



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

**Bioconversión en Estado Sólido de Garbanzo
(*Cicer arietinum* L) para la Obtención de un
Alimento Funcional con Potenciales Antioxidante
y Antihipertensivo**

T E S I S

que presenta

Brenda Karely Bon Padilla

para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIA

Y

TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Directores de Tesis

Dr Roberto Gutiérrez Dorado

Dr Jorge Milán Carrillo

Culiacán Rosales, Sinaloa, México

Febrero 2016

Este trabajo titulado “**Bioconversión en estado sólido de garbanzo (*Cicer arietinum* L) para la obtención de un alimento funcional con potenciales antioxidante y antihipertensivo**” se desarrolló en el Laboratorio de Bioprocesos y Alimentos Funcionales del Doctorado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Los Doctores Roberto Gutiérrez Dorado, Jorge Milán Carrillo y Cuauhtémoc Reyes Moreno participaron como Asesores Académicos y los primeros dos como Directores de Tesis. El proyecto recibió financiamiento del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación, Universidad Autónoma de Sinaloa (Convocatorias 2013 y 2014). La tesista Brenda Karely Bon Padilla recibió beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán de Rosales, Sinaloa el día 08 del mes febrero del año 2016, el (la) que suscribe I.B.Q. Brenda Karely Bon Padilla alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos con número de cuenta 33132895, 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. Jorge Milán Carrillo y cede los derechos del trabajo titulado "Bioconversión en Estado Sólido de Garbanzo (*Cicer arietinum* L) para la Obtención de un Alimento Funcional con Potenciales Antioxidante y Antihipertensivo", 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.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Brenda", is written over a horizontal line. The signature is stylized and includes a large circular flourish.

I.B.Q. Brenda Karely Bon Padilla

AGRADECIMIENTOS

Al programa de **Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos**, de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la UAS, por permitirme realizar mis estudios de posgrado y contribuir en mi formación académica.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

A los **profesores de la Maestría** por impartir sus conocimientos y experiencias, contribuyendo a mi formación académica.

Al **Dr. Jorge Milán Carrillo** por darme la oportunidad de trabajar bajo su dirección y formar parte de su equipo de trabajo.

Al **Dr. Roberto Gutiérrez Dorado** por recibirme con las puertas abiertas a su laboratorio y otorgarme siempre sus sabios consejos, por dedicarme su tiempo y estar siempre al pendiente de las dudas y necesidades respecto al proyecto, así como por hacer crecer en mí esa inquietud por obtener y crear conocimiento. ¡Muchas gracias!.

Al **Dr. Cuauhtémoc Reyes Moreno** por sus valiosas opiniones otorgadas durante la realización del proyecto.

Al **Dr. Luis Martín Sánchez Magaña** por guiarme con sus valiosas experiencias durante la obtención de los tratamientos.

A la **Dra. J. Xiomara K. Perales Sánchez** por aportar sus conocimientos y siempre estar al pendiente de nuestras necesidades. Por uno que otro regaño bien merecido (que gracias a ellos logramos aprender), pero sobre todo por su amistad. Juntas sufrimos con “esa” técnica, pero al final lo logramos. ¡Muchas gracias!

A mis compañeros de generación **MCTA 2013-2015**, por compartir muchos momentos agradables, viajes y risas. En especial a **Jorge, Lourdes, Ana María, Anayanci y Karen**. Y a **Fernanda**, gracias también por el apoyo con asesorías en diferentes técnicas y temas que no dominaba, y estar siempre dispuesta a ayudarme a pesar de lo ocupada que estabas.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: **Fernando** (¿qué haríamos sin ti en el laboratorio?), **Daniel** (mi hermano mayor de Directores de Maestría, quien siempre me aconsejó sabiamente), a las chicas de las 4 (**Denisse, Alfa y Celeste**), **Xiomara, Julieta** (siempre animándonos), **Mario** (¡Esos empastados!), **Jonathan** (¿me das raite?) y **Álvaro**. Gracias por su amistad, apoyo, así como por todos los momentos compartidos. Mis días de laboratorio fueron mucho mejores gracias a su compañía. ¡Los quiero!. En especial gracias a **Jorge**, mi compañerito de exposiciones y quien fue a parar conmigo en el laboratorio. Esta Maestría no habría sido lo mismo sin ti (aunque seas enfadosito). Gracias por ayudarme siempre que lo necesitaba y por apoyarme con tus conocimientos, así como compartir momentos divertidos y de desesperación (nuestro amigo rosado), así como celebrar nuestros pequeños éxitos, que poco a poco dieron lugar a la culminación de nuestros proyectos. ¡Te quiero!.

A mis amigos **SAC** y **Exmochomitas** por sus palabras de ánimo cuando creía que no podía, y por entender todas aquellas veces que les quedé mal en las reuniones. ¡Los quiero mucho!. Gracias a **Ismael** por las clases a distancia mientras hacía su propia Maestría (desde la Licenciatura apoyándome con asesorías), a **Yesenia** por siempre darme palabras de ánimo cuando me veía y a **Melissa**, porque las tardes divertidas que pasábamos juntas (nieves en promoción) lograban relajarme y olvidarme del estrés.

A mis padres **Bertha** y **Carlos**, y a mis hermanas **Ale** y **Andrea** por su gran apoyo durante mi realización del posgrado. Esto no habría sido posible sin ustedes. Gracias mamá por tu amor y apoyo infinito; gracias papá por llevarme en las noches (o muy temprano) al laboratorio, con tal de que pudiera llevar a cabo mi proyecto; las palabras no alcanzan para expresar todo el amor y agradecimiento que les tengo. A Ale por escucharme, ayudarme y aconsejarme en los distintos problemas que presentaba, a Andrea por compartir loqueras que sólo nosotras entendemos (TVXQ, JYJ), y a ambas por creer en mí.

