales

Debido a las propiedades quelantes, sobre los iones calcio, magnesio, hierro, zinc y fosforo, del ácido fitico causa indisponibilidad de los metales. La enzima fitasa cataliza la hidrolisis del ácido fitico, a fosforo inorgánico y esteres fosfóricos de mioinositol, en algunos casos mioinositol libre. Los microorganismo que producen dicha enzima están: *Aspergillus ficcum*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus ssp.* (Mugula 1992; Al-Asheh y Duvnjak 1994).

Cuevas-Rodríguez y col (2004), Reyes-Moreno y col (2004), Angulo-Benjarad (2005) y Verdugo-Montoya (2006) reportaron resultados el efecto de *Rhizopus Oligosporus* en maíz de calidad proteínica (MCP) y garbanzo para la producción de tempe. Ellos reportaron una disminución en los niveles de ácido fitico como resultado del proceso de FES

Los taninos son reducidos antes del proceso de fermentación debido a si localización en la testa. Sin embargo, una vez llevado a cabo la fermentación, existe

un incremento en la concentración de taninos debido a la actividad del microorganismo (Lin y col 2006).

Las lectinas por ser moléculas de proteína son lábiles al calor y pueden ser desnaturalizadas durante el proceso de fermentación. La etapa de cocción durante la elaboración de tempe favorece la eliminación de estos compuestos (Reddy y Pierson 1994).

Los oligosacáridos pertenecientes a la familia de la rafinosa causan flatulencias en el organismo y son poco hidrolizados debido a la carencia de la enzima α -galactosidasa. Se ha reportado que son fácilmente eliminados durante la producción de tempe, principalmente en la etapa de remojo, debido a que estos compuestos son solubles en agua. Además la actividad enzimática de *Rhizopus ssp*, permite la degradación de los mismos (Nowak y Szebiotko 1992).

J EFECTO DE FES SOBRE PERFILES DE FITOQUÍMICOS

Los factores antinutricionales termolábiles como inhibidores de tripsina lixiviados o inactivados durante remojo, cocción e hidrolisis enzimática microbiana mejorando localidad nutricional de los productos fermentados (Reyes-Moreno y col 2000; Cuevas-Rodrigues y col 2004; Reyes-Bastidas y col 2010) (Cuadro 7). La enzima fitasa cataliza la hidrolisis de ácido fitico, a fosforo inorgánico y esteres fosfóricos de mionositol o miositol libre. Entre los microorganismos productores de estas enzimas se encuentra: *Aspergillus spp* y *Rhizopus spp* (Wang y col 1980; Al-Asheh y Duvnjak 1994). Egountley y Aworth (2003) reportaron disminución de ácido fitico en tempe de soya, cowpea y groundbean como resultados de la fermentación con *R. oligosporus*.

Cuadro 7. Efecto de la fermentación de leguminosas sobre fitoquímicos

Fitoquímicos	Frijol común		Garbanzo		Soya negra	
	Cruda	Tempe	Cruda	Tempe	Cruda	Tempe
Fenólicos totales (mg/100g)	192.3	431.33	269.38	86.64	17.75	23.43
Fenólicos libres (mg/100g)	35.91	190.47				
Fenólicos ligados (mg/100g)	156.46	240.86				
Taninos mg EC/g			4.63	1.24		
Inhib. de tripsina (mgTI/G)	3.02	3.37	10.96	1.12		
Ácido fitico (mg/g)	6.83	2.85	7.98-10.8	1.1-2.30		
Flavonoides (mg/100g)	4.85	6.33				
Oligosacáridos (mg kg ⁻¹ ms)						
Rafinosa	963.9	69.4				
Estaquiosa	5869.4	916.1				
Verbascosa	560.2	151.5				
Isoflavonas (mg/100g)						17.4
Agliconas totales						6.8
Daizina						0.58
Glizitina						0.66
Genisteina						85.8
Isoflavonas Totales						103.2

Juan y Chou 2010; Starzynska-Janiszewska 2012

Los taninos se concentran principalmente en las cascarillas. El proceso de producción de tempe generalmente disminuye el nivel de taninos debido a descascarado, remojo y cocción de semillas durante la preparación del sustrato. Sin embargo, una vez llevado a cabo la fermentación, se ha reportado un incremento de taninos debido a la actividad del microorganismo (Randhir y col 2004; Lin y col 2006; Starzyńska-Janiszewska y col 2014). Los oligosacáridos pertenecientes a la familia de las rafinosas (rafinosa, estaquiosa y verbasosa) son eliminados en las etapas de remojo ya que estos compuestos son solubles en agua. Además que la actividad enzimática de *Rhizopus* spp permite la degradación de los mismos (Nowak y Szebiotko, 1992). Diversas investigaciones se ha realizado en la liberación de fenoles totales y flavonoides en soya negra (Juan y Chou 2010), judías (Reena y Kalidas 2007), otras leguminosas (Oboh y col 2009) y cereales (Dordevic y col 2010; Salar y col 2012). La enzima fúngica β -glucosidasa (glucohidrolasa β -D-glucósido) cataliza la hidrólisis de enlaces glicosídicos en alquilo y arilo β -D-glucósidos, así como glucósidos que contienen únicamente residuos de carbohidratos (Vattem y Shetty 2003). Esta enzima ha sido descrita como capaz de hidrolizar glucósidos fenólicos para liberar ácidos fenólicos libres.

Juan y Chou (2010) estudiaron el efecto de FES en soya negra, demostrando que la fermentación aumenta el contenido fenólicos totales, antiocianinas y flavonoides. Chaiyasut y col (2010) estudiaron el efecto de la duración de la fermentación sobre el contenido de isoflavonas y la actividad antioxidante y soya fermentada encontrando que las agliconas de isoflavonas se incrementan con la

duración de la fermentación, mientras que las gliconas disminuyen. Gran cantidad de isoflavonas se pierden por lixiviación durante el remojo, descascarillado y cocción. Mientras que la fermentación no genera grandes cambios en el contenido de isoflavonas en soya.

K EFECTO DE LA FES SOBRE PROPIEDADES NUTRACÉUTICAS DE LOS SUSTRATOS

Los alimentos fermentados han despertado el interés sobre sus capacidades antioxidantes tales como fenólicos, así como sus propiedades nutraceuticas y efectos benéficos a la salud (Cuadro 8). Se la ha atribuido a productos fermentados a partir de cereales y leguminosas, como el tempe, propiedades nutraceuticas como antidiarreico, antidiabético, antihipertensivo, principalmente. La FES se ha empleado para incrementar el contenido de compuestos fenólicos en ciertos productos alimenticios, aumentando así su actividad antioxidante (Lee y col 2008; Juan y Chou 2010; Salar y col 2012). Por ejemplo, los frijoles negros son bien conocidos por su alto valor nutritivo que contiene isoflavonas, carotenoides y antocianinas.

1 Capacidad antioxidante

Amadou y col (2009) llevaron a cabo una revisión de los métodos de extracción de compuestos bioactivos antioxidantes en alimentos de soya fermentada, encontrando que los extractos acuosos o etanólicos al 70% son adecuados para tempe de soya, debido a su polaridad, permiten la extracción de una mayor cantidad de polifenoles. Se ha reportado que la FES aumenta la actividad antioxidante en los últimos años.

Cuadro 8. Efecto de la FES sobre propiedades nutraceuticas de los sustratos

Propiedad	Valor			
Antihipertensiva (Inhibición ECA)				
Soya cruda(extracto acuoso) ¹	94.96%			
Soya fermentada 6 días <i>R. oligosporus</i> (extracto acuoso) ¹	95.55%			
Soya cruda(IC ₅₀) ⁷	5.3 mg/MI			
Tempe de soya(IC ₅₀) ⁷	0.51 mg/mL			
Hidrolizado con enzimas digestivas de frijol común crudo (IC ₅₀) ⁵	79.22 µg/mL			
Hidrolizado con enzimas digestivas de frijol común fermentado 108 h (IC ₅₀) ⁵	0.0117 µg/mL			
Antidiabética (Índice de inhibición de α-amilasa)				
Soya cruda(extracto acuoso) ¹	1.99			
Soya fermentada 6 días <i>R. oligosporus</i> (extracto acuoso) ¹	2.08			
Frijol Africano ⁴	65%			
Frijol Africano fermentado 4 días con alto contenido de fenólicos ⁴	80%			
Frijol Africano fermentado 12 días (rompimiento de compuestos fenólicos) ⁴	65%			
Antidiabética (Índice de inhibición de α-glucosidasa)				
Soya cruda(extracto acuoso) ¹	1			
Soya fermentada 6 días <i>R. oligosporus</i> (extracto acuoso) ¹	1.1			
Hipocolesterolémico y antilipémico				
Colesterol LDLcol en ratas antes y después del tratamiento (mg/dL)				
Okara ²	20.6 - 23.9			
Tempe de okara ²	18.7 - 14.0			
Colesterol HDL en ratas antes y después del tratamiento (mg/dL)				
Okara ²	84.3 - 77.8			
Tempe de Okara ²	87.2 - 81.8			
Mezcla de tempe, harina, lecitina, aceites vegetales y fibra ³	Aumento en 24% de pacientes			
TGL en ratas antes y después del tratamiento (mg/dL)				
Okara ²	141 – 140			
Tempe de okara ²	144 – 148			
Efecto antimutagénico sobre <i>S. typhimurium</i> (%de inhibición)				
	<i>S. typhimurium</i> TA100		<i>S. typhimurium</i> TA98	
Concentración de extractos metanólicos soya negra	Nitroq	BenP	Nitroq	BenP
5 mg/plato	41	63	58	44
2.5 mg/plato	23	55	54	30
1.25 mg/plato	11	29	45	23
0.625 mg/plato	2	5	28	9
Concentración de extractos metanólicos tempe de soya negra⁶				
5 mg/plato	82	85	74	64
2.5 mg/plato	61	65	56	42
1.25 mg/plato	48	40	35	25
0.625 mg/plato	32	21	28	6

¹Lukito (2001); ²McCue y col (2005); ³Sulchan y Rukmi (2007); ⁴Rhandir y col (2004);

⁵Guzmán-Uriarte y col (2013); ⁷Takenaka (2011); Hung col (2007); Gibbs y col (2004)

La FES sobre estos granos para preparar tempe utilizando con diferentes hongos filamentosos (en particular *Aspergillus sp.* Y *Rhizopus sp.*) incrementó las propiedades antioxidantes de los granos, lo que podría estar relacionado para el aumento de fenol y antocianina contenidos (Lee y col 2008).

La mayoría de las investigaciones se centran en soya, con escasos reportes implementando FES en otros sustratos. Esaki y col (1996) reportaron la capacidad antioxidante de tempe de soya inoculado con *R. Oligosporus* IFO 32002, observaron una mayor estabilidad de lípidos comparado con la soya no fermentada, debido a la presencia del ácido 3-hidroxiantranílico (HAA). Reportando que dicho antioxidante solo se encuentra en soya durante la fermentación con *R. Oligosporus* y no se encuentra en soya cruda.

Bhanja y col (2009) estudiaron el efecto de dos hongos filamentosos diferente (*Aspergillus oryzae* y *Aspergillus awamori*) utilizados en FES en trigo, concluyendo que era muy eficaz para la mejora de contenido fenólico y las propiedades antioxidantes. En este estudio, los granos de trigo fermentados fueron considerados como antioxidante rico y suplementos alimenticios más saludables en comparación con los granos de trigo no fermentados.

2 Propiedades antidiabéticas

Se sabe que compuestos con propiedades inhibitorias de α -amilasa y la α -glucosidasa tienen varios efectos beneficiosos a la salud, evitando la hidrólisis de hidratos de carbono (Cheplick y col 2010). Maiti y Majumdar (2012) investigaron el efecto de FES en soya utilizando *R. Oligosporus*, mejorando el contenido de

fenólicos contribuyendo a una inhibición de α -amilasa, permitiendo controlar y hasta prevenir complicaciones a largo plazo de hiperglicemia y diabetes mellitus. Randhir y col (2007) estudiaron el enriquecimiento de fenólicos en frijol mungo después de la FES con *Rhizopus Oligosporus*. Demostrando que la fermentación es una buena estrategia para mejorar el contenido fenólico del frijol mungo para una mayor funcionalidad con la mejora de la actividad antioxidante obteniendo la inhibición de α -amilasa durante los primeros 2 días, también observaron que la actividad inhibitoria fue aumentando a partir de los 12 días de fermentación relacionada con el incremento de fenólicos. McCue y col 2005 optimizaron el proceso de FES para la obtención de extractos solubles y aumentar el contenido de fenólico por *Rhizopus Oligosporus* para la actividad inhibitoria de α -amilasa y α -glucosidasa. Observaron que todos los extractos de soja poseían actividad anti-amilasa, ligera actividad anti-glucosidasa.

3 Propiedades anticancerígena

La L-glutaminasa es una enzima que cataliza la desamidación de L-glutamina al ácido L-glutámico y amoníaco teniendo efecto antileucémico. La L-glutamina sirve como precursor metabólico para la síntesis de nucleótidos y proteínas de las células tumorales (Roberts y col 1979; Tapiero y col 2002). Ashraf y El-Sayed (2008) estudiaron la FES para la producción de L-glutaminasa a partir de fibra de trigo, residuos de nuez, cascara de arroz, harina de soja, torta de aceite de sésamo, residuos de semillas de algodón y residuos industriales de lentejas usan *Trichoderma koningii* como inóculo encontrando que la fibra de trigo fue el mejor sustrato para la

obtención de L-glutaminasa (12.1 U/mg de proteína). Por otro lado, Yang y col (2013) estudiaron la FES para mejorar aún más la producción de compuestos funcionales y las actividades correspondientes de avena, trigo, trigo y cebada. La incubación de las células cultivadas con 150 ppm de extracto de avena cultivada con *Antrodia cinnamomea* durante 24 h redujo en gran medida la viabilidad de las células MCF-7 de cáncer de mama y células de carcinoma hepatocelular HepG2 a 29% y 76%, mientras que los fibroblastos 3T3 normales eran casi independiente.

4 Propiedades antihipertensivas

En los últimos años, la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) mostrada por la fermentación de leguminosas como soya (Wang y González de Mejia 2005), garbanzo (Medina-Godoy y col 2012), chícharo (Meisel y col 2006) y frijol (Torruco-Uco y col 2009; Valdez-Ortiz y col 2012), han recibido gran atención por su potencial en los tratamientos de hipertensión arterial (HTA).

Sin embargo, existe poca información sobre actividad antihipertensivo de granos bioprocesados. Algunos investigadores (Gibbs y col, 2004) han reportado que la fermentación de soya capacidad antihipertensiva de biopeptidos, en modelos *in vitro* e *in vivo*, relacionado con la acción hidrolítica de las enzimas secretadas por el hongo.

III JUSTIFICACIÓN

El frijol común es una buena fuente de nutrimentos; y su consumo se ha asociado con un menor riesgo de padecer enfermedades crónico degenerativas. Estos efectos se deben a fitoquímicos presentes en el grano. La FES es un bioproceso que mejora las características nutricionales y nutracéuticas que poseen las leguminosas. Se pretende elaborar una harina a partir de frijol común bioprocesado por FES con potencial antioxidante e hipoglucémico altos, la cual podría ser utilizada para la elaboración y/o formulación de alimentos funcionales como una alternativa para el tratamiento de diabetes y otras enfermedades crónico degenerativas.

IV HIPÓTESIS

Si se utilizan condiciones óptimas del bioproceso de FES, se puede obtener harina de frijol bioprocesado con potenciales antioxidante e hipoglucemiante altos.

V OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Encontrar la mejor combinación de temperatura y tiempo de fermentación en estado sólido para obtener una harina de frijol bioprocesado con potenciales antioxidante e hipoglucémico altos.

B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimizar el bioproceso FES de frijol común para obtener una harina de frijol común bioprocesado optimizada (HFCBO) con potenciales antioxidante e hipoglucémico altos.
2. Aplicar la mejor combinación de temperatura y tiempo de FES para obtener HFCBO.
3. Conocer la composición química y propiedades fisicoquímicas de la HFCBO.
4. Conocer la actividad antioxidante (AAox) y el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) de la HFCBO.
5. Conocer el potencial hipoglucémico de la HFCBO.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

A MATERIALES

Se utilizó frijol (*Phaseolus vulgaris* L) variedad Azufrado de Higuera como material de estudio, una vez obtenido el material se limpió y almacenó en recipientes de plásticos, cerrados herméticamente, a 8-10°C hasta su uso. El microorganismo que se utilizó fue *Rhizopus Oligosporus* NRRL 270.

B METODOS

1 Características físicas

a Dimensiones

La determinación se realizó a 25 granos seleccionados al azar, utilizando un vernier. La medición se aplicó por triplicado.

b Peso de 100/1000 granos

Se determinó el peso de 100 granos/1000 granos seleccionados al azar en una balanza OHAUS (Mod TP2KS, Seedburo Equipment, Co., EUA). La determinación se hizo por triplicado.

c Peso hectolítrico

Se determinó utilizando un recipiente de acero inoxidable de 1 L de capacidad, los resultados obtenidos se reportaron como kg/hL. Se reportó el promedio de diez repeticiones.

d Calibre

Se midió contando el número de granos en 30 g de muestra. Se utilizó una balanza OHAUS (Mod TP2KS, Seedburo Equipment, Co., EUA). Se reportó el promedio de cinco repeticiones.