Finalmente, pero no menos importante, gracias a **Hiroshi**. Eres una pieza fundamental en la realización de este logro. Gracias por tus palabras de ánimo cuando creía que ya no podía más, por entenderme cuando estaba cansada, estresada o de mal humor porque no salían las cosas, por creer en mí cuando yo no lo hacía y por hacer que me olvidara un rato del estrés, con tu infinita alegría. ¡Te amo!

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	xvi
ÍNDICE DE FIGURAS	xviii
I RESUMEN	1
II INTRODUCCIÓN	5
III REVISIÓN DE LITERATURA	9
A. ALIMENTOS FUNCIONALES	9
1. Definición	9
2. Nutracéuticos en los alimentos	9
a. Definición	9
3. Antioxidantes	11
a. Evaluación de la actividad antioxidante	11
B. COMPUESTOS FENÓLICOS	14
1. Definición	14
2. Clasificación	16
3. Absorción y biodisponibilidad	18
4. Efectos metabólicos	20
a. Actividad antioxidante	20
b. Actividad antimicrobiana	21
c. Actividad anticarcinogénica	21
d. Actividad hipoglucémica	22

e.	Protección del sistema cardiovascular	23
1)	Agente vasorelajante	23
2)	Efecto antiateroesclerótico	23
3)	Efecto antritrombogénico	24
4)	Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina	24
C.	PÉPTIDOS BIOACTIVOS	25
1.	Definición	25
2.	Liberación de péptidos encriptados	25
3.	Absorción de péptidos durante la digestión gastrointestinal	27
4.	Efectos metabólicos	29
1)	Péptidos opiodes	29
2)	Péptidos antimicrobianos	30
3)	Péptidos inmunomoduladores y citomoduladores	31
4)	Péptidos antitrombóticos	32
5)	Péptidos que enlazan metales	32
6)	Péptidos hipocolesterolémicos	33
7)	Péptidos antioxidantes	34
8)	Péptidos antihipertensivos	35
D.	ESTRÉS OXIDATIVO	37
1.	Estrés oxidativo	37
2.	Radicales libres	37
3.	Especies reactivas de oxígeno (ROS)	38

4.	Daño por ROS a biomoléculas	39
a.	Lípidos	39
b.	Proteínas	40
c.	Ácido desoxirribonucleico (ADN)	41
E.	RELACIÓN ENTRE DIETA Y ENFERMEDAD	41
F.	HIPERTENSIÓN	42
1.	Generalidades	42
2.	Prevalencia de la hipertensión arterial	43
3.	Mecanismos de la hipertensión	44
a.	Enzima convertidora de angiotensina I (ECA)	45
4.	Estrategias contra la hipertensión	47
a.	Medicamentos comercialmente disponibles	47
b.	Biopéptidos con propiedades antihipertensivas	49
c.	Fitoquímicos con propiedades antihipertensivas	51
G.	IMPORTANCIA DEL GARBANZO EN LA ALIMENTACIÓN	53
1.	Generalidades	53
2.	Composición química	54
a.	Proteínas	56
b.	Lípidos	56
c.	Carbohidratos	57
d.	Fibra dietaria total	57
e.	Almidón resistente	58
f.	Vitaminas y minerales	58
3.	Valor nutricional	59

1.	Fitoquímicos en garbanzo	59
a.	Compuestos fenólicos	62
b.	Isoflavonas	62
c.	Saponinas	62
2.	Actividad antioxidante del garbanzo y sus productos	63
3.	Propiedades nutracéuticas del garbanzo y sus productos	64
a.	Hipocolesterolémica	65
b.	Antidiabética	66
c.	Antimutagénica	66
d.	Anticarcinogénica	67
e.	Antihipertensiva	68
H.	FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO	69
1.	Generalidades	69
2.	Tempe	71
a.	Origen e historia	71
b.	Características	71
c.	Sustratos	72
d.	Inóculos	73
1)	<i>Rhizopus oligosporus</i>	74
a)	Actividad enzimática	76
3.	Manufactura de tempe	76
a.	Limpieza	77
b.	Remojo	77

c.	Descascarillado	77
d.	Cocción parcial	77
e.	Drenado/enfriado	77
f.	Inoculación	78
g.	Contenedores de fermentación	78
h.	Incubación	78
4.	Cambios químicos durante la elaboración de tempe	79
a.	Proteínas	79
a.	Lípidos	79
b.	Carbohidratos	81
c.	Fibra dietaria total	82
d.	Almidón resistente	82
e.	Vitaminas y minerales	82
5.	Efecto de la FES de leguminosas sobre el valor nutricional	83
a.	Perfil de aminoácidos	83
a.	Digestibilidad	85
b.	Valor biológico de las proteínas	86
6.	Efecto de la FES de leguminosas sobre niveles y perfiles de fitoquímicos	86
7.	Efecto de la FES de leguminosas sobre propiedades nutraceuticas	89
a.	Actividad antioxidante	89
b.	Propiedad antihipertensiva	92
c.	Propiedad antimutagénica	93

d. Propiedad anticarcinogénica	93
IV JUSTIFICACIÓN	95
V HIPÓTESIS	96
VI OBJETIVOS	97
A. OBJETIVO GENERAL	97
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	97
VII MATERIALES Y MÉTODOS	98
A. MATERIALES	98
B. MÉTODOS	98
1. Caracterización física de los granos de garbanzo Blanco Sinaloa	98
a. Dimensiones (largo, ancho y grosor)	98
b. Peso de 100 granos	98
c. Peso hectolítrico	98
d. Calibre	98
e. Porcentaje de testa	99
2. Composición química de garbanzo Blanco Sinaloa	99
a. Humedad	99
b. Proteína cruda	99
c. Grasa cruda	100
d. Minerales	100
e. Carbohidratos	100
f. Fibra dietaria total	100