2 Composición química

a Proteína cruda

Se usó el método de microkjendahl de la AOAC (1999) para determinar el nitrógeno. Se digirió 0.2 g de muestra, con 5 mL de ácido sulfúrico y mezcla reactiva de selenio a 200°C. Se diluyó la muestra con 10 mL de agua y se realizó la destilación de la muestra con disoluciones de NaOH al 40% (p/v) y ácido bórico al 4% como indicador. Para la titulación se usó una disolución de HCl 0.1N y se calculó el contenido de proteína multiplicando el contenido de nitrógeno total por 6.25.

b Lípidos

Se le extrajo a un gramo de muestra en un equipo soxhlet por 4 h a 70°C con éter de petróleo y se cuantificó según la técnica 35.25 de la AOAC (1999).

c Cenizas

Se determinó con la técnica 32.10 de la AOAC (1999). Se incineraron dos gramos de muestra a 500°C por 3 h y se calcula por diferencia de peso inicial entre final.

d Carbohidratos

Se calculó por diferencia, tomando en cuenta los lípidos, grasas y cenizas.

e Fibra dietaría total

La determinación de fibra dietética se realizó siguiendo la metodología de la AOAC (1999) 985.29. Un gramo de muestra desgrasada se le agregaron a 50 mL de solución reguladora de fosfato (pH 6) a cada muestra y se gelatinizó con 100 µL de α-amilasa y se calentaron a 95°C por 15 min, posteriormente se hizo una digestión enzimática con 100 µL de solución de proteasa (5 mg) a 60°C por 30 min, luego se ajustó el pH (4-4.6) y se agregó 100 µL amiloglucosidasa a 60°C por 30 min para remover la proteína y almidón. Se precipitó la fibra adicionando cuatro volúmenes de etanol. El residuo total se filtró, lavó con etanol al 78%, etanol al 95% y acetona. Posteriormente el residuo se secó a 70 °C por 12 h, para luego ser pesado. Se determinó el contenido de proteína y cenizas de la muestra. La fibra dietética total (FDT) será igual a:

$$FDT = \frac{\text{Peso del residuo} - P - A}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

Dónde: peso del residuo = promedio de los pesos (mg) para el duplicado de muestras; P y A = pesos (mg) de proteína y ceniza respectivamente en el primero y segundo residuo de las muestras; peso de la muestra = promedio de peso (mg) de las 2 muestras tomadas

3 Propiedades fisicoquímicas

a Actividad de agua (aw)

Para determinar la humedad se utilizó un equipo marca aqualab mod CX” (Decangon Devices Inc, Pullman, WA, EUA).

b Diferencia de color (ΔE)

El color se determinó con un colorímetro. La determinación de color se basa en el efecto triestímulo, donde “L” mide brillantez y varía de 100 para un blanco perfecto y 0 para negro. Las dimensiones de cromaticidad son dadas por los parámetros “a” y “b”. El valor positivo de “a” está asociado con el color rojo y el negativo con verde. El valor positivo de “b” está asociado con el color amarillo y el negativo con azul. La diferencia de color se calcula con la ecuación:

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$$

Dónde: ΔE = diferencia total de color entre el estándar y la muestra; ΔL , Δa y Δb = diferencia absoluta entre los valores “L”, “a” y “b” del estándar y la muestra.

c pH

El pH de la harina se midió después de preparar una suspensión de 10 g de harina y 100 mL de agua destilada a 25°C (AOAC 1999). Preparada la suspensión se introdujo el electrodo para medir pH.

d Índice de absorción de agua (IAA)

Se utilizó el método descrito por Anderson y col (1969). Una muestra de harina de 2.5 g se suspendió en 30 mL de agua a 30°C en un tubo para centrífuga de 50 mL previamente tarado; se sometió a agitación intermitentemente a una velocidad moderada por 30 min. La suspensión se sometió a centrifugación a 3000 x g a 30°C durante 10 min. El líquido sobrenadante se decantó cuidadosamente en un recipiente tarado para la determinación de sólidos. El gel formado se pesó y se calculó el índice

de absorción de agua en base a ese peso, reportándose como gramos de gel por gramo de muestra seca. La prueba se realizó por triplicado.

e Índice de solubilidad en agua (ISA)

Se determinó de acuerdo al método reportado por Anderson y col (1969). Este parámetro se evaluó, pesando los sólidos obtenidos después de evaporar en una estufa el sobrenadante de las muestras donde previamente se determinó el índice de absorción de agua. El ISA se expresó como el porcentaje de sólidos secos en 2.5 g de muestra. La prueba se realizó por triplicado.

f Índice de formación (IFE) y estabilidad de espuma (EFE)

Se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Chau y col (1997), a los valores de pH de 2,7 y 10. Para ello, se realizó suspensiones acuosas de la muestra al 1.5% (P/V), se agitaron las muestras con ayuda de un Ultraturrax a 2000 x g por 5 min y se midió la formación de espuma a los 30 s, se expresó la capacidad de formación de espuma como el porcentaje de incremento del volumen de espuma a los 30 s, mientras que el porcentaje de estabilidad de espuma se expresó como el volumen residual de espuma a los 30 min.

g Índice de actividad y estabilidad de emulsión (IAE, EAE)

La actividad de emulsión se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Chau y col (1997). Para ello, se realizó una suspensión acuosa de 100 ml al 2% (P/V) a diferentes valores de pH (2, 7 y 10), se homogenizó usando un Ultraturrax a 2000 x g, posteriormente, se agregó 100 ml de aceite de maíz y se homogenizará la suspensión por 1 min. La emulsión se centrifugó en tubos de 15 ml a 1200 x g por 5

min y se midió el volumen de emulsión. La capacidad de emulsión se expresó como el porcentaje de volumen de la capa entera del tubo en relación a lo que correspondió a la capa de emulsión. La estabilidad de emulsión se determinará de acuerdo a Betancur-Ancona (2009), calentando las emulsiones a 80 °C por 30 min, posteriormente, se llevó a cabo un enfriamiento de las muestras a temperatura ambiente y se centrifugarán de 1200 x g por 5 min. La estabilidad de emulsión se expresó como el porcentaje de volumen original de emulsión en relación al volumen de emulsión final.

h Capacidad de absorción de aceite (CAA)

Se determinó utilizando la metodología descrita por Lin y col (1974) y Ordorica-Falomir (1991). Se tomaron 0.5 g de muestra de harina con 3 mL de aceite vegetal y se colocaron en un tubo graduado para centrifuga, se agitó durante 1 min en vortex y se dejaron reposar por 30 min. Luego se centrifugó a 1600 x g por 25 min. Se midió el volumen de aceite libre. La cantidad de aceite absorbido se calculó restando el volumen de aceite libre al volumen del aceite inicial y se expresó como mL de aceite absorbido/g de harina.

i Índice de dispersabilidad

Se determinó de acuerdo a la técnica reportada por Mora-Escobedo y col (1994). Una muestra de harina de 1 g se suspendió en un tubo cónico graduado con 10 mL de agua destilada. Las muestras se homogenizó en Ultraturrax (10,000 rpm x 5 min). La separación de las fases se midió después de 30 min de reposo.

4 Actividad antioxidante (AAox) hidrofílica total

a Extracto de fitoquímicos libres

Se utilizó el procedimiento descrito por Adom y Liu (2002) para la obtención de los extractos libres. Los fitoquímicos libres se extrajeron de 0.5 g de muestra con 10 mL de etanol al 80% (v/v), se agitaron en un rotator (OVAN noria R, EUA, 2010) a velocidad 25 por 10 min, se centrifugaron a 3,000xg/10°C durante 10 min. El sobrenadante se concentró en un tubo cónico a 45°C a presión baja (Apud Vac Concentrator, Thermo Elector Corporation) hasta un volumen de 2 mL, se almacenó a 4°C hasta su utilización en la determinación de capacidad antioxidante. El precipitado se guardó para la obtención de los extractos fitoquímicos ligados, la extracción se realizó para las HMT y HGT correspondientes a cada uno de los tratamientos derivados del diseño experimental.

b Extracto de fitoquímicos ligados

La extracción de fitoquímicos libres se realizó de acuerdo al método de Adom y Liu (2002). El precipitado se digirió con 10 mL de NaOH 2 M, se elimina el oxígeno en presencia de N₂ gaseoso y se sometió a tratamiento térmico, en baño María a 95°C por 30 min. Luego se agitó por 1 h a 25°C. La mezcla se neutralizó con 2 mL de HCL concentrado, se agita por 2 min por 10 min luego se le agregó 10 ml de hexano para remover lípidos, se centrifugó a 3000 x g a 10°C por 10 min y se extrajo el hexano. Luego se le agregó 10 mL de acetato de etilo, se agitó por 2 min y se centrifugó a 3000 x g a 10°C por 10 min luego se extrajo el acetato de etilo y se evaporara hasta sequedad. Los compuestos que se extrajeron se concentraron hasta sequedad y resuspendieron en metano.

c ABTS para compuestos hidrofílicos

Este ensayo se realizó de acuerdo a lo descrito por Re y col (1999). La **AAox** se determinó a los extractos de compuestos fenólicos libres y ligados por el método del ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotioazolín-6-sulfónico) (ABTS) para compuestos hidrofílicos; procedimiento basado en la captación por los antioxidantes del radical catión ABTS^{•+} generado en el medio de reacción. El radical catión del ABTS posee una coloración verde-azulada con una longitud de onda de 734 nm. En este método los antioxidantes se añaden una vez el ABTS^{•+} se ha formado y se determina entonces la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical, es decir la decoloración de este. El radical ABTS^{•+} se obtuvo tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2.45 mM) incubados a temperatura ambiente (25°C) y oscuridad durante 12-16 h. Después la solución de ABTS^{•+} se diluyó con agua desionizada para obtener una solución de trabajo de ABTS^{•+}. La reacción entre la solución de trabajo de ABTS^{•+} y muestras con diferentes concentraciones se iniciaron y almacenaron (25°C) hasta que la reacción fue completada. El radical ABTS^{•+} sufrió decoloración debido a la reacción con los antioxidantes. La disminución de coloración se monitoreó en un Lector de Microplacas a 734 nm y se expresó como porcentaje de inhibición de ABTS, la cual fue comparada con una curva estándar de Trolox. Los datos se expresaron como μmol equivalentes de Trolox (ET)/100 g de muestra seca. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

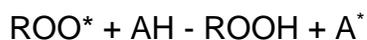
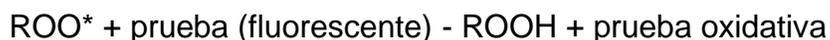
El contenido de compuestos fenólicos de los extractos libres y ligados se determinó utilizando el método colorimétrico descrito por Singleton y col. (1999).

Alícuotas de 20 μ L de cada extracto se oxidaron con 180 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.). Después de 20 min, la absorbancia del color azul resultante se midió a 750 nm utilizando un Lector de Microplacas (Synergy™ , BioTek, Inc., Winooski, VT, EUA). Se preparó una curva de calibración usando ácido Gálico (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) como estándar. El contenido de **CFT** se calculó mediante la suma de compuestos fenólicos presentes en extractos de fenólicos libres y ligados; se expresó en mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de muestra (bs, base seca). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

d ORAC para compuestos hidrofílicos

La capacidad antioxidante se determinara utilizando el método de capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (oxygen radical absorbance capacity, ORAC), desarrollado para compuestos hidrofílicos (Ou y col, 2001; Prior y col, 2005). La degradación térmica del compuesto 2-2'-Azobis-aminopropano (AAPH) produce radicales peróxido (ROO), los cuales oxidan al compuesto fluorescente, diclorofluoresceína (DCFH) al compuesto no fluorescente diclorofluorescina (DCF). El grado de inhibición de los antioxidantes (fitoquímicos) atrapa los radicales libres. Se preparara la solución generadora de radicales libres (2-2'-Azobis-aminopropano) AAPH agregando 0.207 g del reactivo y se afora en un matraz de 5 mL. La fluoresceína se prepara a una concentración de 0.1 μ M. A 25 μ L de muestra se le agrega 150 μ L de fluoresceína y se mezcla agitando a 1200 rpm por 20 seg. La reacción inicia al agregar 25 μ L de AAPH. La fluorescencia se mide a 485 nm de

excitación y 583 nm de emisión. La reacción de los radicales peroxilo genera la pérdida de fluorescencia con el tiempo como se indica en la sig. Reacción.



El efecto de un antioxidante es integrado por el área neta bajo la curva sobre la pérdida de la fluorescencia (AUC) ($AUC_{AOX} - AUC_{no\ AOX}$). Determinación de la actividad antioxidante. Los resultados se expresarán como micromoles (μmol) Trolox (TE) por 100 g de base seca (μmol de TE/100 g, bs)

e Compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos de los extractos libres y ligados se determinó utilizando el método colorimétrico descrito por Singleton y col. (1999). Alícuotas de 20 μL de cada extracto se oxidaron con 180 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.). Después de 20 min, la absorbancia del color azul resultante se midió a 750 nm utilizando un Lector de Microplacas (Synergy™, BioTek, Inc., Winooski, VT, EUA). Se preparó una curva de calibración usando ácido Gálico (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) como estándar. El contenido de **CFT** se calculó mediante la suma de compuestos fenólicos presentes en extractos de fenólicos libres y ligados; se expresó en mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de muestra (bs, base seca). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

5 Potencial hipoglucémico

a Índice de inhibición de α -amilasas (IIAA)

La actividad α -amilasas se determinara en extractos no procesados y fermentados de harina de frijol usando colorimetría del ácido 3,5-dinitrosalicílico (McCue y col 2005). Se preparara una solución de α -amilasas a una concentración de 2U/mL en buffer de fosfatos de potasio pH 6.9 al 0.2mM con 6.7mM de NaCl. 300 μ L de muestra se mezclan con 300 μ L de enzima y se incuba a 37°C por 10 min, luego se le agregara 500 μ L de solución de almidón al 1% en buffer de fosfatos de potasio pH 6.9 al 0.2mM con 6.7mM de NaCl. Luego de 5 min de incubación a 37°C se detiene la reacción con 1 mL de ácido dinitrosalicílico en baño de agua hirviendo por 10 min, se enfrió y diluyo a 10 mL con agua. Se le medió absorción a 540 nm). Los datos se reportaran como índice de inhibición de α -amilasa (IIAA), que se definieron como la relación de la actividad de la α -amilasa del control (enzima solo) / actividad de la enzimas en el extracto de la harina de frijol común bioprocesado. Los valores superiores a 1 indican una inhibición de la α -amilasa. Se utilizó una curva de acarbosa como control y se reportaron resultados como μ g equivalentes de acarbosa (EA) por 100 gramos de muestra.

b Índice de inhibición de α -glucosidasa (IIAG)

La inhibición α -glucosidasa se midió según la metodología de López-Angulo y col (2014) con ligeras modificaciones. En una microplaca de 96 pocillos, se le agregaron alícuotas de las muestras (50 mL) y mezclaron con 100 mL de la α -glucosidasa (0.5 U/mL) en buffer de fosfato (0.1 M, pH 6.9); la microplaca se incubó durante 10 min a

37°C y se añadió y 50 mL de p-nitrofenilo-glucopiranosido en buffer de fosfato (5 mM) a cada pocillo. Nuevamente, la microplaca se incubó (37°C / 10 min) y se midió la absorbancia a 405 nm utilizando un Lector de Microplacas (Synergy™ , BioTek, Inc., Winooski, VT, EUA). Los datos se reportaran como índice de inhibición de α -glucosidasa (IIAG), que se definieron como la relación de la actividad de la α -glucosidasa del control (enzima solo) / actividad de la enzimas en el extracto de la harina de frijol común bioprocesado. Los valores superiores a 1 indican una inhibición de la α -glucosidasa. Se utilizó una curva de acarbosa como control y se reportaron resultados como μ g equivalentes de acarbosa (EA) por 100 gramos de muestra.

6 Optimización proceso de fermentación en estado sólido (FES)

a Metodología de superficie de respuesta (MSR) y diseño experimental

Se aplicó la metodología de superficie de respuesta (MSR) para determinar las condiciones óptimas de las variables de proceso para la elaboración de una harina de frijol común bioprocesado optimizada (**HFCBO**) con actividad antioxidante (**AAox**), compuestos fenólicos totales (**CFT**) e índice de inhibición de α -amilasa (**IIAA**) altos. Las condiciones del proceso [número y variación (niveles mínimo y máximo) de las variables] se obtuvieron de una revisión previa de la literatura y de ensayos preliminares. Las variables del proceso consideradas en este estudio fueron temperatura ($X_1 = \mathbf{TF}$, 22°C-45°C) y tiempo de fermentación ($X_2 = \mathbf{tF}$, 06-108 h). Las variables de respuesta seleccionadas fueron **AAox**, **CFT** y **IIAA**. Se utilizó un diseño central compuesto rotatable (DCCR) incluyendo 13 experimentos formados por 4 puntos factoriales, 4 axiales ($\lambda = 1.414$) y 5 centrales. Valores codificados

correspondientes a los valores reales de cada variable de proceso y DCCR se muestran en el cuadro 9. Cada experimento individual se realizó en orden aleatorio.

b Obtención de harinas de frijol común bioprocesado (HFCB)

Se utilizó el procedimiento de Guzmán-Uriarte y col (2013) y Sánchez-Magaña y col (2014) con modificaciones.

1) Preparación del sustrato

Como sustrato se utilizó frijol común var azufrado higuera. Se usaran 200 g los granos enteros se remojaran por 16 h en disolución acuosa de ácido acético glacial (pH 3); relación 1:3 (p/v). Después la testa se removió manualmente se secaron y molieron para pasar a través de una malla 80, se embolsaron y almacenaron (4°C). El remojo y descascarillado son pasos para acondicionar el grano para el hongo permitiendo la penetración de la enzima y el crecimiento del micelio adecuado. Los cotiledones se sometieron a cocción a 90°C por 30 min, con relación 1:3 (p/v). Se drenaron y secaron superficialmente a temperatura ambiente.

2) Inoculo

Para la fermentación se utilizó la cepa *Rhizopus Oligosporus* NRRL 2710. La cepa liofilizada se propagó en agar de papa dextrosa, en tubos inclinados, a 35°C hasta que el cultivo alcance la esporulación adecuada. Los cultivos se guardaron en refrigeración 4°C hasta su uso. Para obtener la concentración de esporas requerida (1×10^6) se usó el método de Mc Farland (Leptospira LABORATORY 1997), se preparó la suspensión y se les midió absorbancia para determinar el número de esporas que se encuentran suspendidas.

Cuadro 9. Diseño central compuesto rotatable mostrando los tratamientos (combinación de los niveles de las variables de proceso) utilizados para producir harinas de frijol bioprocesado por fermentación en estado sólido.