3.	Propiedades fisicoquímicas de harina de garbanzo Blanco Sinaloa 92	101
a.	Actividad de agua (A_w)	101
b.	Diferencia total de color (ΔE)	101
c.	pH	102
d.	Índice de absorción de agua (IAA)/ índice de solubilidad en agua (ISA)	102
e.	Índice de formación y estabilidad de espuma (FEE)	102
f.	Actividad y estabilidad de emulsión (AEE)	103
g.	Capacidad de absorción de aceite (CAA)	104
h.	Índice de dispersabilidad	104
4.	Obtención de harinas de garbanzo bioprocesadas (HGB) por fermentación en estado sólido	104
a.	Preparación del sustrato	104
b.	Inóculo	106
c.	Fermentación	106
d.	Obtención de harinas	107
5.	Evaluación de la actividad antioxidante (AAox), compuestos fenólicos totales (CFT) y rendimiento de hidrolizado (RH) en harinas de garbanzo bioprocesado (HGB) por fermentación en estado sólido	107
a.	Extracción de fitoquímicos libres	107
b.	Extracción de fitoquímicos ligados	108
c.	Actividad antioxidante (AAox) hidrofílica total	108
d.	Compuestos fenólicos totales (CFT)	109

e.	Rendimiento de hidrolizados	110
1)	Obtención de hidrolizados proteicos	110
2)	Determinación de rendimiento de hidrolizados de HGB	110
6.	Optimización del bioproceso de fermentación de los granos de garbanzo	111
a.	Diseño experimental, análisis de regresión y análisis varianza	111
b.	Optimización del proceso de fermentación	113
7.	Composición química de harina de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO)	114
8.	Propiedades fisicoquímicas de harina de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO)	115
9.	Actividad antioxidante hidrofílica en harina de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO)	115
a.	Método ABTS	115
b.	Método ORAC	115
10.	Compuestos fenólicos totales en harina de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO)	117
11.	Rendimiento de hidrolizado en harina de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO)	117
12.	Evaluación de potencial antihipertensivo de HGBO (inhibición de ECA por hidrolizado proteínico de HGBO)	117
13.	Análisis estadístico	118
VIII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	119
A.	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE GRANOS Y HARINA DE GARBANZO CRUDO (SIN PROCESAR)	119
1.	Características físicas de granos de garbanzo Blanco Sinaloa 92	119
2.	Composición química y propiedades fisicoquímicas de harina de garbanzo crudo (sin procesar) variedad Blanco Sinaloa 92	121
B.	CONDICIONES ÓPTIMAS DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO PARA PRODUCIR HARINA DE GARBANZO BIOPROCESADO CON ACTIVIDAD	

ANTIOXIDANTE, CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y RENDIMIENTO DE HIDROLIZADO ALTOS	124
1. Modelos experimentales de predicción	124
a. Actividad antioxidante (AAox)	127
b. Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT)	130
c. Rendimiento de hidrolizado (RH)	133
2. Optimización	136
C. COMPOSICIÓN QUÍMICA, PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y RENDIMIENTO DE HIDROLIZADO DE HARINA DE GARBANZO BIOPROCESADO OPTIMIZADA.	138
1. Composición química y propiedades fisicoquímicas de harina de garbanzo bioprocesada optimizada	138
2. Actividad antioxidante, compuestos fenólicos totales y rendimiento de hidrolizado de harinas de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO) y garbanzo crudo (sin procesar)	142
3. Potencial antihipertensivo de HGBO (inhibición de ECA por hidrolizado de proteína de HGBO)	146
X CONCLUSIONES	149
XI BIBLIOGRAFÍA	151
ABREVIATURAS	191

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Clasificación de antioxidantes según su sitio de acción	12
2	Clasificación de antioxidantes según su origen	13
3	Composición de química del grano de garbanzo	55
4	Aminoácidos esenciales en granos de garbanzo	60
5	Fitoquímicos en granos de garbanzo	61
6	Efecto de la fermentación de leguminosas sobre composición química	80
7	Efecto de la fermentación de leguminosas sobre valor nutricional	84
8	Efecto de la fermentación de leguminosas sobre fitoquímicos	87
9	Efecto de la fermentación de leguminosas sobre actividad antioxidante y propiedades nutraceuticas	90
10	Diseño experimental utilizado para obtener diferentes combinaciones de temperatura de fermentación/tiempo de fermentación para producir harinas de garbanzo bioprocesado	112
11	Características físicas del grano de garbanzo variedad Blanco Sinaloa 92	120
12	Composición química y propiedades fisicoquímicas de harina de garbanzo crudo (sin procesar) variedad Blanco Sinaloa 92	122
13	Diseño experimental ¹ empleado para obtener diferentes	125

	combinaciones de temperatura y tiempo de fermentación en estado sólido (TF, tF) para la producción de harinas de garbanzo bioprocesado (HGB), y resultados experimentales de las variables de respuesta (AAox, CFT y RH)	
14	Coeficientes de regresión y análisis de varianza de los modelos experimentales de predicción que muestran la relación entre las variables de respuesta (AAox, CFT, RH) y variables de proceso (TF, tF) para la producción de harinas de garbanzo bioprocesado (HGB).	126
15	Composición química y propiedades fisicoquímicas de harinas de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO) y garbanzo crudo (sin procesar).	139
16	Actividad antioxidante, contenido de compuestos fenólicos totales y rendimiento de hidrolizado de harinas de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO) y garbanzo crudo (sin procesar).	143

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Pág.
1	Esquema organizacional de nutraceuticos	10
2	Control de la hipertensión	48
3	Obtención de harina de garbanzo bioprocesada por FES	105
4	Gráficas de superficie de respuesta (A) y contornos (B) mostrando el efecto de las variables de proceso de fermentación [TF: temperatura de fermentación (°C), tF: tiempo de fermentación (h)] sobre la actividad antioxidante [AAox ($\mu\text{mol ET}/100\text{g}$, bs)] de las harinas de garbanzo bioprocesado (HGB).	129
5	Gráficas de superficie de respuesta (A) y contornos (B) mostrando el efecto de las variables de proceso de fermentación [TF: temperatura de fermentación (°C), tF: tiempo de fermentación (h)] sobre el contenido de fenólicos totales [CFT ($\text{mg EAG}/100\text{g}$, bs)] de las harinas de garbanzo bioprocesado (HGB).	132
6	Gráficas de superficie de respuesta (A) y contornos (B) mostrando el efecto de las variables de proceso de fermentación [TF: temperatura de fermentación (°C), tF: tiempo de fermentación (h)] sobre el rendimiento de hidrolizados (%) de las harinas de garbanzo bioprocesado (HGB).	135

- 7 (A) Deseabilidad global ($D = 1$) para obtener la mejor combinación de variables de proceso ($TF = 25^{\circ}\text{C}/tF = 132$ h) y (B) deseabilidad individual (d_i) para las variables de respuesta (AAox, CFT y RH). 137

I RESUMEN

El estrés oxidativo – definido como el desbalance entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes – ha sido asociado con el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas. Varios estudios han demostrado que la dieta y algunos de sus componentes pueden influir en la intensidad del daño causado por estrés oxidativo. Algunos reportes afirman que la inclusión de leguminosas en la dieta diaria tiene muchos efectos fisiológicos benéficos en el control y la prevención de enfermedades crónico-degenerativas, tales como la hipertensión arterial, a través de compuestos bioactivos tales como compuestos fenólicos y péptidos bioactivos (que se obtienen tras la hidrólisis enzimática de proteínas). La fermentación en estado sólido (FES) ha sido reconocida como un bioproceso que incrementa el contenido de compuestos bioactivos de semillas procesadas con hongos. Aun cuando hay diversos estudios acerca del efecto de la FES en el valor nutracéutico de leguminosas tales como garbanzo, no hay estudios sobre la optimización del bioproceso de FES para incrementar la actividad antioxidante, el contenido de compuestos fenólicos totales y el rendimiento de hidrolizados de este grano (para una mayor concentración de biopéptidos), utilizando una cepa de *Rhizopus oligosporus*. Por lo tanto, este estudio se realizó para obtener una harina funcional con altos valores de actividad antioxidante, contenido de compuestos fenólicos totales y rendimiento de hidrolizado, a partir de granos de garbanzo, mediante la optimización del proceso de FES utilizando una cepa de *Rhizopus oligosporus*. Como técnica de optimización se aplicó la metodología de superficie de respuesta. Se utilizó un diseño experimental central compuesto rotatable con dos factores

[temperatura de fermentación = 22 – 45°C/tiempo de fermentación = 6 – 132 h] y cinco niveles (13 tratamientos). Los cotiledones bioprocesados de cada tratamiento fueron secados, molturados y mezclados con sus testas previamente secadas y molidas. La mejor combinación de temperatura de fermentación/tiempo de fermentación de FES para obtener la harina funcional fue 25°C/132 h. 4. El proceso de FES incrementó ($p < 0.05$) el contenido de proteína (+38.3%) y fibra dietaria soluble (FDS), insoluble (FDI) y total (FDT) (+72.9%, +50.9% y +55.5%, respectivamente). Asimismo, la FES incrementó la actividad antioxidante (de 3,410 a 9,663 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g}$, bs por el método ABTS y de 4,919 a 15,358 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g}$, bs por el método ORAC), el contenido de compuestos fenólicos totales (de 62 a 200 mg EAG/100 g, bs) y el rendimiento de hidrolizado (de 13.6 a 18.8%). En conclusión, la fermentación en estado sólido podría ser una estrategia efectiva para incrementar la funcionalidad del garbanzo asociada a la salud, debido a la mejora del contenido de fibra dietaria, la actividad antioxidante, el contenido de compuestos fenólicos totales y el rendimiento de hidrolizado (concentración de biopéptidos) de este grano.