Tratamiento	Variable del proceso		Variable de respuesta		
	Temperatura de fermentación (°C)	Tiempo de fermentación (h)	AAox (μmol ET/100g, bs)	CFT (mg EAG/100 g, bs)	IIAA (bs)
1	41.63	93			
2	33.5	57			
3	33.5	6			
4	22	57			
5	25.37	93			
6	33.5	108			
7	45	57			
8	33.5	57			
9	33.5	57			
10	33.5	57			
11	41.63	21			
12	33.5	57			
13	25.37	21			

3) Fermentación

Para realizar la fermentación, se agregó la suspensión de esporas (1×10^6 esporas/mL) a los cotiledones en una relación 3 mL por cada 100 g de sustrato. La muestra, una vez inoculada, se colocó en bolsas de polietileno de 15 X 25 cm con perforaciones echas a 4 cm de distancia. Las condiciones de **FES** (13 tratamientos) se derivaron de la aplicación de un diseño de composición central rotatable con dos factores [Temperatura de fermentación ($TF=22-45^\circ\text{C}$) / Tiempo de fermentación ($tF=06-108$ h)] y cinco niveles (**Cuadro 9**). El frijol bioprocesado se secó (50°C / 8 h), se enfrió (25°C) y se molió. Las harinas de frijol bioprocesado, provenientes de cada tratamiento, se mezclaron con sus correspondientes testas molturadas, se empacaron y se mantuvieron a 4°C en recipientes bien cerrados hasta su uso. Una vez obtenidas todas las harinas de frijol común bioprocesado, con testas añadidas, se les evaluó **AAox**, **CFT** y **IIAA**.

c Actividad antioxidante, compuestos fenólicos totales e índice de inhibición de α -amilasa de la harina de frijol común bioprocesada (HFCB)

1) Obtención de los extractos

a) Extractos de fitoquímicos libres

Los extractos libres de las harinas elaboradas a partir de los granos bioprocesados se obtuvieron por el procedimiento descrito en el apartado anterior.

b) Extractos de fitoquímicos ligados

Los extractos ligados de las harinas elaboradas a partir de los granos bioprocesados se obtuvieron por el procedimiento descrito en el apartado anterior.

2) ABTS para compuestos hidrofílicos

Para la evaluación de la actividad antioxidante de la harina de frijol bioprocesado optimizado se hizo por el método de ABTS siguiendo la metodología previamente descrita.

3) Compuestos fenólicos totales

Para la evaluación de los compuestos fenólicos totales de la harina de frijol bioprocesado optimizado se hizo siguiendo la metodología de Folin-Ciocalteu previamente descrita.

4) Índice de inhibición de α -amilasa (IIAA)

Para la evaluación del índice de inhibición de α -amilasa de la harina de frijol bioprocesado optimizado se hizo por el método de siguiendo la metodología previamente descrita.

d Análisis de varianza y regresión

El análisis de varianza y regresión se realizó a los valores experimentales obtenidos para actividad antioxidante (**AAox**), contenido de compuestos fenólicos totales (**CFT**) índice de inhibición de α -amilasa (**IIAA**) de las harinas de HFCB de acuerdo a un diseño experimental central compuesto rotatable de la metodología de superficie de respuesta (**MSR**), con dos variables de proceso, seleccionado para este estudio. Un modelo de regresión cuadrático se asumió para predecir las variables de respuesta (**Y**). Se desarrollaron modelos de predicción para cada una de las variables de respuesta:

$$Y = \beta_{0+} + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2$$

Donde: Y es el valor de la variable de respuesta predicha considerada (**AAox**, **CFT** o **IIAA**), X_1 y X_2 son los valores de **TF** y **tF**, respectivamente, β_0 es el valor del intercepto, β_1 y β_2 son coeficientes lineales, β_{12} es el coeficiente de interacción, β_{11} y β_{22} son coeficientes cuadráticos. Los términos no significativos ($p > 0.1$) se eliminaron del polinomio de segundo orden y se recalculó un nuevo polinomio obteniendo un modelo de predicción para cada variable de respuesta (Myers 1971; Khuri 1987). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software de Design Expert software Ver. 7.0.0. (2005).

e Optimización

Se aplicó el método de la función de deseabilidad descrito por de la Vara y Domínguez (2002) para encontrar la mejor combinación de variables de proceso de fermentación [temperatura de fermentación (**TF**)/tiempo de fermentación (**tF**)] para producir una harina funcional de frijol común con **AAox**, **CFT** y **IIAA** altos. La combinación de las respuestas en una función de deseabilidad requiere el cálculo de la función de deseabilidad de forma individualizada. El método consistió en seleccionar un punto de la zona experimental $X = (X_1, X_2, X_3)$ y predecir los valores para cada variable de respuesta denominados $Y_1(X)$, $Y_2(X)$ y $Y_3(X)$, a partir de los modelos matemáticas de predicción correspondientes. Luego, cada $Y_i(X)$ se transformó en un valor de deseabilidad individual [$d_i(X)$], que cayera en el intervalo 0-1 midiendo el grado deseabilidad de la respuesta en referencia al valor óptimo determinado a ser alcanzado. En esta investigación se pretendió que los valores de

las variables de respuesta fueran lo más altos posible, por lo tanto, la transformación matemática empleada para calcular d_i fue:

$$d_i(x) = \begin{cases} 0 & \text{Si } \hat{Y}_i(x) \leq Y_{i*} \\ \frac{\hat{Y}_i(x) - Y_{i*}}{Y_i^* - Y_{i*}} & \text{Si } Y_{i*} \leq \hat{Y}_i(x) \leq Y_i^* \\ 1 & \text{Si } \hat{Y}_i(x) \geq Y_i^* \end{cases}$$

Una vez obtenidos los valores de d_i para cada variable de respuesta, estos se emplearon para obtener un valor de deseabilidad global (D) aplicando la siguiente ecuación: [$D=(d_1 \times d_2 \times d_3)^{1/3}$]. El software seleccionó aleatoriamente una cantidad suficiente de puntos experimentales (X) para calcular los valores correspondientes de D en cada punto experimental seleccionado. Posteriormente, estos valores de D fueron empleados para construir un gráfico de deseabilidad global, en la cual la zona roja representó los valores predichos máximos posibles de cada respuesta, de entre los cuales se seleccionó un valor óptimo con las condiciones de **BES** (TF y tF) que dieron por resultado los valores de **AAox**, **CFT** e **IIAA** máximos posibles.

7 Propiedades de la harina de frijol común bioprocesado optimizada (HFCBO)

a Composición química

Se determinó la composición química (Humedad, Proteína cruda, Grasa cruda, Fibra dietaria total, cenizas y carbohidratos) a la harina de frijol común bioprocesada optimizada mediante los procedimientos descritos previamente.

b Propiedades fisicoquímicas

Las propiedades fisicoquímicas de la harina de frijol común bioprocesada optimizada (pH, Color, Actividad acuosa, ISA, IAA, índice de absorción de aceite, formación y estabilidad de espuma, actividad y estabilidad de emulsión e índice de dispersabilidad) se determinaron de acuerdo a los procedimientos descritos previamente.

c Actividad antioxidante

1) Extractos de fitoquímicos libres

Los extractos libres de las harinas elaboradas a partir de los granos bioprocesados se obtuvieron por el procedimiento descrito en el apartado anterior.

2) Extractos de fitoquímicos ligados

Los extractos ligados de las harinas elaboradas a partir de los granos bioprocesados se obtuvieron por el procedimiento descrito en el apartado anterior.

3) ABTS para compuestos hidrofílicos

Para la evaluación de la actividad antioxidante de la harina de frijol bioprocesado optimizado se hizo por el método de ABTS siguiendo la metodología previamente descrita.

4) ORAC para compuestos hidrofílicos

Para la evaluación de la actividad antioxidante de la harina de frijol bioprocesado optimizado se hizo por el método de ORAC siguiendo la metodología previamente descrita.

d Compuestos fenólicos totales (CFT)

Para la evaluación de los compuestos fenólicos totales de la harina de frijol bioprocesado optimizado se hizo siguiendo la metodología de Folin-Ciocalteu previamente descrita.

e Índice de inhibición de α -amilasa (IIAA)

Para la evaluación del índice de inhibición de α -amilasa de la harina de frijol bioprocesado optimizado se hizo por el método de siguiendo la metodología previamente descrita. Se utilizó una curva de acarbosa como control y se reportaron resultados como μg equivalentes de acarbosa (EA) por 100 gramos de muestra.

f Índice de inhibición de α -glucosidasa (IIAG)

Para la evaluación del índice de inhibición de α -glucosidasa de la harina de frijol bioprocesado optimizado se hizo por el método de siguiendo la metodología previamente descrita. Se utilizó una curva de acarbosa como control y se reportaron resultados como μg equivalentes de acarbosa (EA) por 100 gramos de muestra.

8 Análisis estadístico

Los resultados se sometieron a análisis unidireccional de la varianza (ANOVA), seguido por comparación de la prueba de rango múltiple de Duncan entre los medios con un nivel de significancia de 0.05. Se utilizó un software estadístico para el análisis y la evaluación.

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LOS GRANOS DE FRIJOL COMÚN VAR AZUFRAO HIGURA

En el Cuadro 10 se muestran las características físicas de los granos de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) var azufrado higuera.

Las dimensiones físicas de los granos son indicadores de la calidad comercial, manejo y almacenamiento de los mismos. El tamaño de los granos de frijol común fue 13.41 mm de largo, 7.66 mm de ancho y 6.62 mm de grosor.

El peso de 100/1,000 granos es otra medida que indica el tamaño del grano de frijol común. El peso 100 granos en frijol común fue de 48.4 g y el peso de 1,000 fue de 481.95 g. El peso de hectolítrico es una medida indirecta de la densidad del grano, es considerado un indicador de la calidad del grano y depende de su acomodo en un espacio determinado. Demasiados espacios vacíos resultarán en un bajo peso hectolítrico. El peso hectolítrico de los granos de frijol común fue de 82.53 Kg/hL. El calibre fue de 64.2 granos/ 30 g.

Las características físicas de los granos son indicadores de la calidad comercial, manejo y almacenamiento de los mismos. Existe una correlación entre las características de remojo y el tiempo de cocción de las semillas de leguminosas con las características físicas del grano (Williams y col 1983).

Cuadro 10. Características físicas de los granos de frijol común

Característica	
Dimensiones físicas (mm)	
Largo	13.41 ± 0.82
Ancho	7.66 ± 0.46
Grosor	6.62 ± 0.41
Peso de 100 granos (g)	48.4 ± 0.1
Peso hectolítrico (Kg/hL)	82.53 ± 0.98
Calibre (granos/30 g)	64.2 ± 1.87
% testa	7.38 ± 0.39

B MEJORES CONDICIONES PARA LA PRODUCCIÓN DE HARINA DE FRIJOL COMÚN BIOPROCESADA OPTIMIZADA (HFCBO)

El cuadro 11 muestra las diferentes combinaciones de variables del proceso de fermentación en estado sólido [Temperatura de fermentación (**TF**) y tiempo de fermentación (**tF**)] utilizadas para la producción de harina de frijol común var azufrado higuera bioprocesado y los valores experimentales de las variables de respuesta [Actividad antioxidante (**AAox**), Compuestos fenólicos totales (**CFT**) e Índice de inhibición de α -amilasa (**IIAA**)] obtenidas para cada combinación.

1 Modelo de predicción

A partir de los resultados experimentales de cada una de las variables de respuesta, y de los tratamientos que los originaron (Cuadro 11), se desarrollaron modelos de predicción para cada una de ellas. A estos modelos de predicción se les probó su idoneidad y ajuste por análisis de varianza (ANOVA, Cuadro 12). Un buen modelo de predicción debe tener un R^2 ajustado (coeficiente de determinación) ≥ 0.80 , un nivel de significancia de $p \leq 0.1$, coeficientes de variación (CV) $\leq 10\%$, y prueba de falta de ajuste $p > 0.05$; todos estos parámetros fueron usados para la validez del modelado (Jahani y col 2008; Myers y Montgomery 2002).

a Actividad antioxidante (AAox)

La **AAox** de las harinas de frijol común bioprocesado (**HFCB**) varió de 5,886 hasta 13,515 $\mu\text{mol ET} / 100 \text{ g}$ de muestra (bs). El análisis de varianza mostró que la **AAox** dependió del término lineal de tiempo de fermentación [**tF**, $p < 0.05$] y el término cuadrático de temperatura de fermentación **TF** [$(\text{TF})^2$, $p < 0,01$], el término

Cuadro 11. Diseño central compuesto rotatable mostrando los tratamientos (combinación de los niveles de las variables de proceso) utilizados para producir harinas de frijol bioprocesado por fermentación en estado sólido y resultados experimentales para las variables de respuesta

Tratamiento	Variable del proceso		Variable de respuesta		
	Temperatura de fermentación (°C)	Tiempo de fermentación (h)	AAox (μmol ET/100g, bs)	CFT (mg EAG/100 g, bs)	IIAA
1	41.63	93	10,078	219	6.25
2	33.5	57	8,350	193	5.28
3	33.5	6	5,997	143	5.18
4	22	57	5,886	137	4.91
5	25.37	93	11,066	237	6.29
6	33.5	108	13,515	259	7.37
7	45	57	6,363	149	5.15
8	33.5	57	8,783	182	5.79
9	33.5	57	9,897	201	5.31
10	33.5	57	10,441	211	5.09
11	41.63	21	6,106	150	4.74
12	33.5	57	8,503	179	5.19
13	25.37	21	5,965	135	4.46

Cuadro 12. Coeficientes de regresión y análisis de varianza de los modelos experimentales de predicción mostrando la relación entre las variables de respuesta (**AAox**, **CFT**, **IIAA**) y variables del proceso (**TF**, **tF**) para la producción de harinas de frijol común bioprocesado (**HFCB**).

Coeficientes	AAox ($\mu\text{mol ET}/100 \text{ g, bs}$)		CFT ($\text{mg EAG}/100\text{g, bs}$)		IIAA	
	Codificado	Sin codificar	Codificado	Sin codificar	Codificado	Sin codificar
Intercepto						
β_0	9449.41	19646.70154	198.26	-258.26917	5.33	1.33996
Lineal						
β_1	-21.38 ^{NS}	-1507.27915	1.69 ^{NS}	23.10481	0.073 ^{NS}	0.21584
β_2	2463.14*	68.30221	41.78*	1.15866	0.80*	-0.014381
Cuadrático						
β_{11}	-1490.19*	-22.53595	-22.60*	-0.34175	-0.20*	-3.08825E-003
β_{22}	NS	NS	NS	NS	0.42*	3.21552E-004
Interacciones						
β_{12}	NS	NS	NS	NS	NS	NS
P_{modelo}	<0.0001		<0.0001		<0.0001	
P_{falta de ajuste}	0.7664		0.4600		0.7686	
CV	9.23		7.58		4.22	
R²	0.9201		0.9093		0.9419	
R²_{ajustada}	0.8934		0.8791		0.9128	
R²_{predicha}	0.8454		0.7895		0.8575	

* Nivel de significancia a $P \leq 0.10$

^{NS} No significativo

lineal de temperatura de fermentación no fue significativo [**TF**, $p > 0.1$], pero no fue eliminado del modelo para mejorar la significancia del mismo. Los modelos de predicción para la **AAox** fueron:

Usando valores codificados:

$$\mathbf{AAox} = 9449.41 - 21.38 (\mathbf{A}) + 2463.14 (\mathbf{B}) - 1490.19 (\mathbf{A})^2$$

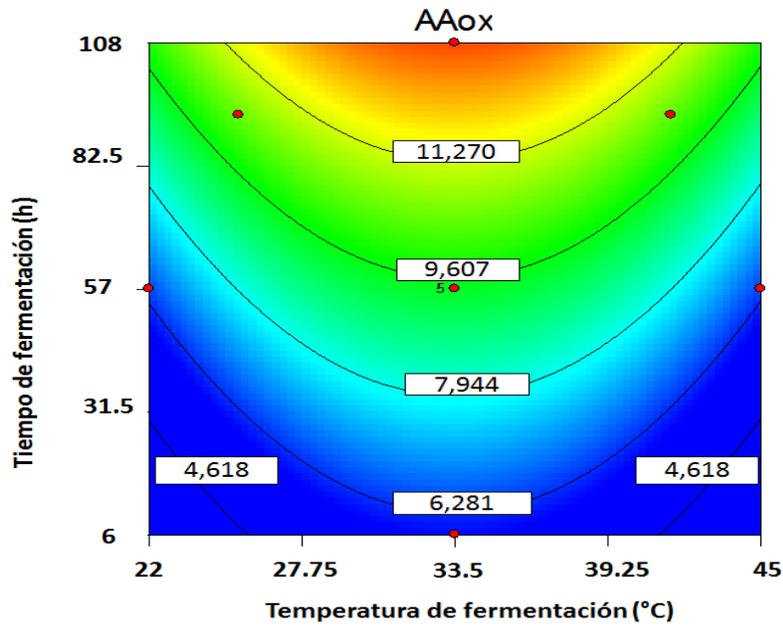
Usando variables originales:

$$\mathbf{AAox} = - 19646.70154 + 1507.27915 (\mathbf{TF}) + 68.30221 (\mathbf{tF}) - 22.53595 (\mathbf{TF})^2$$

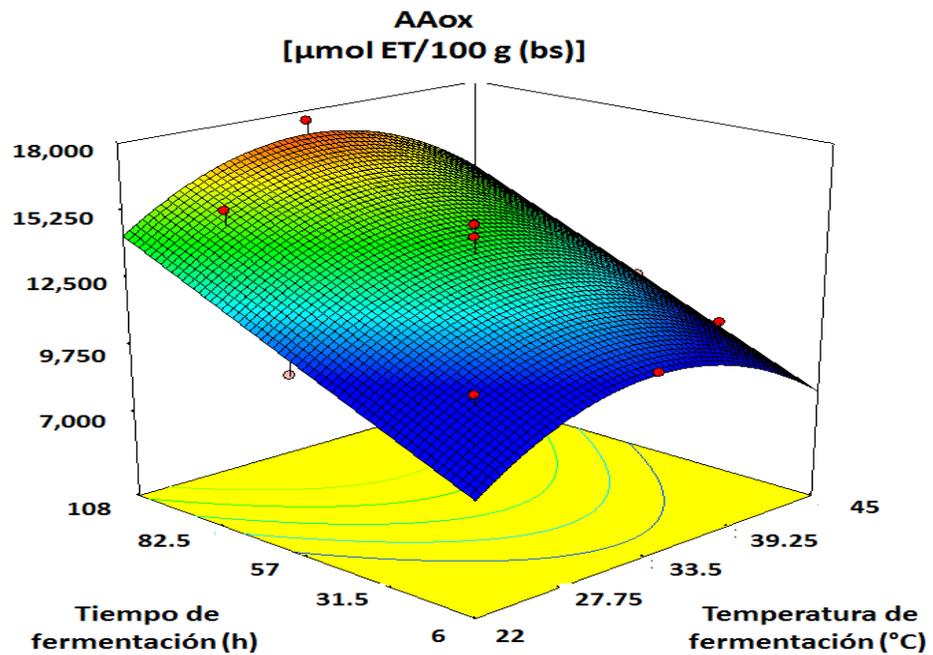
El **modelos de predicción** explicó el 92% ($p < 0.0001$) de la variación total en los valores **AAox**; la falta de ajuste no fue significativa ($p > 0.05$).