ABSTRACT

Oxidative stress – defined as the imbalance between free radical production and antioxidant defenses – has been linked to the development of chronic-degenerative diseases. Several studies have shown that diet and some of its components could influence the intensity of oxidative stress damage. Some reports claim that inclusion of legumes in the daily diet has many beneficial physiological effects in the control and prevention of chronic-degenerative diseases, like hypertension, due to bioactive compounds, such as phenolic compounds and bioactive peptides (obtained after enzymatic hydrolysis of proteins). Solid state fermentation (SSF) has been recognized as a bioprocess which increases the phenolic content and antioxidant activity of fungal processed seeds. Even when there are diverse studies about the effect of SSF on nutraceutical value of legumes such as chickpea, there isn't any research about the optimization of the SSF bioprocess to increase the antioxidant value, total phenolic content and hydrolyzate yield of this grain (for a greater concentration of peptides), using *Rhizopus oligosporus* strain. Therefore, this study was conducted to obtain a functional flour with increased antioxidant activity, total phenolic compounds and hydrolyzate yield from chickpea seeds by optimizing the SSF process using a *Rhizopus oligosporus* strain. Response surface methodology was applied as optimization technique. A central composite rotatable experimental design with two factors [fermentation temperature = 22 – 45°C/fermentation time = 6 – 132 h] and five levels was used (13 treatments). The bioprocessed cotyledons from each treatment were dried, milled, and blended with its previously dried milled seed coats. The best combination fermentation temperature/fermentation time of SSF to obtain the functional flour was 25°C/132 h. The SSF bioprocess increased ($P < 0.05$) the

content of protein (+38.3%) and soluble (SFD), insoluble (IFD) and total (TFD) dietary fiber (+72.9%, +50.9% and +55.5%, respectively). Likewise, the SSF increased antioxidant activity [from 3,410 to 9,663 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g, dw}$ (ABTS), and from 4,919 to 15,358 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g, dw}$ (ORAC)], total phenolic compounds (from 62 to 200 mg GAE/100 g, dw), and hydrolyzate yield (from 13.6 to 18.8%). In conclusion, solid state fermentation might be an effective strategy to increase health-linked functionality of chickpea, due to improved dietary fiber content, antioxidant activity, total phenolic compounds content and hydrolyzate yield (concentration of peptides).

II INTRODUCCIÓN

Bajo concentraciones fisiológicas, las especies reactivas de oxígeno (ERO) actúan como moléculas mediadoras de señalización, crecimiento celular, migración y diferenciación (Valko y col 2006), mientras que a más altas concentraciones, inducen muerte celular, apoptosis y senescencia (Chandra y col 2000). Los efectos dañinos de las ERO son balanceados por la acción de antioxidantes no-enzimáticos en conjunto con enzimas antioxidantes (Halliwell 1996); sin embargo, cuando existe un desbalance entre la producción de ERO y la defensa antioxidante, se produce la condición denominada “estrés oxidativo” (Vetrani y col 2013). Los daños ocasionados por los radicales libres al ADN, proteínas y lípidos se han relacionado con el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas (Morrow 2005; Stephens y col 2009). La composición de la dieta puede influir tanto en la intensidad del daño oxidativo como en los mecanismos antioxidantes, lo que explica en parte la relación existente entre la dieta y algunas enfermedades crónicas (Pérez y col 2002). Entre las enfermedades de este tipo se encuentran las enfermedades cardiovasculares, que son una de las mayores causas de muerte a nivel global (OMS, 2011), siendo el principal factor de riesgo cardiovascular la elevada presión arterial. A nivel mundial, se estima que la presión arterial elevada causa 7,5 millones de muertes por año, aproximadamente el 12,8% del total de las defunciones (OMS, 2015). La hipertensión arterial (HTA) es uno de los principales factores de riesgo para padecer enfermedad cardiovascular, cerebrovascular y falla renal, que son importantes causas de mortalidad en Mexico (Stevens y col 2008), donde se reporta una prevalencia de hipertensión arterial de 31.5% (ENSANUT, 2012); ésta ocurre cuando la enzima

convertidora de angiotensina (ECA) actúa sobre el decapeptido angiotensina I, hidrolizando His-Leu y produciendo angiotensina II, un potente vasoconstrictor y retenedor de sal, con el consecuente aumento de la presión arterial (Pihlanto y Mäkinen 2013).

Diversos reportes mencionan que la inclusión de leguminosas en la dieta diaria tiene muchos efectos benéficos en la prevención de enfermedades crónico-degenerativas (Simpson 1981; Soni y col 1982). Se ha demostrado que el consumo de garbanzo tiene algunos beneficios fisiológicos que pueden reducir el riesgo de enfermedades crónicas, entre éstas las enfermedades cardiovasculares (Jukanti y col 2012). En estos granos se reporta una amplia variedad de compuestos fenólicos que pueden ser considerados compuestos bioactivos debido a su actividad antioxidante (AAox) (Han y Baik 2008). Muchos fitoquímicos encontrados en leguminosas, como flavonoides y ácidos fenólicos, han ganado atención como agentes antihipertensivos (Suzuki y col 2006; Li y col 2013).

Por otro lado, se ha reportado la obtención de péptidos bioactivos inhibidores de ECA a partir de granos de garbanzo (Pedroche y col 2002; Yust y col 2003; Vioque y col 2006; Aluko 2008b; Barbana y Boye 2010; Medina-Godoy y col 2012); éstos se encuentran encriptados dentro de la proteína de origen y son liberados al ser hidrolizadas enzimáticamente o durante el procesamiento de los alimentos, presentando de esta manera su función biológica (Torruco-Uco y col 2009; Aluko y col 2008).