La dispersión relativa de los puntos experimentales a partir de las predicciones de los modelos (CV) fue de 9.23%. Estos valores indicaron que el modelo experimental para **AAox** fue adecuado y reproducible. A partir de los modelos matemáticos de predicción se construyeron gráficos de contorno [Figura 4(A)] y de superficie de respuesta [Figura 4(B)] en las cuales se observa el efecto de las variables del proceso de fermentación **TF** y **tF** sobre la **AAox**.

En los gráficos se observa que a medida que incrementa la temperatura se ve un incremento en la **AAox** hasta alcanzar las temperaturas centrales (33.5°C), a partir de este punto se observa una caída en la **AAox**, a su vez se observa que al pasar el tiempo la respuesta incrementa observándose los valores más altos de **AAox**



A)



B)

Figura 4. Gráficas de contornos (A) y superficie de respuesta (B) mostrando el efecto de las variables de proceso de fermentación TF y tF sobre la $AAox$ ($\mu\text{mol ET}/100 \text{ g}$ de muestra, bs) de las harinas de frijol común bioprocesado ($HFCB$).

[13,515 $\mu\text{mol ET} / 100 \text{ g}$ de muestra (bs)] a la temperatura central ($TF = 33.5^\circ\text{C}$) y el tiempo más largo ($tF=108\text{h}$) de fermentación, dicho valor fue significativamente mayor que el valor observado en la harina de frijol común crudo [5,214 $\mu\text{mol ET} / 100 \text{ g}$ de muestra (bs)]. Diversos autores han reportado el efecto de la fermentación en granos sobre la **AAox**, tales como la soya (Chen-Tien y col 2009), el frijol negro (Rochín-Medina y col 2015), cebada (Feng y col 2007), entre otros, observándose un incremento significativo en esta respuesta.

El incremento de la **AAox** durante la fermentación puede deberse a que el hongo *Rhizopus Oligosporus* produce enzimas como lipasas, proteasas y enzimas celulolíticas (β - glucosidasas, xilanasas, endoglucanasas) cuya actividad y concentración incrementan con respecto al tiempo, las cuales podrían liberar compuestos que responsables del incremento de dicha actividad (Bei-Zhong y col 2003; Miszkiewicz y col 2003). McCue y col en el 2003 y Cheng y col en el 2013 fermentaron soya y soya negra, respectivamente, observaron que durante la fermentación la actividad enzimática (β -glucosidasa) y la actividad antioxidante incrementaban, ellos concluyeron que el incremento de la **AAox** es debido a la liberación de compuestos con actividad antioxidante gracias a la actividad de dichas enzimas.

b Compuestos fenólicos totales (CFT)

El contenido de **CFT** varió de 135 a 259 mg EAG / 100 g de muestra (bs). El análisis de varianza mostró que los **CFT** dependieron del término lineal de tiempo de fermentación [tF , $p < 0.05$)] y el término cuadrático de temperatura de fermentación

TF [$(TF)^2$, $p < 0,01$], el término lineales de temperatura de fermentación no fue significativo [**TF**, $p > 0.1$], pero no fue eliminado del modelo para mejorar la significancia del mismo. Los modelos de predicción para la **CFT** fueron:

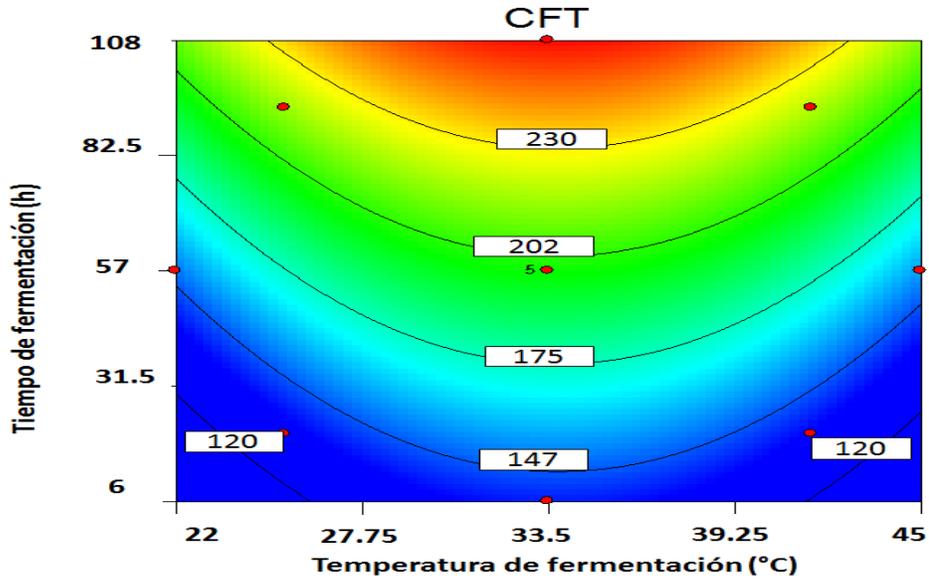
Usando valores codificados:

$$\mathbf{CFT} = 198.26 + 1.69 (\mathbf{A}) + 41.78 (\mathbf{B}) - 22.60 (\mathbf{A})^2$$

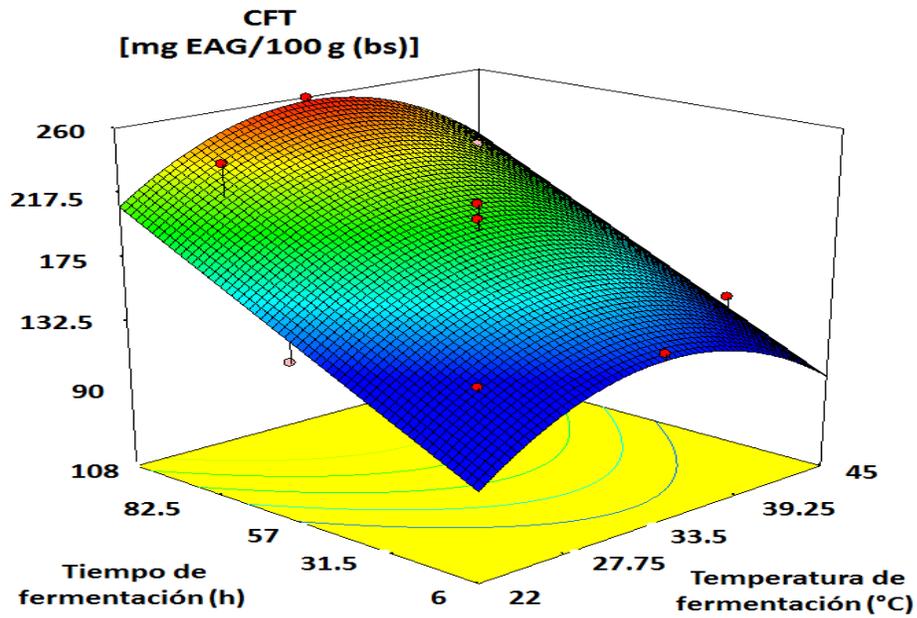
Usando variables originales:

$$\mathbf{CFT} = - 258.26917 + 23.10481 (TF) + 1.15866 (tF) - 0.34175 (TF)^2$$

El **modelo de predicción** explicó el 90% ($p < 0.0001$) de la variación total en los valores de **CFT**; la falta de ajuste no fue significativa ($p > 0.05$). La dispersión relativa de los puntos experimentales a partir de las predicciones del modelo (CV) fue de 7.58%. Estos valores indicaron que el modelo experimenta para **CFT** fue adecuado y reproducible. A partir de los modelos matemáticos de predicción se construyeron gráficos de contorno [Figura 5(A)] y de superficie de respuesta [Figura 5(B)] en las cuales se observa el efecto de las variables del proceso de fermentación **TF** y **tF** sobre los **CFT**. La harina de frijol común crudo tuvo concentración de **CFT**=108 mg GAE / 100 g de muestra (bs), los cuales fueron significativamente inferiores a al valor máximo de **CFT** [259 mg GAE / 100 g de muestra (bs)] observados a la temperatura central (**TF** = 33.5°C) y el tiempo más largo (**tF**=108h) de fermentación. Un comportamiento similar fue reportado por Schmidt y col (2014) quienes evaluaron el perfil de ácidos fenólicos durante la fermentación con *Rhizopus oryzae*



A)



B)

Figura 5. Gráficas de contornos (A) y superficie de respuesta (B) mostrando el efecto de las variables de proceso de fermentación TF y tF sobre los CFT (mg EAG/100 g de muestra, bs) de las harinas de frijol común bioprocesado ($HFCB$).

en arroz integral, ellos reportaron un incremento en el contenido de ácidos fenólicos con respecto al tiempo.

Por otra parte, Cheng y col (2013) investigaron el efecto del tiempo de fermentación usando *Rhizopus oligosporus* en soya negra respecto al contenido de isoflavonas en soya negra en el cual observaron que el contenido y perfil de isoflavonas se incrementó con el tiempo, atribuyendo el incremento de los **CFT** a los cambios metabólicos durante la **FES**, principalmente a un aumento en la actividad de las enzimas endógenas durante la fermentación de los alimentos, en especial la enzima fúngica β -glucosidasa que cataliza la liberación de agliconas lo cual incrementó el contenido de **CFT**.

A su vez, midieron la actividad la enzima β -glucosidasa producida por el hongo, observando que a medida que pasa el tiempo la actividad de dicha enzima incrementa. Estos compuestos fenólicos presentes en frijol, que poseen bioactividad alta contra los radicales libres (actividad antioxidante), pudieron aumentar significativamente durante la **FES** con *R oligoporus*, a través de un mecanismo similar. Guzmán-Uriarte y col (2013) y Sánchez-Magaña y col (2014) evaluaron el contenido de **CFT** y la **AAox** con respecto al tiempo de fermentación en frijol y garbanzo respectivamente, observando un incremento de estas variables con respecto al tiempo, a su vez, aplicaron análisis de regresión a los datos encontrando una correlación lineal positiva entre la **AAox** y el **CFT** con respecto al tiempo. Se necesitan más investigaciones para estudiar el efecto del proceso de FES con *R. oligosporus* sobre el contenido de compuestos bioactivos específicos (flavonoides,

ácidos fenólicos) para conocer las posibles propiedades nutraceuticas y el potencial antioxidante de la harina de frijol común bioprocesado (**HFCB**).

c Índice de inhibición de α -amilasa (**I**I**A**A)

Los resultados de **I**I**A**A varió de 4.46 hasta 7.37 (bs). El análisis de varianza mostró que el **I**I**A**A dependió del término lineal de tiempo de fermentación [**tF**, $p < 0.01$] y los términos cuadráticos de temperatura de fermentación **TF** y tiempo de fermentación **tF** [$(TF)^2$ y $(tF)^2$, $p < 0,01$], el término lineales de temperatura de fermentación no fue significativo [**TF**, $p > 0.1$], pero no fue eliminado del modelo para mejorar la significancia del mismo. Los modelos de predicción para la **I**I**A**A fueron:

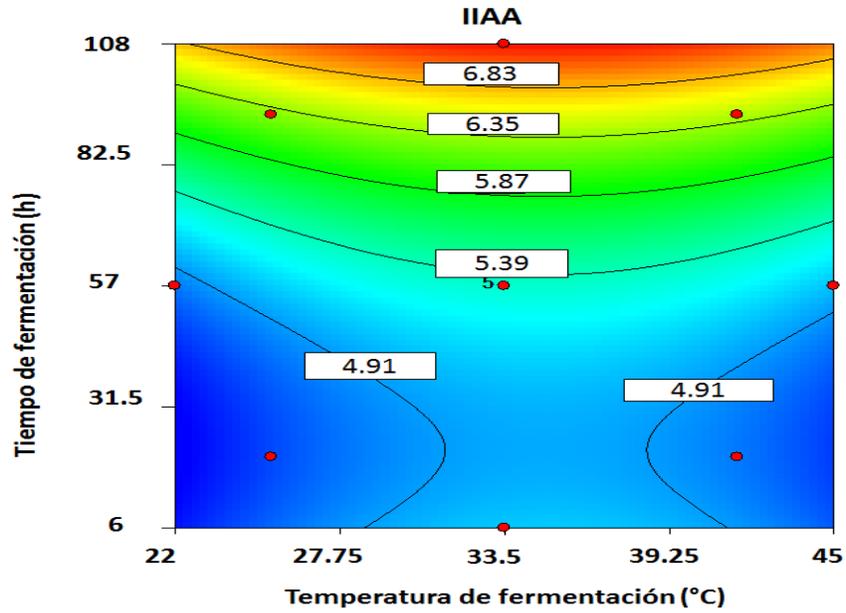
Usando valores codificados:

$$\mathbf{I\!I\!A\!A = 5.33 + 0.073\ TF + 0.80\ tF - 0.20(TF)^2 + 0.42(tF)^2}$$

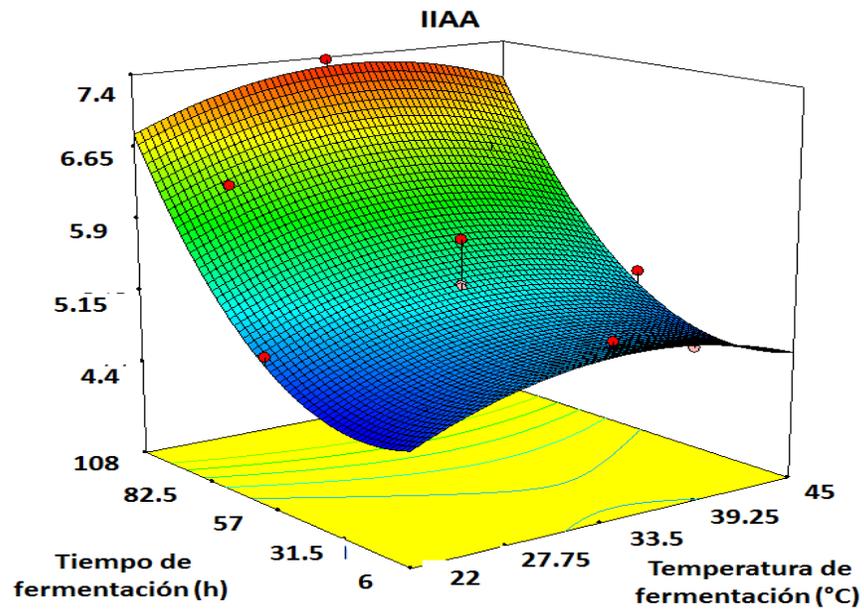
Usando variables originales:

$$\mathbf{I\!I\!A\!A = 1.33996 + 0.21584\ TF - 0.014381\ tF - 3.08825E-003\ (TF)^2 + 3.21552E-004(tF)^2}$$

El **modelo de predicción** explicó el 94% ($p < 0.0001$) de la variación total en los valores de **I**I**A**A; la falta de ajuste no fue significativa ($p > 0.05$). La dispersión relativa de los puntos experimentales a partir de las predicciones del modelo (CV) fue de 4.22%. Estos valores indicaron que el modelo experimental para **I**I**A**A fue adecuado y reproducible. A partir de los modelos matemáticos de predicción se construyeron gráficos de contorno [Figura 6(A)] y de superficie de respuesta [Figura 6(B)] en las cuales se observa el efecto de las variables del proceso de fermentación **TF** y **tF** sobre los La harina de frijol común crudo tuvo un **I**I**A**A=4.64 (bs), el cual fue



A)



B)

Figura 6. Gráficas de contornos (A) y superficie de respuesta (B) mostrando el efecto de las variables de proceso de fermentación TF y tF sobre el $IIAA$ de las harinas de frijol común bioprocesado ($HFCB$)

significativamente inferior al valor máximo de ***I*IAA** [7.27 (bs)] observados a la temperatura central (***T*F** = 33.5°C) y el tiempo más largo (***t*F**=108h) de fermentación.

Sánchez-Magaña y col (2014) fermentaron garbanzo con la cepa *Rhizopus oligosporus*, ellos evaluaron el efecto inhibitorio de los extractos fenólicos de las harinas de garbanzo fermentado con respecto al tiempo obteniendo los valores más altos en los tiempos más largos del proceso. El efecto inhibitorio de los extractos de frijol fermentado puede deberse a los compuestos fenólicos presentes en el grano de frijol. Tadera y col (2006) determinaron la actividad inhibitoria de 6 diferentes grupos de flavonoides observando que estos eran capaces de inhibir las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa.

Por otra parte, Mojica y col (2015) estudiaron 15 variedades de frijol, ellos evaluaron el efecto inhibitorio de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa de los extractos fenólicos de cada variedad observando que estos eran capaces de inhibir la actividad de dichas enzimas.

2 Optimización

Los valores de deseabilidad individual para cada respuesta, asociados con este valor de ***D*** máximo seleccionado fueron: **d_{AAox}** =0.92375, **d_{CFT}** =0.98611, **d_{IIAA}** =0.97666 (Figura 7). En la Figura 8(A) se muestra el gráfico de deseabilidad global (***D***), en la cual la zona roja representó los valores predichos máximos posibles de ***D*** para cada respuesta (***AAox***, ***CFT***, ***IIAA***), de entre los cuales se seleccionó un valor óptimo (***D***=0.962) con las condiciones de ***FES*** (***T*F** y ***t*F**) que dieron por resultado los valores de ***AAox***, ***CFT*** e ***IIAA*** máximos posibles. La mejor combinación

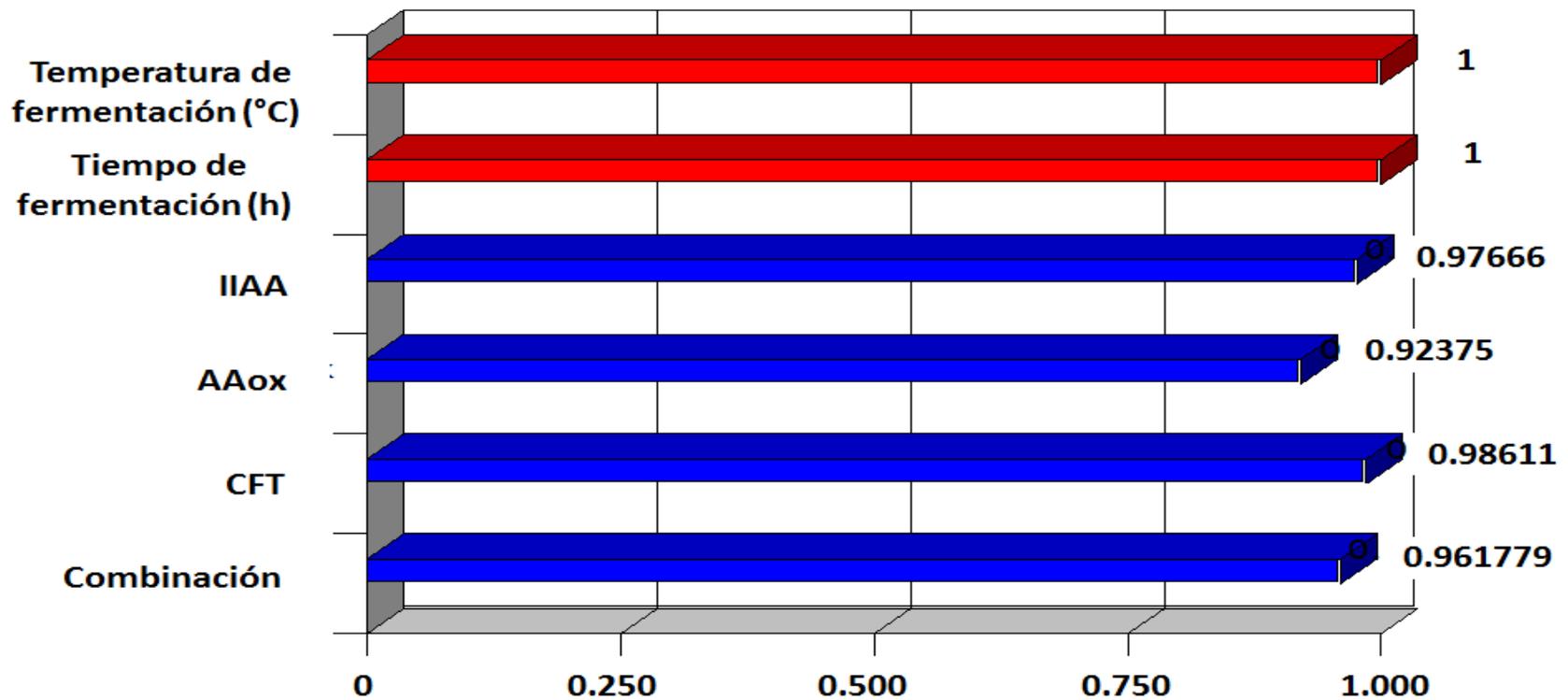
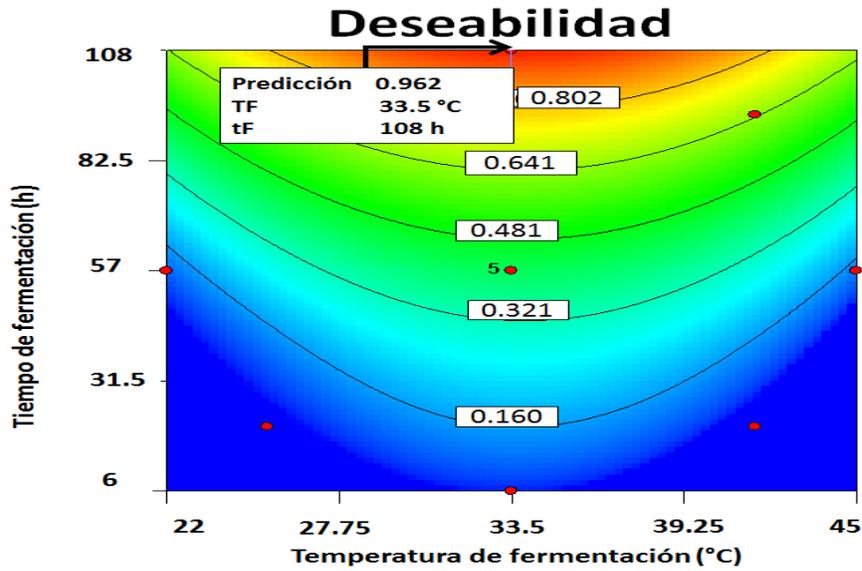
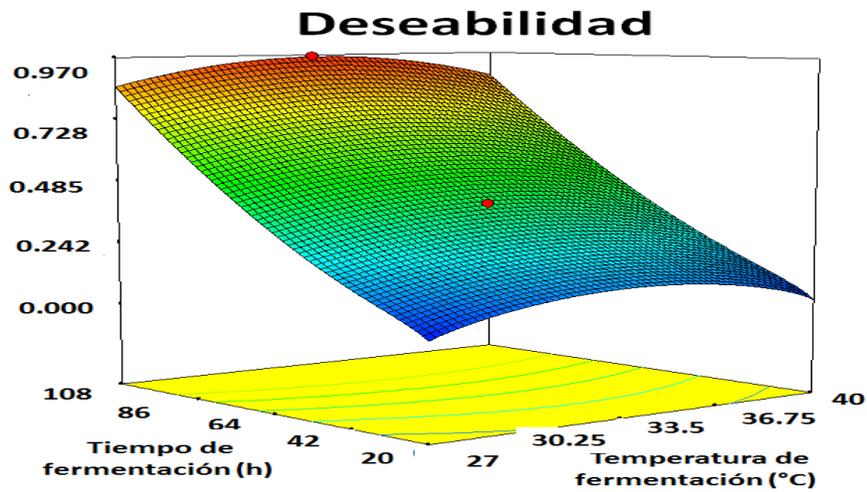


Figura 7. Gráfica de deseabilidades individuales (d_i) para las variables de respuesta (**AAox**; **CFT**; **IIAA**) y deseabilidad global obtenidas durante la optimización del proceso de fermentación para la obtención de harina de frijol común bioprocesado optimizado (**HFCBO**) con **AAox**, **CFT** e **IIAA** altos. **TF**= temperatura de fermentación; **tF**= tiempo de fermentación



A)



B)

Figura 8. Gráficas de contornos (A) y superficie de respuesta (B) mostrando el efecto de las variables de proceso de fermentación TF y tF sobre la deseabilidad global de las variables de respuesta ($AAox$, CFT y $IIAA$) empleada para la optimización del proceso de fermentación para la obtención de harina de frijol común bioprocesado optimizado ($HFCBO$).

de variables de proceso de fermentación para la producción de harina de frijol común bioprocesado optimizado (**HFCBO**) fue: $TF=33.5^{\circ}C/ tF =108$ h [Figura 8(A)]. La **D** obtenida en esta investigación fue mayor que la considerada aceptable ($0.6 < D < 0.8$) de acuerdo con De la Vara y Domínguez (2002).

Los valores predichos de **AAox**, **CFT** e **IIAA**, aplicando la combinación óptima de variables de proceso en los modelos de predicción, fueron de 12,933 $\mu\text{mol ET}/100$ g (bs) y 257.35 mg EAG/ 100g (bs) y un índice de inhibición de 7.3, respectivamente. Al utilizar la mejor combinación ($TF=33.5^{\circ}C/ tF =108$ h) [Figura 8(A)] [Figura (B)] de variables de proceso para obtener experimentalmente **HFCBO**, realizando cinco repeticiones, se obtuvieron valores similares a los predichos [**AAox**= 12,455-14,343 $\mu\text{mol ET}/100$ g (bs), **CFT**= 244-266 mg EAG/ 100g (bs), **IIAA**= 6.692-8.873]. Los valores experimentales promedio de las cinco replicas para **AAox**, **CFT** e **IIAA** 13,429 de **HFCBO** fueron 13,429 $\mu\text{mol ET}/100$ g (bs), 262 mg EAG/ 100g (bs) y 7.62, respectivamente.

C EFECTO DEL BIOPROCEDAMIENTO SOBRE COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL FRIJOL COMÚN

La composición química, en base seca (bs), de la harina de frijol común crudo con respecto a proteínas, lípidos, minerales, fibra dietaría total (FDT) y carbohidratos fue de 24.51%, 1.21%, 4.41%, 24.99% y 69.92%, respectivamente. La harina de frijol común bioprocesado optimizado (**HFCBO**) presentó contenidos, bs, de 32.8%, 1.36%, 2.99%, 34.75% y 63.27%, para proteínas, lípidos, minerales, FDT y carbohidratos, respectivamente (Cuadro 13).

Cuadro 13. Efecto del bioprocesamiento sobre composición química y propiedades fisicoquímicas de frijol común

Propiedad	HFC	HFCBO
Composición química (% bs)		
Proteínas	24.51 ^b	32.8 ^a
Minerales	4.41 ^a	2.99 ^b
Carbohidratos	69.92 ^a	63.27 ^b
Fibra dietaria		
Insoluble	21.87 ^b	24.45 ^a
Soluble	3.12 ^b	10.30 ^a
Total	24.99 ^b	34.75 ^a
Fisicoquímicas		
Color		
Valor Hunter L	89.62 ^a	79.36 ^b
Diferencia total de color	9.03 ^b	22.79 ^a
Actividad acuosa	0.54 ^a	0.60 ^a
pH	6.42 ^a	5.91 ^b
Índice de absorción en agua ²	2.62 ^b	3.32 ^a
Índice de solubilidad en agua ³	24.35 ^a	24.42 ^a
Índice de absorción de aceite ⁴	0.54 ^b	0.90 ^a
Dispersabilidad (%)	35 ^b	100 ^a
Formación de espuma (%)	45 ^a	10 ^b
Estabilidad de espuma (%)	37 ^b	2 ^a
Actividad de emulsión (%)	75.63 ^a	62.5 ^b
Estabilidad de emulsión (%)	80.15 ^a	78 ^b

¹Las medias se separaron por renglones, aplicando la prueba de rango múltiple de Duncan. Medias con la misma letra no son diferentes ($p < 0.05$); ²g gel/g muestra seca; ³g sólido/100 g de muestra seca; ⁴mL aceite absorbido/g muestra; NP= no presentó

El porcentaje de proteína de la HFCBO incrementó ($p < 0.05$) un 33.82% con respecto a la HFC superior a lo reportado por Guzmán-Uriarte y col (2013) quienes reportaron una concentración de 29.54% de proteína para la misma variedad de frijol común bioprocesada con *Rhizopus oligosporus* a 35°C por 108h.

Diversos autores han reportado el incremento de la proteína durante la fermentación en estado sólido en arroz, garbanzo, frijol, entre otros, reportando un incremento desde 28.10% hasta un 42.8% (Reyes-Bastidas y col 2009, Sánchez-Magaña y col 2014, Oliveira y col 2010). Este fenómeno podría deberse a que durante las etapas iniciales de la FES (remojo, cocción) ocurre la lixiviación de material sólido durante estos tratamientos como reporto Paredes-López y col (1991) al fermentar garbanzo. A su vez, podría deberse al incremento de la biomasa del hongo como reportan Schmidt y col (2014) quienes midieron la glucosamina para medir el crecimiento del hongo reportando la mayor concentración glucosamina y de micelio a partir de las 96h.

Por otro lado, la fermentación aumentó ($p < 0.05$) en un 39.05% el contenido de fibra dietaria total del frijol y disminuyó ($p < 0.05$) un 32.19% los minerales (Cuadro 13). Rochin-Medina y col en el 2015 fermentaron frijol negro observando un incremento de hasta un 41% de fibra durante la fermentación, por otra parte, Reyes-Moreno y col en el 2004 reportaron una disminución en el contenido de minerales de un 41.7% durante la fermentación de frijol común.

Azeke y col en el 2007 reportaron que el crecimiento del hongo y el desarrollo de micelio (rico en fibra) aumenta el contenido de fibra acompañada por el consumo

de carbohidratos y lípidos fuentes de energía, pero a su vez, una disminución en el porcentaje de minerales debido a que durante los primeros pasos del proceso de fermentación (Remojo y cocción) ocurre lixiviación y reducción de la materia sólida del sustrato del hongo.

La fermentación disminuyó drásticamente ($p < 0.05$) el valor Hunter 'L' en un 11% e incrementó ($p < 0.05$) de manera significativa la diferencia total de color en un 152% del grano óptimo con respecto al crudo (Cuadro 13). Los valores de Hunter 'L' y la diferencia total de color de la HFCBO fueron similares a los reportados por Reyes-Bastidas y col en el 2004 quienes obtuvieron valores de Hunter 'L' de 78.86 y una diferencia total de color de 21.59. Un incremento en el valor Hunter 'L' significa un color más claro; sin embargo, la fermentación produjo un color más oscuro, esto probablemente debido a la influencia del color del micelio que al envejecer oscurece gradualmente o bien por compuestos liberados y sintetizados como consecuencia de la BES y del proceso de cocción.

La harina de frijol crudo y bioprocesado presentaron valores de pH de 6.42 y 5.91 ($p < 0.05$). La harina de frijol bioprocesada presentó un mayor valor de pH, esto se debe ya que uno de los pasos previos para la preparación de los granos es el remojo en solución ácida, esto se hace con el fin de permitir la remoción de la cascarilla del grano, alcanzar un pH óptimo para el crecimiento del hongo y evitar el desarrollo de microorganismos que puedan perjudicar el proceso.

La fermentación de frijol también incrementó ($p < 0.05$) el índice de absorción de agua (IAA), esto puede deberse a como consecuencia la actividad microbiana del

hongo. Olanipekun y col en el 2009 fermentaron soya, ellos reportaron un incremento en IAA durante la fermentación debido al daño generado a los gránulos de almidón. Por otro lado, el índice de solubilidad en agua presentó un ligero incremento durante el proceso de fermentación.

La fermentación de frijol también incrementó ($p < 0.05$) el índice de absorción de agua (IAA), esto puede deberse a como consecuencia la actividad microbiana del hongo. Olanipekun y col en el 2009 fermentaron soya, ellos reportaron un incremento en IAA durante la fermentación debido al daño generado a los gránulos de almidón. Por otro lado, el índice de solubilidad en agua presentó un ligero incremento durante el proceso de fermentación.

Un incremento del ISA en los granos fermentados puede deberse a la biosíntesis y liberación de compuestos solubles durante el proceso de fermentación. la desnaturalización parcial de la proteína y la gelatinización del almidón que se producen durante la etapa de cocción pueden ser responsable de estos cambios.

Las harinas de frijol común, crudo y bioprocesado, presentaron una actividad de agua de 0.54 y 0.60, respectivamente. Valores en donde el desarrollo de la actividad enzimática, el crecimiento de microorganismos y reacciones químicas se llevan a cabo muy lentamente, lo cual significa una larga vida de anaquel.

Las harinas de frijol crudo y bioprocesado tuvieron valores de dispersabilidad de 35% y 100%, respectivamente. La harina de frijol común bioprocesado tuvo una dispersabilidad mayor ($p < 0.05$) a la de la harina de frijol común crudo. Argüelles-López (2012) reportó una dispersabilidad de 34.25 % en harinas de frijol azufrado

higuera crudo. Una dispersabilidad de 100% sugiere que las partículas de la harina permanecen suspendidas en el agua, característica valiosa para la formulación de algunos productos alimenticios, como bebidas. El cambio en esta propiedad se puede atribuir a una mayor interacción de las partículas de la harina bioprocesada con el agua y a un descenso en su densidad; o tal vez a la disminución en la proporción de almidón, ya que éste no es soluble en agua fría. El valor de dispersabilidad se ha correlacionado, de manera indirecta, al grado de desnaturalización de las proteínas de un alimento procesado; un valor de dispersabilidad alto indica una menor desnaturalización de las proteínas (Visser y Thomas, 1987). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, indica que el proceso de fermentación no provocó la desnaturalización de las proteínas ya que presentó un 100% de dispersabilidad de las harinas.

La síntesis y degradación de compuestos durante la fermentación también podría haber influido en el incremento de la dispersabilidad, capacidad de absorción de aceite, propiedades emulsificantes y espumantes del grano. Los tratamientos térmicos desnaturalizan las proteínas, las cuales forman grandes agregados incapaces de cubrir eficientemente las gotas de grasa, lo que conlleva a la inestabilidad de la emulsión y pérdida de otras propiedades funcionales (Raikos, 2010). Otros investigadores (Angulo-Bejarano y col 2008; Reyes-Bastidas y col 2010) observaron un comportamiento similar de las propiedades fisicoquímicas de harinas de leguminosas crudas y fermentadas.

D EFECTO DEL BIOPROCESAMIENTO SOBRE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES DE FRIJOL COMÚN

Debido a las diferencias en la base teórica de los diferentes métodos de medición de la actividad antioxidante, un solo modelo no puede reflejar todo el potencial antioxidante de las muestras. La actividad antioxidante hidrofílica total (suma de actividades antioxidantes de fitoquímicos libres y ligados) se determinó empleando las metodologías de ABTS y ORAC obteniendo valores para el grano integral de frijol común crudo de 5,214 y 10,747 μmol equivalentes de Trolox (TE)/ 100 g muestra, respectivamente (Cuadro 14).

La AAox de la HFCBO evaluada y cuantificada en μmol TE/ 100 g muestra, fue: ABTS=13,429 y ORAC=24,976. En el grano crudo la mayor contribución a la AAox de frijol común evaluada correspondió a los fitoquímicos ligados en un 69.04% por ABTS y 50.34% ORAC, respectivamente; mientras que en la HFCBO la mayor contribución a la AAox correspondió a los fitoquímicos libres (72.59 y 75.27%) (Cuadro 14). El bioproceso de fermentación incrementó ($p \leq 0.05$) en 157.55 y 132.40% la AAox evaluada por ABTS y ORAC, respectivamente.

Chang y col (2009) fermentaron soya negra con la cepa *Rhizopus oligosporus* y evaluaron la actividad antioxidante de los extractos tanto del crudo como del procesado. Estos investigadores observaron incremento de un 320% de la actividad antioxidante producto de la fermentación, en relación a la actividad antioxidante de la soya negra cruda.

Cuadro 14. Efecto del bioprocesamiento sobre la actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos de frijol común

Propiedad	HFCC	HFCBO
Actividad antioxidante²		
ORAC		
Fitoquímicos libres	5,337 ^b	18,800 ^a
Fitoquímicos ligados	5,410 ^b	6,179 ^a
Total	10,747 ^b	24,976 ^a
ABTS		
Fitoquímicos libres	1,615 ^b	9,749 ^a
Fitoquímicos ligados	3,600 ^b	3,680 ^a
Total	5,214 ^b	13,429 ^a
Compuestos fenólicos totales³		
Fitoquímicos libres	24 ^b	151 ^a
Fitoquímicos ligados	86 ^b	112 ^a
Total	110 ^b	263 ^a

¹Las medias se separaron por renglones, aplicando la prueba de rango múltiple de Duncan. Medias con la misma letra no son diferentes ($p < 0.05$); ² μmol equivalentes de Trolox (ET)/100 g, bs; ³ mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/100g, bs

Sánchez-Magaña y col (2014) estudiaron el efecto de la fermentación en estado sólido en garbanzo. Evaluaron la AAox, de la fracción libre y ligada, por ABTS y ORAC con respecto al tiempo, ellos reportaron que durante la fermentación se ve un mayor efecto sobre la fracción libre, observando que esta respuesta incremento con respecto al tiempo, por otra parte la fracción ligada incrementa pero en menor medida solo observándose cambios significativos en los tiempos largos, obteniendo los valores más altos da AAox en los tiempos más largos.