Para su consumo, las leguminosas generalmente son procesadas en diversos productos (Kurien 1981). Los alimentos fermentados representan alrededor de un tercio del consumo total de alimentos a nivel mundial; tales productos son más altos

en actividad antioxidante gracias a la fermentación microbiana (Reyes-Bastidas y col 2010; Cheng y col 2013; Sánchez-Magaña y col 2014). La fermentación en estado (FES) sólido es un proceso biotecnológico que consiste en el crecimiento de microorganismos sobre sustratos sólidos (ej. granos) en ausencia, o casi ausencia, de agua libre superficial; sin embargo, el sustrato debe poseer la suficiente humedad para permitir el crecimiento y la actividad metabólica del microorganismo (Pandey 2003). Los alimentos producidos por fermentación en estado sólido son diversos; uno de los más importantes es el alimento de origen Indonés denominado tempe (Agosin y col 1983; Hachmeister y Fung 1993), principalmente obtenido a partir del grano de soya, siendo *Rhizopus oligosporus* el principal hongo productor. Este hongo filamentoso ha sido aceptado como “generalmente reconocido como seguro” (GRAS, por sus siglas en inglés) (Wongputtisin y col 2007). La mejora de la actividad antioxidante de alimentos fermentados a base de granos durante la fermentación en estado sólido se debe a la liberación de compuestos fenólicos llevada a cabo por la hidrólisis enzimática fúngica (Wongputtisin y col 2007), en especial por parte de la enzima β -glucosidasa, la cual cataliza la liberación de ácidos fenólicos y flavonoides conjugados durante la fermentación (McCue y col 2003; Randhir y col 2004a, b; Chaiyasut y col 2010; Cheng y col 2013; Handa y col 2013). La mayoría de los péptidos bioactivos reportados son producidos por hidrólisis enzimática *in vitro* o fermentación (Udenigwe y Aluko 2011). El hongo produce enzimas hidrolíticas, tales como las proteasas, generando péptidos bioactivos (Okamoto y col 1995; Aoki y col 2003; Gibbs y col 2004; Kim y col 2010), o bien, hace a la proteína más susceptible al ataque de enzimas hidrolíticas; de este modo, los hidrolizados proteínicos (obtenidos mediante enzimas digestivas) de proteínas previamente hidrolizadas

(mediante fermentación) han demostrado mejor bioactividad comparada con sus proteínas de procedencia (Udenigwe y Aluko 2011).

De este modo, la generación de péptidos bioactivos y la bioconversión de formas conjugadas de compuestos fenólicos a sus formas libres durante la FES mejora la funcionalidad del sustrato ligada a la salud.

A pesar de que hay diversos estudios sobre el efecto de la FES en el valor nutricional y nutracéutico de garbanzo (Reyes-Moreno y col 2000; Reyes-Moreno y col 2004; Angulo-Bejarano y col 2008; Han y Baik 2008; Sánchez-Magaña y col 2014), no hay investigaciones sobre la optimización del proceso de FES para aumentar el potencial antioxidante, contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) y rendimiento de hidrolizado (RH) de este grano.

La metodología de superficie de respuesta (MSR) ha sido considerada un método matemático estadístico efectivo para establecer modelos para evaluar la significancia relativa de variables y determinar condiciones óptimas de respuestas deseables.

Por ello, en el presente estudio se planteó el objetivo de encontrar las mejores condiciones de FES de garbanzo, mediante MSR, para maximizar su actividad antioxidante, contenido de compuestos fenólicos totales y rendimiento de hidrolizado (concentración de biopéptidos), para la obtención una harina funcional de garbanzo bioprocesado.

III REVISIÓN DE LITERATURA

A. ALIMENTOS FUNCIONALES

1. Definición

Los llamados "alimentos fisiológicamente funcionales", término que se originó en Japón en la década de 1980, se definen como "cualquier alimento o ingrediente que tiene un impacto positivo en la salud de un individuo, el rendimiento físico, o en el estado de ánimo, además de su valor nutritivo" (Goodberg 1994). También se han definido como "productos que se asemejan a los alimentos tradicionales pero poseen beneficios fisiológicos demostrados" (Shahidi 2009).

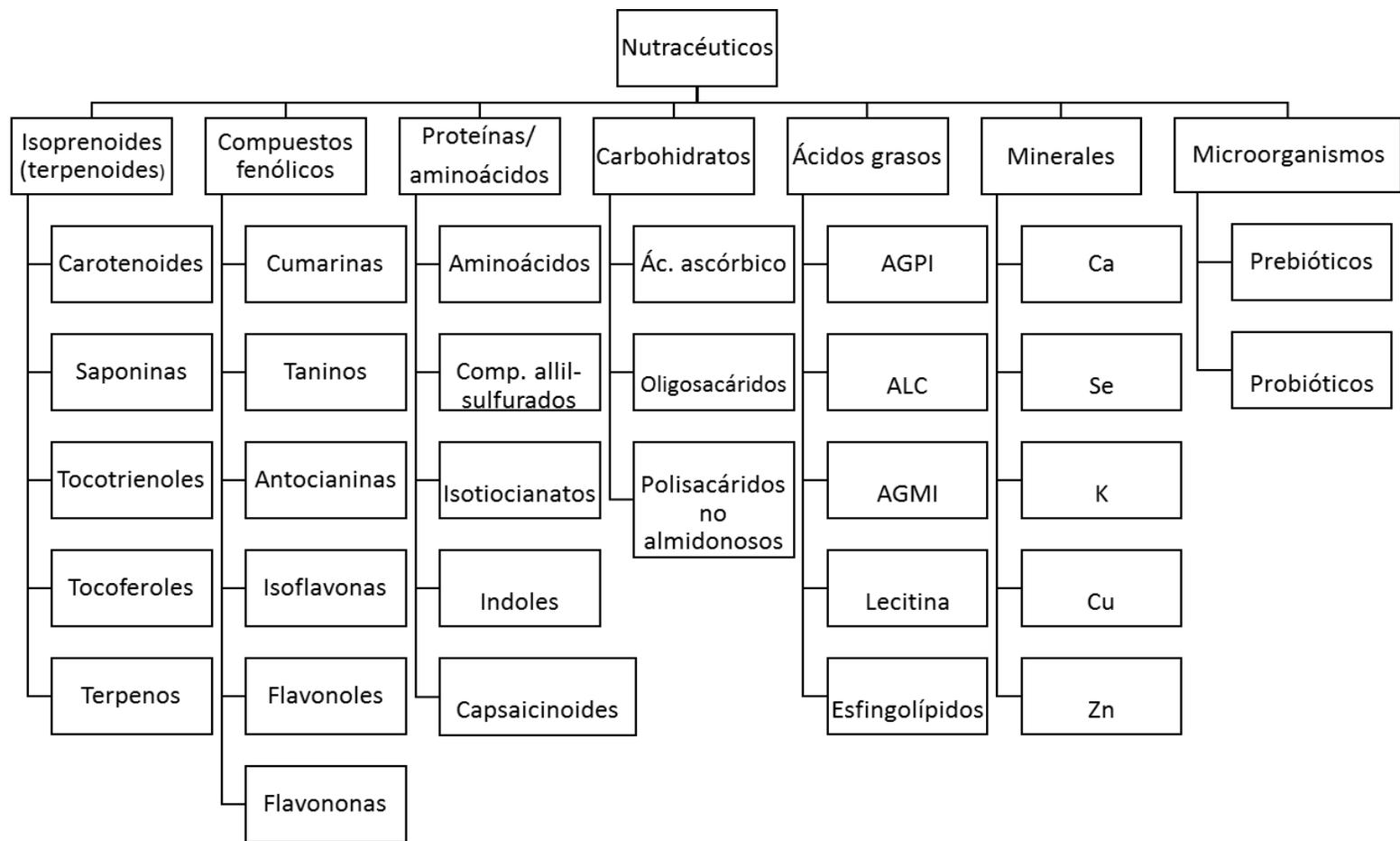
Se han destacado tres condiciones que deben satisfacer los alimentos funcionales. En primer lugar, deben ser de origen natural (no cápsulas, comprimidos, o polvos). En segundo lugar, son alimentos consumidos convencionalmente, como parte de la dieta diaria, y en tercer lugar, cuando se ingieren deben tener un efecto positivo más allá de su valor nutritivo o nutrición básica, mejorando o regulando un proceso biológico particular o mecanismo para prevenir o controlar una enfermedad específica, con el debido respaldo científico (Hardy 2000, Roberfroid 2000).

2. Nutracéuticos en los alimentos

En la **Figura 1** se muestra un esquema organizacional de nutracéuticos.

a. Definición

El término "nutracéuticos" fue acuñado en 1989 por la Fundación para la Innovación en Medicina (FIM 1992) para cubrir "cualquier sustancia que pueda ser considerada un alimento o parte de un alimento, y que proporcione beneficios



AGPI = Ácidos grasos poliinsaturados; ALC = Ácido linoleico conjugado; AGMI = Ácidos grasos monoinsaturados.

Figura 1. Esquema organizacional de nutraceuticos (Wildman 2007).

médicos o para la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de la enfermedad".

Un nutracéutico o farmaconutriente es un nutriente que mantiene, soporta y normaliza cualquier función fisiológica o metabólica, además de que también puede potenciar, antagonizar o de alguna manera modificar las funciones fisiológicas o metabólicas (Hardy 2000). Los nutracéuticos son productos derivados de los alimentos, pero se utilizan medicinalmente en forma de píldoras, cápsulas, extractos, etc., rindiendo beneficios fisiológicos demostrados (Shahidi 2009).

3. Antioxidantes

La definición propuesta por la Comisión Técnica de Antioxidantes Dietéticos y Compuestos Relacionados de la Junta de Alimentos y Nutrición (2002) dice que un antioxidante dietario es "una sustancia presente en los alimentos que reduce significativamente los efectos adversos de las especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno, o ambos en la función fisiológica normal en seres humanos. Los antioxidantes son importantes en la protección contra la hipertensión, diabetes, enfermedades cardiovasculares y cáncer (Saxena y col 2007). Los compuestos antioxidantes reaccionan con radicales libres y les ceden un electrón, oxidándose y transformándose en radicales libres débiles, con escasos o nulos efectos tóxicos (Halliwell y Gutteridge 1998). Los antioxidantes han sido clasificados de diferentes maneras, de acuerdo al sitio donde ejercen su acción y según su origen (Cuadros 1 y 2).

a. Evaluación de la actividad antioxidante

Existen diversos métodos *in vitro* para predecir la protección ante la oxidación atribuida a los antioxidantes de un alimento. Estos deben interpretarse teniendo en

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		Haptoglobulinas
Proteínas que ligan metales		Vitamina C
Sistemas proteolíticos		Ácido úrico
Vitamina C		Vitamina E

Venero-Gutiérrez (2002)

Cuadro 2. Clasificación de antioxidantes según su origen

Origen	Acción
<i>Exógenos</i>	
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
β-carotenos	Regenera la forma oxidada de la vitamina E
Flavonoides, licopenos	Neutraliza el oxígeno singulete
<i>Endógenos</i>	
Enzimáticos	
Superóxido dismutasa	Cofactor Cobre, sodio, manganeso
Catalasa	Hierro
Glutación peroxidasa	Selenio
No enzimáticos	
Glutación	Barreras fisiológicas de oxígeno a las células
Coenzima Q	
Ácido Tioctico	Transportadores de metales (transferina y ceruloplasmina)