El contenido de compuestos fenólicos totales en el frijol común crudo y fermentado fue de 110 mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/ 100 g muestra, bs y 263 mg GAE/ 100g muestra, bs, respectivamente (Cuadro 14). En el grano crudo la mayor concentración de fenólicos evaluada correspondió a los fitoquímicos ligados en un 78.9%; mientras que en la HFCBO la mayor concentración de fenólicos correspondió a los fitoquímicos libres con un 57.41%. El bioproceso de fermentación incremento ($p \leq 0.05$) el contenido de compuestos fenólicos libres, ligados y totales del grano de frijol común en un 556%, 30% y 141%, respectivamente.

Chaiyasut y col (2010) investigaron el efecto de la fermentación en estado sólido usando como cepa *Aspergillus oryzae* en soya. Ellos evaluaron el perfil isoflavonas, sus glicosidos y agliconas (daidzina, genistina, daidzeina y genisteína). Reportando a durante la fermentación la agliconas incrementan mientras que los glicosidos disminuyen. A su vez, Cheng y col (2013) evaluaron dicho perfil durante la fermentación de soya negra utilizando la cepa *Rhizopus Oligosporus*, ellos reportaron un comportamiento similar en donde observaron que durante la fermentación existe

una disminución de los glucósidos pero a su vez un incremento en las agliconas, también evaluaron los compuestos fenólicos totales y la actividad de la enzima β -glucosidasa, donde ambas respuestas se veían incrementadas con respecto al tiempo.

Randhir y Shetty (2008) fermentaron frijol mungo con la cepa *Rhizopus oligosporus*. Ellos evaluaron el incremento de los compuestos fenólicos durante la fermentación, la actividad de la enzima β -glucosidasa y la concentración de proteína medida por el método de Bradford, Observando que con el tiempo los compuestos fenólicos incrementan, a su vez, la actividad de la enzima β -glucosidasa y la concentración de proteína incrementan igual encontrando una correlación en las tres respuestas, también observaron que tanto la actividad de la enzima β -glucosidasa y la concentración de proteína a partir de los 10 días mantenían los mismos niveles.

Guzmán-Uriarte y col (2013) fermentaron frijol común a 35°C y de 24-108h, reportando un comportamiento similar al de este estudio, ellos observaron que durante la fermentación la concentración de fenólicos totales de la fracción libre se ve mayormente afectada con respecto a la ligada, ellos reportaron un incremento de compuestos fenólicos de 345% para la fracción libre y 26% para la fracción ligada, obteniendo los valores más altos a 108h.

E EFECTO DEL BIOPROCESAMIENTO SOBRE POTENCIAL HIPOGLUCÉMICO DE FRIJOL COMÚN

Una medida preventiva importante para el control de las primeras etapas de la diabetes tipo 2, es regular la absorción de glucosa a través de la reducción de la

hidrólisis digestiva del almidón mediante la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa.

Las harinas de frijol común cruda y optimizada presentaron valores de inhibición de α -amilasa de 4.64 y 7.65, respectivamente. En la harina de frijol común crudo la fracción libre contribuyó al 56% de la inhibición mientras que en el procesado la fracción libre contribuyó con el 65% de la inhibición de la enzima α -amilasa. En el presente estudio se observó que el bioprocesamiento de granos de frijol común crudo a lo largo de la fermentación aumentó ($p < 0.05$) el índice de inhibición de α -amilasa libre, ligados y totales en un 90%, 33%, y 64% respectivamente (Cuadro 15).

Las harinas de frijol común cruda y optimizada presentaron valores de inhibición de α -glucosidasa de 7.31 y 10.6, respectivamente. Se observó que el bioprocesamiento de granos de frijol común crudo a lo largo de la fermentación aumentó ($p < 0.05$) el índice de inhibición de α -glucosidasa libre, ligados y totales en un 38%, 53%, y 45% respectivamente (Cuadro 15).

En el Cuadro 15 también se presentan los valores de indicadores de potencial hipoglucémico de frijol crudo como resultados de inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa en porcentaje de inhibición y como equivalentes de Acarbosa (un medicamento no natural empleado comúnmente para la inhibición de las enzimas de digestión de carbohidratos). Se puede observar que el bioproceso de FES incrementó ($p < 0.05$) los valores de % de inhibición de α -amilasa (%IAA: +2.5%) y % de inhibición de α -glucosidasa (%IAG: +12.4%). También se observa que el bioproceso de FES mejoró significativamente ($p < 0.05$) los equivalentes de Acarbosa de α -amilasa (EAAA: +15.5%) y de α -glucosidasa (EAAG: +58%) de frijol común.

Cuadro 15. Efecto del bioprocesamiento sobre el potencial hipoglucémico de frijol común^{1,2}

Propiedad	HFCC	HFCBO
Potencial hipoglucémico		
Indice inhibición α-amilasa (IIAA)		
Fitoquímicos libres	2.61 ^b	4.95 ^a
Fitoquímicos ligados	2.03 ^b	2.7 ^a
Total	4.64 ^b	7.65 ^a
Indice inhibición α-glucosidasa (IIAG)		
Fitoquímicos libres	3.92 ^b	5.41 ^a
Fitoquímicos ligados	3.39 ^b	5.19 ^a
Total	7.31 ^b	10.60 ^a
IIAA+IIAG	11.94 ^b	18.25 ^a
% Inhibición α-amilasa		
Fitoquímicos libres	65.64 ^b	82.30 ^a
Fitoquímicos ligados	75.30 ^a	62.20 ^b
% inhibición promedio	70.47 ^b	72.25 ^a
% Inhibición α-glucosidasa		
Fitoquímicos libres	73.64 ^b	81.40 ^a
Fitoquímicos ligados	70.42 ^b	80.50 ^a
% inhibición promedio	72.03 ^b	80.95 ^a
Equivalentes Acarbosa (α-amilasa) (EAAA)		
Fitoquímicos libres	28.86 ^b	37.93 ^a
Fitoquímicos ligados	25.22 ^a	24.54 ^a
Total	54.08 ^b	62.47 ^a
Equivalentes Acarbosa (α-glucosidasa) (EAAG)		
Fitoquímicos libres	960 ^b	1,400 ^a
Fitoquímicos ligados	600 ^b	1,070 ^a
Total	1,560 ^b	2,470 ^a
EAAA+EAAG	1,614.08 ^b	2,532.47 ^a

¹ Las medias se separaron por renglones, aplicando la prueba de rango múltiple de Duncan. Medias con la misma letra no son diferentes

² μ g equivalentes de Acarbosa (EA/100g, bs)

Todos los indicadores para inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa (índice de inhibición, porcentaje de inhibición y equivalentes de Acarbosa) evaluados en el presente trabajo muestran el fuerte potencial hipoglucémico de las harinas frijol común variedad Blanco Sinaloa 92, así como, el incremento significativo que sufrió este potencial hipoglucémico durante el bioprocesamiento por FES.

Mojica y col (2015) estudiaron el efecto inhibitorio de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa de los extractos fenólicos de 15 variedades de frijol. Ellos reportaron que los extractos de los frijoles inhibían un 25.8-74.2% la enzima α -amilasa y un 20.7-77.6% la enzima α -glucosidasa, encontrando una correlación entre el contenido de compuestos fenólicos, actividad antioxidante e índice de inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa.

Maiti y Majumdar (2012) reportaron que extractos obtenidos de soya bioprocesada con *R. oligosporus* tenían actividad inhibitoria contra la enzima α -amilasa. Randhir y Shetty (2008) fermentaron frijol mugo con *Rhizopus oligosporus* y evaluaron la actividad inhibitoria de la enzima α -amilasa, ellos reportaron un incremento en la actividad inhibitoria durante los primeros 8 días la cual se correlaciono con el incremento en la concentración de compuestos fenólicos totales. Ellos sugirieron que los compuestos fenoles pudieron unirse al sitio activo de la enzima α -amilasa alterando así su actividad catalítica (McCue y Shetty, 2004).

Tadera y col (2006) evaluaron la actividad inhibitoria de 6 grupos de flavonoides y su efecto inhibitorio de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa, ellos comprobaron

que efectivamente los flavonoides tienen efecto inhibitorio de dichas enzimas. Por otra parte, Pipraro y col (2008) demostraron como los flavonoides podían inhibir la actividad de la enzima α -amilasa, ellos comprobaron la actividad inhibidora de los flavonoides y flavonas depende de los enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo los cuales se unen al sitio activo de la enzima y a la formación de una sistema π conjugado que estabiliza la interacción con el sitio activo.

Estudios clínicos en humanos usando inhibidores de α -amilasa y α -glucosidasa de productos naturales (frijol blanco común, Touchi o Douchi, hoja de morera) han demostrado excelentes efectos antihiper glucémicos sin efectos secundarios (diarrea, náuseas, flatulencia), encontrados comúnmente con el uso de medicamentos inhibidores de α -amilasa y α -glucosidasa disponibles actualmente (Fujita y col 2003; Barrett y Udani 2011). Sin embargo se requieren más estudios para comprobar el efecto hipoglucémico de los extractos de HFCBO.

VIII CONCLUSIONES

- (1) La mejor combinación de variables del bioproceso de fermentación en estado sólido (FES) para producir harina de frijol común bioprocesado optimizada (HFCBO) con potenciales antioxidante e hipoglucémico altos fue: Temperatura de fermentación = 33.5°C / tiempo de fermentación = 108 h
- (2) La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) es una herramienta de gran utilidad para la optimización de bioprocesos, como FES; que involucran diversas condiciones de procesamiento (temperatura de fermentación / tiempo de fermentación) y varias variables de respuesta [Características de calidad en el producto final: Actividad antioxidante (AAox), compuestos fenólicos totales (CFT), índice de inhibición de α -amilasa (IIAA)]
- (3) El bioproceso de FES incrementó ($p < 0.05$) el contenido de proteína (+34%), y fibras dietarias soluble (+230%), insoluble (+11%) y total (+39%) de frijol común crudo
- (4) El bioproceso de FES incrementó ($p < 0.05$) la actividad antioxidante (ORAC: +132%, ABTS: + 158%) y contenido de compuestos fenólicos totales (CFT, +139%) de frijol común crudo
- (5) El bioproceso de FES incrementó ($p < 0.05$) los valores de indicadores de potencial hipoglucémico de frijol crudo: Índice de inhibición de α -amilasa (IIAA: +65%), índice de inhibición de α -glucosidasa (IIAG: +45%), % de inhibición de α -amilasa (%IAA: +2.5%), % de inhibición de α -glucosidasa (%IAG: +12.4%)

- (6) El bioproceso de FES mejoró significativamente ($p < 0.05$) los equivalentes de Acarbosa de α -amilasa (EAAA: +15.5%) y de α -glucosidasa (EAAG: +58%) de frijol común. Ambos son indicadores de potencial hipoglucémico
- (7) La harina de frijol común bioprocesado optimizada (HFCBO) puede utilizarse como fuente de antioxidantes naturales, proteínas y fibra dietaria en la formulación de alimentos / bebidas funcionales. Bioprocesos como la FES mejoran sustancialmente las propiedades antioxidantes de semillas de frijol común y sus productos pueden ser utilizados como ingredientes funcionales o antioxidantes naturales en el desarrollo de nuevos productos alimenticios para consumo humano

IX BIBLIOGRAFIA

- Abu-Salem FM, Abou-Arab EA. 2011. Physico-chemical properties of tempeh produced from chickpea seeds. *Journal of American Sciences* 7: 107-118.
- Adams MW, Coyne DP, David JHC, Graham PH, Francis CA. 1985. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L). En: Summerfield, R. y Roberts, E.H. Collins. Grain Legume crops. Londres, Inglaterra. Pp 433.
- Adom KK, Liu RH. 2002, Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6182-6187.
- Al-Asheh S, Duvnjak Z. 1994. Characteristics of phytase produced by *Aspergillus carbobarius* NRC 401121 in canola meal. *Acta Biotechnol.* 14(3): 223-233.
- AMSDA. 2007. Plan Rector del Sistema Nacional de Frijol Segunda Fase: Diagnóstico Inicial Base de Referencias Estructura Estratégica. Asociación Mexicana de Secretaria de Derechos Agropecuarios A. C. pp 65-98
- Amadou I, Young-Hui S, Sun J, Gou-Wei L. 2009. Fermented soybean Products: some methods, antioxidants compound extraction and their scavenging activity. *Asian Journal of Biochemistry* 4: 68-76.
- Anderson RA, Conway HF, Pfeifer VF, Griffin E. 1969. Gelatinization of corn grits by roll extrusion cooking. *Cereal Science Today* 14:4-7,11-12
- Angulo-Bejarano PI, Verdugo-Montoya NM, Cuevas-Rodríguez EO, Millán-Carillo J, Mora-Escobedo R, López-Valenzuela JA, Garzón-Tiznado JA, Reyes-Moreno C. 2008. Tempeh flour from chickpea (*Cicer arietium* L). Nutritional and physicochemical properties. *Food Chemistry* 106: 105-112.
- Aparicio-Fernández X, García-Gasca T, Yousef GG, Lila MA, González de Mejia E, Loarca-Piña. 2006. Chemopreventive activity of polyphenolics from black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L) on HeLa and HaCaT cell. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 2116-2122.
- AOAC. 1999. Oficial Methods of Analysis 16° Ed. Association of Official Analytical Chemist. Washinton, DC, EUA.

- AOAC. 2000. *Official Methods of Analysis* 16^o Ed. Harla, Association of Official Analytical Chemist. St. Paul, EUA.
- Aparicio-Fernández X, Manzo-Bonilla L, Loarca-Piña GF. 2005. Comparison of antimutagenic activity of phenolic compounds in newly harvested and stored common beans *Phaseolus vulgaris* against aflatoxin B1. *Journal of Food Science* 70:S73-S78.
- Arcot J, Wong S, Shrestha AK. 2002. Comparison of folate losses in soybean during the preparation of tempeh and soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82:1365-1368.
- Astuti. 2000. A review. Tempeh, a nutritious and healthy food Indonesia. *Asia Pacific Journal Clinical Nutrition* 9:322-325.
- Azeke MA, Fretzdorff B, Buening-Pfaue H, Holzapfel W, Betsche T. 2005. Nutritional value of African yambean (*Sphenostylis stenocarpa* L): Improvement by lactic acid fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:963-970.
- Azeke MA, Fretzdorff B, Buening-Pfaue H, Betsche, T. 2007. Nutritional value of African yambean (*Sphenostylis stenocarpa* L): Improvement by solid substrate fermentation using the tempeh fungus *Rhizopus oligosporus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:297-304.
- Barclay AW, Petocz P, McMillan-Price J, Flood VM, Prvan T, Mitchell P, Brand-Miller, JC. 2008. Glycemic index, glycemic load, and chronic disease risk—a meta-analysis of observational studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* 87: 627-637.
- Barrett ML, Udani JK. 2011. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): A review of clinical studies on weight loss and glycemic control. *Nutrition Journal* 10:24.
- Bros J A, Pedragós AC. 2007. Antidiabéticos orales: opciones y prioridades terapéuticas. *Jano: Medicina y Humanidades*, (1656), 37-40.
- Beninger CW, Hosfield GL. 2003. Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color geonotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7879-7883

- Brand-Miller J, McMillan-Price J, Steinbeck K, Caterson I. 2009. Dietary glycemic index: health implications. *Journal of the American College of Nutrition* 28:446S-449S.
- Bressani R, Blanco A. 1991. Biodisponibilidad de aminoácidos en el frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá* 41:39-51.
- Bhanja T, Kumari A, Banerjee R. 2009. Enrichment of phenolics and free radical scavenging property of wheat koji prepared with two filamentous fungi. *Bioresource Technology* 100:2861–6.
- Bourdichon G, Casaregola S, Farrokh C, Frisvad JC, Gerds ML, Hammes WP, Harnett J, Huys G, Laulunds, Ouwehand A, Powell IB, Prajapati JB, Seto Y, Schure ET. 2012. Review: Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology* 154: 87-97.
- Campos-Vega R, Guevara-Gonzalez R G, Guevara-Olvera BL, Oomah B D, Loarca-Piña G. 2010. Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) polysaccharides modulate gene expression in human colon cancer cells (HT-29). *Food Research International* 43:1057-1064.
- Cárabez-Trejo A, Paredes-López O. 1989. Microestructure of cotyledon cells from hard-to-cook common beans. *Starch/Starke* 41:335.
- Cardador-Martínez A, Castaño TE, Loarca PG. 2002. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds present in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B1. *Food Additives and Contaminants* 19: 62-69.
- Carai MAM, Fantini N, Loi B, Colombo G, Riva A, Morazzoni P. 2009. Potential efficacy of preparations derived from *Phaseolus vulgaris* in the control of appetite, energy intake, and carbohydrate metabolism. *Targeted Therapy* 2:149–153
- Chaiyasut C, Kumar T, Tipduangta P, Rungseevijitprapa W. 2010. Isoflavone content and antioxidant activity of Thai fermented soybean and its capsule formulation. *African Journal of Biotechnology* 9:4120-4126.
- Champ M. 2002. Grain legumes and health. A workshop in 2001. *Grain Legumes* 35:13-14

- Chang CT, Hsu CK, Chou ST, Chen YC, Huang FS, Chung YC. 2009. Effect of fermentation time on the antioxidant activities of tempeh prepared from fermented soybean using *Rhizopus oligosporus*. *International Journal of Food Science and Technology* 44:799-806.
- Chávez-Santoscoy RA, Gutiérrez-Urbe JA, Serna-Saldívar SO. 2013. Effect of flavonoids and saponins extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats as cholesterol micelle disruptors. *Plant Foods for Human Nutrition* 68:416-423.
- Cheng KC, Wu JY, Lin JT, Liu WH. 2013. Enhancements of isoflavone aglycones, total phenolic content, and antioxidant activity of black soybean by solid-state fermentation with *Rhizopus* sp, *European Food Research and Technology* 236:1107–1113
- Cheplick S, Kwon YI, Bhowmik P, Shetty K. 2010. Phenolic-linked variation in strawberry cultivars for potential dietary management of hyperglycemia and related complications of hypertension. *Bioresource Technology* 101:404–413.
- Chiou RY, Chen SL. 2001. Isoflavone transformation during soybean Koji preparation and subsequent Miso fermentation supplemented with ethanol and NaCl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:3656-3660.
- Chung YC, Chang CT, Chao WW, Lin CF, Chou ST. 2002. Antioxidative activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:2454-2458.
- Córdova-Villalobos JA, Barriguete-Meléndez JA, Lara-Esqueda, Rosas-Peralta M, Hernández-Ávila M, León-May M, Aguilar-Salinas C. 2008. Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: Sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud pública de México* 50:419-427
- Correia RT, McCue P, Vatterm DA, Magalhaes M, Macedo GR, Shetty K. 2004. Amylase and *Helicobacter pylori* inhibition by phenolic extracts of pineapple wastes bioprocessed by *Rhizopus oligosporus*. *Journal of Food Biochemistry* 28: 419-434.

- Cubero JI. 1987. Morphology of Chickpea. En: "The Chickpea", Saxena MC y Shing KB (eds). Wallingford, Oxon, Reino Unido pp35-77
- Cuevas-Rodríguez EO, Milán-Carillo J, Mora-Escobedo R, Cárdenas-Valenzuela OG, Reyes-Moreno C. 2004. Quality protein maize (*Zea mays* L) tempeh flour through solid state fermentation process. *Food Science and Technology* 37:59-67.
- Da Ros R, Assaloni R, Ceriello A. 2005. Postprandial hyperglycemia and diabetic complications. *Recenti Progressi in Medicina* 96:436-444.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329:23-38.
- de Almeida Costa GE, da Silva Queiroz-Monici K, Reis SMPM, de Oliveira AC. 2006. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chemistry* 94:327-330.
- De la Vara SR, Domínguez DJ. 2002. Métodos de superficie de respuesta: Un estudio comparativo. *Revista de Matemáticas: Teoría y Aplicaciones* 1: 47-65.
- De León LF, Bressani R, Elias LG. 1989. Efecto de la cáscara sobre el mecanismo de endurecimiento del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 39:405-441
- Delgado-Vargas F, Jiménez AR, Paredes-López O. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40:173-289.
- Design Expert. 2005. Version 7.0.0. Stat-Ease, Design Expert Inc., Minneapolis, MN, EUA
- Díaz AM, Caldas GV, Blair MW. 2010. Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. *Food Research International* 43:595–601
- Dinesh P, Bhakayaraj R, Vidhyalakshmi R. 2009. A low cost nutritious food 'tempeh' – A review. *Journal of Dairy and Food Sciences* 4:22-27.

- Dordevic TM, Siler-Marinčević SS, Dimitrijević-Branković SI. 2010. Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chemistry* 119:957-963.
- Dueñas M, Hernández T, Lamparski G, Estrella I, Muñoz R. 2012. Bioactive phenolic compounds of soybean (*Glycine max* cv. Merit): modifications by different microbiological fermentations. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 62:241-250.
- Eklund-Jonsson C, Sandberg AS, Alminger M, 2006. Reduction of phytate content while preserving mineral content during whole grain cereal tempe fermentation. *Journal of Cereal Science* 44: 154-160
- Egountley M, Aworh OC. 2003. Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms). *Journal of Food Engineering* 56:249-254.
- Elejalde J. 2001. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna* 18:326-335.
- Esaki H, Onozaki H, Kawakishi S, Osawa T. 1996. New antioxidant Isolated from tempeh. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:648-656.
- FAOSTAT. 2012. Food Agriculture Organization. Database FAOSTAT. Disponible en: <http://faostat.fao.org>. Fecha de consulta: marzo de 2012.
- FAO/WHO. 1991. Protein Quality Evaluation. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Roma, Italy, pp 66.
- Fennema OR. 2001. Química de los Alimentos (2nd Ed). Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp-----
- Feng XM, Passoth V, Eklund-Jonsson C, Alminger ML, Schnürer J. 2007. *Rhizopus oligosporus* and yeast co-cultivation during barley tempeh fermentation - Nutritional impact and real-time PCR quantification of fungal growth dynamics. *Food Microbiology* 24:393-402.

- Franke AA, Custer LR, Cern CM, Narala KK. 1994. Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42:1905-1913.
- Friedman. 1996. A review. Nutritional value of proteins from different food sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 5-29.
- Fung CDY, Crozier-Dodson A 2008. Tempeh: A Mold Modified Indigenous Fermented Food. En: "Handbook of Fermented Functional Foods". Farnworth ER (ed), 2da ed, Boca Ratón, FL, EUA. pp 476-401.
- Fujita H, Yamagami T y Ohshima K. 2003. Long-term ingestion of touchi-extract, α -glucosidase inhibitor, by borderline and mild type-2 diabetic subjects is safe and significantly reduces blood glucose levels. *Nutrition Research* 23:713-722.
- Gibbs BF, Zougman A, Masse R, Mulligan C. 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research International* 37:123-31.
- Godbout A, Chiasson JL. 2007. Who should benefit from the use of alpha-glucosidase inhibitors?. *Current Diabetes Reports* 7:333-339.
- Golam MA, Khandaker L, BertholdJ, Gates L, Petes K, Delong H, Hossain K, 2011. Anthocyanin, total polyphenols and antioxidant activity of common bean. *American Journal of Food Technology* 6:385-394
- Goldstein IJ, Hungnes RC, Mondingny M, Osawa T, Sharon N. 1980. What should be called a lectin. *Nature* 285:66.
- Goldschmidt D, Gordovwer L, Berthe JV, Decaestecker C, Petein M, Salmon I, Kiss R, Danguy A. 1997. Contribution of qualitative lectin histochemistry to characterizing well-differentiated, dedifferentiated and poorly differentiated liposarcomas. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 19:215-226.
- Guajardo-Flores D, García-Patiño M, Serna-Guerrero D, Gutiérrez-Urbe JA, Serna-Saldívar SO. 2012. Characterization and quantification of saponins and flavonoids in sprouts, seed coats and cotyledons of germinated black beans. *Food Chemistry* 134:1312–1319
- Guzman-Maldonado S, Paredes-Lopez, O. 1998. Functional Products of Plant Indigenous to Latin America. Amaranth and Quinoa, Common Beans and

- Botanicals. En: Functional Foods. Biochemical and Processing Aspects. Mazza, G. (ed.) Technomic Publishing Company. Pennsylvania, EUA, pp 293-298
- Guzmán-Uriarte ML, Sánchez-Magaña LM, Angulo-Meza GY, Cuevas-Rodríguez EO, Gutiérrez-Dorado R, Mora-Rochín S, Millán-Carillo J, Valdez-Ortiz A, Reyes-Moreno C. 2013. Solid state bioconversion for producing common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) functional flour with high antioxidant activity and antihypertensive potential. *Food and Nutrition Sciences* 4: 480-490.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. Oxford University Press, New York, NY, EUA
- Han BZ, Ma Y, Rombouts FM, Nout MR. 2003. Effects of temperature and relative humidity on growth and enzyme production by *Actinomucor elegans* and *Rhizopus oligosporus* during sufu pehtze preparation. *Food Chemistry* 81: 27-34.
- Hangen L, Bennink M .2002. Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats. *Nutrition and Cancer* 44:60-65.
- Hasjim J, Jane JL. 2009. Production of resistant starch by extrusión cooking of acid-modified normal-maize starch. *Journal of Food Science* 74:C556-C562.
- Hasler CM. 2002. Funtional foods: Benefits, concerns and challenges a position paper from the American Council on Science and Health. *Journal of Nutrition* 132:3772-3781.
- Heimlier D, Vignolini P, Dini MG Romani A. 2005. Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L dry beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 3053-3056.
- Hendrich S. 2010. Battling obesity witj resistant starch. *Food Technology* 64: 22-30
- Hernández-Álvarez AJ, Carrasco-Castilla J, Dávila-Ortiz G, Alaiz M, Girón-Calle J, VioquePeña J, Jiménez-Martínez C. 2013. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory activity in protein hydrolysates from normal and anthracnose disease-damaged *Phaseolus vulgaris* seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93:961-966.

- Herrera-Hernández MG, Acosta-Gallegos JA, Salinas-Pérez RA, Bernardo-Casa AM Guzmán-Mldonado SH. 2014. Compuestos relacionados con la salud en semillas de frijol de plantas crecidas bajo riego y estres hídrico terminal. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5:87-99.
- Hutkins RW. 2006. Microbiology and Technology of Fermented Foods, IFT Press - Blackwell Publishing. Ames, Iowa, EUA, pp: 436-443.
- Jahani M, Alizadeh M, Pirozifard M, Qudsevali A. 2008. Optimization of enzymatic degumming process for RBO using response surface methodology. *Food Science and Technology* 41:1892-1898
- Jiang B, Obiro WC, Zhang T. 2008. The nutraceutical role of the *Phaseolus vulgaris* alpha-amylase inhibitor. *British Journal of Nutrition* 100:1-12.
- Jordinson M, El-Hariry I, Calnan D, Calam J, Pignatelli M. 1999. *Vicia faba* agglutinin, the lectin present in broad beans, stimulates differentiation of undifferentiated colon cancer cell. *Gut* 44:709-714.
- Josko O. 2012. Oxidative Stress. *Slovenian Medical Journal* 81:393 – 406.
- Juan MY, Chou CC. 2010. Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715. *Food Microbiology* 27:586-591.
- Kahkonen MP, Hopia AL, Vuorela HJ. 1999. Antioxidant activity of plants extract containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 3954-3962.
- Keuth S, Bisping B. 1993. Formation of vitamins by pure culture of tempe molds and bacteria during the tempeh solid substrate fermentation. *Journal of Applied Bacteriology* 75:427–434.
- Keuth S, Bisping B. 1994. Vitamin B-12 production by *Citrobacter freundii* or *Klebsiella pneumoniae* during tempeh fermentation and proof on enterotoxin absence by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 60:1495–1499.
- Khuri AA, Cornell JA, 1987. Response Surfaces: Designs and Analyses, Marcel Dekker Inc., New York, NY, EUA, pp 1-17.

- Kiers L, Jeroen, Nout JMR, Rombouts MF. 2000. *In vitro* digestibility of processed and fermented soya bean, cowpea and maize. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:1325-1331.
- Knuckles BE, Kuzmicky DD, Betschart AA. 1985. Effect of phytate and partially hydrolyzed phytate on *Kin vitro* protein digestibility. *Journal of Food Science*. 50:1080.
- Ko SJ. 1985. Growth and toxin production of *Pseudomonas cocovenenans*, the so-called "bangkrek bacteria". *Asian Food Journal* 1:78-84.
- Kutos T, Golob T, Kač M, Plestenjak A. 2003. Dietary fibre content of dry and processed beans. *Food Chemistry* 80:231-235.
- Larone DH. 1995. Medically important fungi- A guide to identification 3rd edition ASM Press. Washington DC, EUA
- Lee I, Hung Y, Chou C. 2008. Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean. *International Journal of Food Microbiology* 12:150-156.
- Leptospira Laboratory. 1997. The McFarland Nephelometric method to estimate numbers of bacteria. University of Belgrade and Royal Tropical Institute, Amsterdam. <http://WWW.vet.bg.ac.yu/lepto/lab/mcfarland.html>.
- Li YQ, Zhou FC, Gao F, Bian JS, Shan F. 2009. Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of α -glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:11463-11468.
- Lim TK. 2012. *Phaseolus vulgaris*. En: "Edible Medicinal and Non-medicinal Plants" Vol. 2. Lim TK (ed). 1st ed. Springer. Netherlands, pp. 815 - 848.
- Lin CH, Wei YT, Chou CC. 2006. Enhanced antioxidative activity of soybean koji prepared with various filamentous fungi. *Food Microbiology* 23:628-633.
- Liu RH. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition* 134:3479S-3485S.
- López-Angulo G, Montes-Avila J, Díaz-Camacho SP, Vega-Aviña R, Ahumada-Santos YP, Delgado-Vargas F. 2014. Chemical composition and antioxidant, α -glucosidase inhibitory and antibacterial activities of three *Echeveria* DC. species

from Mexico. *Arabian Journal of Chemistry*

<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.11.050>

- Luka CD, Olatunede A, Tijjani H, Olisa-Enewe IA. 2013. Effect of aqueous extract of *Phaseolus vulgaris* L (red kidney bean) on Alloxan-induced diabetic wistar rats. *International Journal of Science Investigation Today* 2:292-301.
- Lyimo M. 2000. Evaluation of the nutritional and acceptability sorghum based tempeh as potential weaning food in Tanzania. *International Journal of Food sciences and Nutrition* 26:595-606.
- Lyu S, Choi SH, Park WB. 2002. Korean mistletoe Lectin-induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase via mitochondrial control pathway independent of p-53. *Archives of Pharmacal Research* 25:93-101.
- Maga JA. 1982. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30:1-9.
- Mahmood N. 2014. A review of α -amylase inhibitors on weight loss and glycemic control in pathological state such as obesity and diabetes. *Comparative Clinical Pathology* 1-12.
- Maiti D y Majumdar M. 2012. Impact of bioprocessing on phenolic content and antioxidant activity of two edible seeds to improve hypoglycemic functionality. *Journal of Natural Pharmaceuticals* 3:31-36.
- Maritim AC, Sanders RA, Watkins J. 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 17:24-38.
- Martins ES, Silva D, Da Silva R, Gomes E. 2002. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochemistry* 37:949-54.
- McCue P, Horli A, Shetty K. 2003. Solid-state bioconversion of phenolic antioxidants from defatted soybean powder by *Rhizopus oligosporus*: Role of carbohydrate cleaving enzymes. *Journal of Food Biochemistry* 27:501-514.

- McCue P, & Shetty K. 2004. Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase in vitro. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 13:101–106.
- McCue P, Kwon YI, Shetty K. 2005. Anti-diabetic and anti-hypertensive potential of sprouted and solid-state bioprocessed soybean. *Asia pacific Journal of clinical nutrition* 14: 145-152.
- Medina-Godoy S, Ambriz-Pérez DL, Fuentes-Gutiérrez CI, Germán-Báez LJ, Gutiérrez-Dorado R, Reyes-Moreno C, Valdez-Ortiz A. 2012. Angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidative activities and functional characterization of protein hydrolysates of hard-to-cook chickpeas. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 1974-1981.
- Meisel H, Walsh DJ, Murray B, FitzGerald RJ. 2006. Inhibitory peptides En: Nutraceuical protein and peptides in the health and disease. Mine Y and Shahidi F. (Eds). *CRC press Taylos and Francis Group*. Pp. 269-315.
- Messina MJ. 1999. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *The American journal of clinical nutrition* 70: 439s-450s.
- Miszkievicz H, Bizukojc M, Rozwandowicz A, Bielecki S. 2003. Physiological properties and enzymatic activities of *Rhizopus oligosporus* in solid state fermentations. *Communications in agricultural and applied biological sciences* 68:313-316.
- Mohamed A, Biresaw G, Xu J, Hojilla-Evangelista MP y Rayas-Duarte P. 2008. Oats protein isolate: thermal, rheological, surface and functional properties. *Food Research International* 42: 107-114.
- Mojica L, Meyer A, Berhow M, de Mejia E. 2015. Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, in vitro inhibition of alpha-amylase and alpha-glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. *Food Research International* 69:38-48.
- Mora A, Aragón DM, Ospina G. 2009. Oxidative stress characterization in streptozotocin-diabetic wistar rats. *Vitae*16:311-319.

- Mora-Escobedo R, Paredes-López O, Gutiérrez-López GF, 1994. Effect of germination on the rheological and functional properties of amaranth seeds, *Lebensmittel-Wissenschaft+ Technologie* 24:241-246.
- Mora-Rochin S, Gutiérrez-Urbe JA, Serna-Saldívar SO, Sanchez-Peña P, Reyes-Moreno C, Milán-Carillo J. 2010. Phenolic content and antioxidant activity tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusión cooking. *Journal of Cereal Science* 52: 502-508.
- Mugula K. 1992. Evaluation of the nutritive value of maize-soybean tempe as a potential food in Tanzania. *International journal of food sciences and nutrition* 43:113-119.
- Mujica MV, Marisela-Granito M, Soto N. 2009. Importance of the extraction method in the quantification of total phenolic compounds in *Phaseolus vulgaris* L. *Interciencia* 34: 650-654.
- Myatt L. 2010. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta* 31:S66-S69.
- Myers RH, 1971. Response Surfaces Methodology, *Allyn & Bacon, Boston MA*, EUA, pp 26-106.
- Myers R.H, Montgomery DC. 2002. Response Surface Methodology: Product and Process Optimization Using Designed Experiments, 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York, NY, EUA pp
- Nacz M, Shahidi F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 41: 1523-1542.
- Najafian M, Ebrahim-Habibi A, Yaghmaei, P, Parivar K Larijani B. 2010. Core structure of flavonoids precursor as an antihyperglycemic and antihyperlipidemic agent: an in vivo study in rats. *Acta Biochimica Polonica* 57: 553.
- Nigam PS, Pandey A. 2009. Solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues. *In Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation* (pp. 197-221). Springer Netherlands.

- Notkins AL. 2002. Immunologic and Genetic Factors in Type 1 Diabetes. *Journal of Biological Chemistry* 277:43545–43548.
- Nout MJR, Kiers JL. 2005. Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millennium. *Journal of Applied Microbiology* 98:789–805.
- Nowak J, Szebiotko K. 1992. Some biochemical changes during soybean and pea tempeh fermentation. *Food Microbiology* 9:37-43.
- Obiro WC, Zhang T, Jiang B. 2008. The nutraceutical role of the *Phaseolus vulgaris* alpha-amylase inhibitor. *British journal of nutrition* 100:1–12
- Oboh G, Ademiluyi AO and Akindahunsi AA. 2009. Changes in polyphenolic distribution and antioxidant activity during fermentation of some underutilized legumes. *Food Science and Technology International* 15:41-46.
- Oboh G, Akindahunsi AA. 2003. Biochemical changes in Cassava products (flour & gari) subjected to *Saccharomyces cerevisiae* solid media fermentation. *Food Chemistry* 82: 599-602.
- Oboh G, Oladunmoye MK. 2007. Biochemical changes in micro-fungi fermented cassava flour produced from low-and medium-cyanide variety of cassava tubers. *Nutrition and health* 18: 355-367.
- Obsorn TC. 1988. Genetic control of bean seed protein. *Critical reviews in plant sciences* 7:93-116.
- Ocho-Anin Atchibri AL, Brou KD, Kouakou TH, Kouadio YJ, Gnakri D. 2010. Screening for antidiabetic activity and phytochemical constituents of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *Journal of Medical Plants Research* 4:1757–1761
- Olanipekun BF, Otunola ET, Adedokun OE, Oyelade OJ. 2009. Effect of fermentation with *Rhizopus oligosporus* on some physico-chemical properties of starch extracts from soybean flour. *Food and chemical toxicology* 47: 1401-1405.
- Oliveira MS, Feddern V, Kupski L, Cipolatti EP, Badiale-Furlong E, Souza-Soares LA. 2010. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. *Journal of Food* 8: 229–236.

- Oomah BD, Corbé A, Balasubramanian P. 2010. Antioxidant and anti-inflammatory activities of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hulls. *Journal of agricultural and food chemistry* 58: 8225-8230.
- Organización mundial de la salud. 1990. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. 81-82.
- Ou B, Hampsch-Woodill, Prio RI. 2001. development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of agricultural and food Chemistry* 49: 4619-4626.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews* 87: 315-424.
- Pandey A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 81-84.
- Paredes-López O, González-Castañeda J, Cárabez-Trejo A. 1991. Influence of solid substrate fermentation on the chemical composition of chickpea. *Journal of fermentation and bioengineering* 71: 58-62.
- Paredes-López O, Guevara-Lara F y Bello-Pérez LA. 2006. Los alimentos mágicos de las culturas mesoamericanas. La ciencia para todos 212. *Fondo de Cultura Económica*. Pp 59-80.
- Pérez-Guerra N, Torrado-Agrasar A, López-Marias C, Pastrana L. 2003. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 2:343–50.
- Pfoertner HN, FiScher J. 2001. Dietary fiber of lupins and other grains legumes. *Advances Dietary Fibre Technology*. Black well Science Ltd, Oxford.
- Preuss HG. 2009. Bean amylase inhibitor and other carbohydrate absorption blockers: effects on diabetes and general health. *Journal of the American College of Nutrition* 28: 266-276.
- Prior R, Cao G. 2000. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables. Diet and health implications. *Horticulture Science* 35: 588-592.
- Prior R, Gu L. 2005. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American Diet. *Phytochemistry* 66:2264-2280.

- Queiroz-Monici K, Costa GE, da Silva N, Reis SM, de Oliveira AC. 2005. Bifidogenic effect of dietary fiber and resistant starch from leguminous on the intestinal microbiota of rats. *Nutrition* 21:602–609
- Raimbault M. 1988. General and microbiological aspects of solid substrates fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology* 1: 26-27.
- Randhir R, Vatterm D y Shetty K. 2004. Solid-state bioconversion of faba bean by *Rhizopus oligosporus* for enrichment of phenolic antioxidants and L-DOPA. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 5:235-244.
- Randhir R, Shetty K. 2007. Mung beans processed by solid-state bioconversion improves phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management. *Innovative food science & emerging technologies* 8: 197-204.
- Ranilla LG, Kwon YI, Apostolidis E, Shetty K. 2010. Phenolic compounds, antioxidant activity and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology* 101:4676-4689.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M y Rice-Evams C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26: 1231-1237.
- Reddy NR, Pierson MD, Sathes SK y Salunkhe DK. 1984. Dry beans tannins: A review of nutritional implications. *Journal of the American Oil Chemists Society* 62:541-549.
- Reddy NR Y Pierson MD. 1994. Reduction in antinutritional and toxic complements in plant foods by fermentation. *Food Research International* 27:281-290.
- Reyes-Bastidas M. 2008. Capacidad antioxidante de tempes de garbanzo (*Cicer arietium* L) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L) (Tesis de maestría) Facultad de Ciencias Químico Biológica. Culiacán, Sinaloa. P 60-64, 91, 98, 101.
- Reyes-Bastidas M. Reyes-Fernández EZ, López-Cervantes J, Milán-Carrillo J, Loarca-Piña GF, Reyes-Moreno C. 2010. Physicochemical, nutritional and antioxidant properties of tempeh flour from common bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Food Science and Technology International* 16:427-434.

- Reyes-Moreno C, Paredes-López O. 1993. Hard-to-cook phenomenon in common beans—A review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 33: 227-286.
- Reyes-Moreno C, Romero-Urias C, Milám-Carrillo J, Valdéz-Torres B y Zárates-Márques E. 2000. Optimization of the solid state fermentation process to obtain tempeh from hardened chickpeas (*Cicer arietum* L). *Plant Foods for Human Nutrition* 55: 219-228.
- Reyes-Moreno C, Romero-Urias C, Milám-Carrillo J, Cárdenas-Valenzuela OG, Barrón-Hoyos J. 2004. Solid state fermentation process for producing chickpea (*Cicer arietinum* L) tempeh flour. Physicochemical and nutritional characteristics of the product. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84:271-278.
- Reynoso-Camacho R, González-Jasso E, Salgado LM. 2007. La alimentación del mexicano y la incidencia de diabetes tipo 2. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 10:36-38.
- Richter C, Park JW, Ames BN. 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85:6465-6467.
- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science* 2: 152-159.
- Rocha-Guzmán NE, Herzog A, González-Laredo RF, Ibarra-Pérez FJ, Zambrano-Galván G, Gallegos-Infante JA. 2007. Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). *Food chemistry* 103: 521-527.
- Rosak C y Mertes G. 2009. Effects of acarbose on proinsulin and insulin secretion and their potential significance for the intermediary metabolism and cardiovascular system. *Current diabetes reviews* 5:157-164.
- Roberts J, Schmid FA y Rosenfeld HJ. 1979. Biologic and antineoplastic effects of enzymes-mediated in vivo depletion of L-glutamine, L-tryptophan and L-histidine. *Cancer treatment reports* 63:1045-1054.

- Rodríguez-García MV. 2014. Extracción y purificación del inhibidor de α -amilasa de diferentes variedades mejoradas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y su efecto in vivo (*Doctoral dissertation*).
- den Hil PJ. 2010. Bioactive components of fermented soya beans effective against diarrhoea-associated bacteria. publisher not identified.
- Ruíz-Terán F, Owens JD. 1996. Chemical and enzyme changes during the fermentation of bacteria-free soybean tempeh. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71:523-530.
- Salunkhe DK, Kadam SS. 1989. Introduction, En: CRC Press, Inc., Boca Raton. Handbook of world legumes: Nutritional Chemistry, *Preprocessing Technology and Utilization* Vol I. Florida, EUA. Pp1-22.
- Sangronis E, Ibarz A, Barboza G, Swanson B. 2002. Efecto de la alta presión hidrostática (APH) en la imbibición de agua y los tiempos de cocción de *Phaseolus vulgaris*. *Archivos latinoamericanos de Nutrición* 52:301-306.
- Salar RK, Certik M y Brezova V. 2012. Modulation of phenolic content and antioxidante activity of maize by solid state fermentation with *Thamnidium elagans* CCF 1456. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 17:109-116.
- Sathe SK, Deshpande SS y Salunkhe DK. 1985. Dry beans of phaseolus. A review. Part 2. Chemical composition: Carbohydrates, fiber, minerals, vitamins, and lipids. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 21: 41-93.
- Saura-Calixto F, Serrano J, Goñi I. 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry* 101: 492-501.
- Schmidt CG, Gonçalves LM, Prietto L, Hackbart HS, Furlong EB. 2014. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*. *Food chemistry* 146: 371-377.
- Serrano J, Goñi I. 2004. Papel del frijol (*Phaseolus vulgaris*) en el estado nutricional de la población guatemalteca. *Archivos Latinoamericanos Nutrición* 54:36-46.
- Shi J, Arunasalam K, Yeung D, Kakuda Y, Mittal G, Jiang Y. 2004. Saponins from edible legumes: chemistry, processing, and health benefits. *Journal of Medicinal Food* 7: 67-78.

- Shi J, Mazza G, Le Maguer M. 2002. Functional foods: Biochemical and processing aspects. *CRC Press Boca Raton FL*. 2:409.
- Shurtleff W y Aoyagi A. 2001. The book of tempeh: Ten Speed Press. Berkeley, CA, UAS. 580 p. SIAP: 2009. Monografía drijol. Dirección general Junta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial. *Financiera Rural*.
- Shutler SM, Bircher GM, Tredger JA, Morgan LM, Walker AF, Low AG. 1989. The effect of daily baked bean (*Phaseolus vulgaris*) consumption on the plasma lipid levels of young, normo-cholesterolaemic men. *British Journal of Nutrition* 61: 257-265.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology* 299:152-178.
- Sparriga RA, Owens JD. 1999. Protein utilization during soybean tempeh fermentation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47: 4375-4378.
- St-germain G, Summerbell R. 1996. Identifying filamentous Fungi. *Clinical Laboratory Handbook*, 1st Ed. *Star publishing Company*, Belmont, California, EUA.
- Starzyńska-Janiszewska A, Stodolak B, & Mickowska B. 2014. Effect of controlled lactic acid fermentation on selected bioactive and nutritional parameters of tempeh obtained from unhulled common bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94: 359-366.
- Steinkraus KH, Van Buren JP, Hackler LR Hand DB. 1965, A pilot-plant process for the production of dehydrated tempeh. *Food Technology* 1:68.
- Steinkraus KH. 1983. Indonesian tempeh and related fermentation. En: *Steinkraus KH*. Handbook of ingenious fermented foods, vol 9. New York, EUA. Pp 1-94.
- Steinkraus KH. 1994. Nutritional significance of fermented foods. *Food Research International* 27:259-267.
- Steinkraus KH. 2002. Fermentations in world food processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 1:23-32.
- Stillings BR, Hackñer IR. 2007. Amino acid studies on the effect of fermentation time and heat-processing of tempeh. *Journal of Food Science* 30: 1043-1048.

- Sun SM, Hall TC. 1975. Solubility characteristic of globulins from *Phaseolus vulgaris* in regard to their isolation and characterization. *Journal of agricultural and food chemistry* 23:184-189.
- Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Matsuoka T. 2006. Inhibition of. ALPHA.-Glucosidase and. ALPHA.-Amylase by Flavonoids. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 52:149-153.
- Tapiero H, Mathe G, Couvreur P, Tew KD. 2002 Free amino acids in human health and pathologies. II. Glutamine and glutamate. *The Journal of nutrition* 56:446-457
- Taylor JC. 2012. The functionality of tempeh addition to beef patties (Doctoral dissertation, University of Otago).
- Torruco-Uco J, Chel-Guerrero L, Martínez-Ayala A, Dávila-Ortíz G, Betancur-Ancona D. 2009. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. *LWT-Food Science and Technology* 42:1597-1604.
- Tormo MA, Gil-Exojo I, Romero de Tejada A, Campillo JE. 2004. Hypoglycaemic and anorexigenic activities of an α -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) in Wistar rats. *British journal of nutrition* 92:785-90.
- Tovar J, Melito C. 1996. Steam-cooking and dry heating produce resistant starch in legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 2642-2645.
- Ugrozov VV, Shebershneva NN, Filippiv AN y Sidorenko YI. 2008. Sorption and desorption of water vapor by grains of native starch of some crops. *Colloid Journal* 70: 366-371.
- Usmani NF y Noorani R. 1986. Studies on soybean tempeh. I. Optimization of factors affecting fermentation in commercial production of tempe with respect to pilot plant studies. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research* 1986a, 29:145-147.
- Valdez-Ortiz A, Fuentes-Gutiérrez CI, Germán-Báez LJ, Gutiérrez-Dorado R, Medina-Godoy S. 2012. Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative

- characterization. *LWT-Food Science and Technology* 46(1), 91-96. Wang HL, Ruttle I, Doris y Hesseltine WC. 1969.
- Van der Riet WB, Wight AW, Ciliers JJJ y Datel JM. 1987. Food chemical analysis on tempeh preparation of from South African grown soybean. *Food Chemistry* 25:197-206.
- Vattem DA, Shetty K. 2003. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. *Process Biochemistry* 39:367-379.
- Verdugo-Montoya NM. 2006. Propiedades fisicoquímicas y nutricionales de tempe de maíz (*Zea mays* L) de calidad proteínica y garbanzo (*Cicerarietium*). Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Sinaloa. México.
- Wagenknecht AC, Mattick LR, Lewin LM, Hand DB, Steinkraus KH. 1961. Changes in soya lipids during tempeh fermentation. *Food Science* 26:376.
- Wang HL, Ruttle DI, Hesseltine CW. 1968. Protein quality of wheat and soybeans after *Rhizopus oligosporus* fermentation. *The Journal of Nutrition* 96:109-114.
- Wang HL, Swain EW, Hesseltine WC. 1975. Mass production of *Rhizopus oligosporus* spores and their application in tempeh fermentation. *Journal of food science* 40:165-170.
- Wang HL, Swain EW, Hesseltine WC. 1980. Physical of molds used in oriental food fermentation. *Journal of Food Science* 45:1262-1266.
- Wang H, Muphy P. 1994. Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal of agricultural and food chemistry* 42:1666-1673.
- Wang W, Gonzáles de Mejí E. 2005. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Critical Review of Food Science and Food Safety* 4:63-78
- Whitaker JR. 1978. Biochemical changes occurring during fermentation of high protein foods. *Foods Technology* 5:175-180.
- Wiesel I, Rehm JH, Bisping B. 1997. Improvement of tempeh fermentation by application of mixed cultures consisting of *Rhizopus* sp and bacterial strains. *Applied microbiology and biotechnology* 47:218-225.

- Wongsa P, Chaiwarit J, Zamaludien. 2012. In vitro screening of phenolic compounds, potential inhibition against α -amylase and α -glucosidase of culinary herbs in Thailand A. *FOOD CHEMISTRY*, ISSN 0308-8146, Volumen 131, Número 3, pp. 964 – 971
- Xu BJ, Chang SNC. 2007. Comparative studies on the antioxidant activities of nine common foods legumens against copper-induced human low-density lipoprotein oxidation *in vitro*. *Journal of Food Science* 72:167-176.
- Xu BJ, Yuan SH, Chang SKC. 2007. Comparative analyses of phenolic composition antioxidant capacity and color of cool season legumes and other selected food legumes. *Journal of Food Science* 72:S167-S177.
- Yang FC, Yang YH, Lu HC. 2013. Enhanced antioxidant and antitumor activities of *Antrodia cinnamomea* cultured with cereal substrates in solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 78:108-113.
- Yoshiki Y, Kudou S, Okubo K. 1998. Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 62:2291-2299.
- Yoon SH, Robyt JF. 2003. Study of the inhibition of four α amylases by acarbose and its 4 IV- α -maltohexaosyl and 4 IV- α -maltododecaosyl analogues. *Carbohydrate research* 338:1969-1980.
- Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414:782-787.
- Zhao J. 2007. Nutraceuticals, nutritional, therapy, phytonutrients, and phytotherapy for improvement of human health: a perspective on plant biotechnology application. *Recent Patents on Biotechnology* 1:75-97.

ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Grado (s) Celsius
A	Alfa
AAE	Aminoácidos esenciales
AAPH	2-2'-Azobis-aminopropano
Aw	Actividad de agua
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etibenzotiazolina-6-sulfónico)),
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMSDA	Asociación Mexicana de Secretaria de Derechos Agropecuarios
Aox	Actividad antioxidante
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
AR	Almidón resistente
AS	Almidón soluble
AUC	Pérdida de la fluorescencia
B	Beta
Bs	Base seca
C	Carbono
Ca	Calcio
CAAE	Contenido de aminoácidos esenciales
Cm	Centímetro (s)
CO ₂	Dióxido de carbono
C-PER	Relación de eficiencia proteica calculada
CQ	Calificación química
Cu	Cobre
DCF	Diclorofluorescina
DCFH	Diclorofluoresceina
DM	Diabetes Mellitus
DDMP	2,3-dihidro-2,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-

DPPH	2,2 difenil pocril hidrazil
DVPIV	digestibilidad verdadera de proteína <i>in vitro</i>
EAG	Equivalentes de ácido galico
EtOH	Etanol
FAO	Organización para la Alimentación y la Agricultura (del inglés, Food and Agriculture Organization)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FDT	Fibra dietética total
Fe	Hierro
FES	Fermentación en estado solido
FRAP	Poder antioxidante de reducción ferrica (Ferric reducing antioxidant power)
FMOC	9-fluorenilmetil-cloroformato
FT	Temperatura de fermentación
Ft	Tiempo de fermentación
Flav	Flavonoides
Ftot	Fenólicos totales
G	Gramo (s)
GRAS	Generally recognized as safe
GOPOD	Glucosa/oxidasa peroxidasa
H	Hora (s)
Ha	Hectárea
HAA	Ácido 3-hidroxiantranilico
HCl	Ácido clorhídrico
HFCBO	Harina de frijol común bioprocesado optimizado
HPLC	High-performance liquid chromatography
HTA	Hipertensión arterial
IAA	Índice de absorción de agua

IAAE	Índice de aminoácidos esenciales
IFD	Federación Internacional de Diabetes
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
ISA	Índice de solubilidad en agua
K	Potasio
KCl	Cloruro de Potasio
KD	Kilodalton
M	Molaridad
Mg	Miligramo (s)
µg	Microgramo (s)
Min	Minuto (s)
mL	Mililitro (s)
µL	Microlitro (s)
MCP	Maíz de calidad proteínica
Mg	Magnesio
Mm	Milímetro (s)
µM	Micromolar
mM	Milimolar
N	Normal
Ng	Nanogramo (s)
Nm	Nanómetro(s)
NPR	Relación neta de proteína
NaOH	Hidróxido de sodio
NO•	Óxido nítrico
O ₂	Oxígeno molecular
O ₂ •	Anión superóxido
OH•	Ion hidroxilo
ONOO•	Peroxinitrito
ORAC	Capacidad antioxidante de radical oxígeno

P	Fosforo
<i>P</i>	<i>Phaseolus</i>
pH	Potencial hidrogeno
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volumen
Pág.	Página (s)
PER	Relación de eficiencia proteínica
PDCAAS	Digestibilidad proteica corregida por perfil de aminoácidos
PNP	p-nitrofenol- α -D-glucopiranosido
pp.	Página (s)
<i>R</i>	<i>Rhizopus</i>
ROS	Capacidad antioxidante de radical oxigeno
ROO	Radicales peroxilo
RRAAE	Requerimientos recomendado de aminoácidos esenciales
\$	Pesos
S	Segundos
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SVEHDMT 2	Resultados del sistema de vigilancia epidemiológica hospitalaria de diabetes mellitus tipo 2
TBARS	Ácido tiobarbiturico
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilenediamina(delinglés,N,N,N',N'-tetramethylenediamine)
TEAC	Actividad antioxidante equivalente a Trolox
Ton	Tonelada (s)
UV	Ultravioleta
V	Voltaje
v/v	Volumen/volumen
Zn	Zinc