Venereo Gutiérrez (2002)

cuenta sus limitaciones como: medio de reacción, sustrato oxidable, radical, concentración de iniciador de la oxidación, etc. Se consideran buenas herramientas para seleccionar extractos fenólicos o sus fracciones con alta capacidad antioxidante debido a la rapidez, reproducibilidad y bajo costo. Los métodos se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante, siendo la inhibición proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o muestra. Los métodos basados en la determinación de productos secundarios de oxidación son adecuados para estudiar sistemas lipídicos, y los más utilizados son el método del ácido tiobarbitúrico (TBARS), el índice de anisidia (para aldehídos volátiles) y la cromatografía de gases. El método basado en la capacidad para reducir metales (índice del poder antioxidante de la muestra) más común es el FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Finalmente se encuentran los métodos basados en el secuestro de radicales libres, como el DPPH (2, 2 difenil picril hidrazil), TEAC (capacidad antioxidante equivalente de trolox) y ORAC (capacidad antioxidante de radicales oxígeno), siendo éste último uno de los más empleados, el cual puede ser hidrofílico o lipofílico, asignando así la actividad antioxidante a la fracción hidrofílica y/o lipofílica de la muestra (Ou y col 2001; Huang y col 2002; Soler 2009).

B. COMPUESTOS FENÓLICOS

1. Definición

Las plantas son fuentes potenciales de compuestos bioactivos naturales. Éstas absorben la luz solar y mediante fotosíntesis producen altos niveles de oxígeno y metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios son sustancias químicas

producidas por las plantas; sus funciones en el crecimiento, la fotosíntesis, la reproducción y otros procesos primarios aún no son conocidos. Los flavonoides y ácidos fenólicos son los grupos de metabolitos secundarios y compuestos bioactivos más importantes en plantas (Kim y col 2003).

En términos generales, el término "fenol" es un término químico que define un anillo de fenilo que lleva uno o más sustituyentes hidroxilo, pero en el contexto de fenólicos vegetales tal definición no es satisfactoria, ya que incluye compuestos tales como el gossipol, el carotenoide fenólico 3-hydroxyisorenieratene o la hormona fenólica sexual femenina oestrone, que son principalmente de origen terpenoide (Harborne 1989). Por ello, se propuso utilizar el término de "fenólicos vegetales" para referirse a "metabolitos naturales secundarios biogénicamente derivados ya sea de la vía del ácido shikímico o de la vía del fenilpropanoide, que directamente proporciona fenilpropanoides, o de la vía del acetato "policétido"/malonato, que puede producir fenoles simples, o fenoles y polifenoles monoméricos y poliméricos, que cumplen una muy amplia gama de funciones fisiológicas en las plantas" (Harborne 1989; Quideau 2011). Se considera que éstos tienen un papel clave como compuestos de defensa al estrés ambiental, como la luz alta, bajas temperaturas, la infección por patógenos, herbívoros, y la deficiencia de nutrientes, lo que puede conducir a un aumento de la producción de radicales libres y otras especies oxidativas en las plantas. Tanto el estrés biótico como el abiótico estimula los flujos de carbono desde las vías metabólicas primaria y secundaria, lo que induce un cambio de los recursos disponibles en favor de la síntesis de productos secundarios (Lattanzio 2013).

2. Clasificación

Los compuestos fenólicos se clasifican según su estructura en: **(1) No flavonoides**, los cuales son fenoles sin grupo carboxilo: C₆, C₆-C₁, C₆-C₃ (como lignanos y estilbenos) y ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico (C₆-C₁), como el ácido gálico y el ácido cinámico. **(2) Flavonoides** (C₆-C₃-C₆), formados por dos grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado, que incluye flavononas, flavanoles, flavonoles, flavanos, antocianos y lignanos (Vázquez-Flores y col 2012). Los ácidos fenólicos simples y los flavonoides son los compuestos fenólicos más comunes y por lo general se producen como conjugados solubles y formas insolubles (Nardini y Ghiselli 2004). En la naturaleza, los compuestos fenólicos se producen sobre todo en las formas insolubles o unidas.

De acuerdo con el número de anillos de fenol que contienen, los compuestos fenólicos se clasifican en ácidos fenólicos, estilbenos, flavonoides, taninos y lignanos.

En el caso del grupo de los **flavonoides**, cuando están vinculados a una o más moléculas de azúcar son conocidos como glicósidos, y cuando no están conectados a una molécula de azúcar son llamados agliconas (Williamson 2004). El grado de glicosilación afecta directamente a la capacidad antioxidante de los flavonoides. Por lo general, las formas de aglicona de miricetina y quercetina son más activas que la forma de glucósido (Hopia y Heinonen 1999; Kaur y Kapoor 2001). Los flavonoides son los principales compuestos bioactivos presentes en las frutas y se distribuyen en seis subclases: flavonoles, flavanonas, isoflavonas, flavan-3-oles, flavonas y antocianinas. Los flavonoides representan aproximadamente dos tercios de los fenoles dietéticos (Robbins 2003).

El segundo grupo más importante comprende los **ácidos fenólicos**, que representan casi el tercio restante de los polifenoles de la dieta, y que están presentes en las frutas en forma ligada. Estas sustancias se dividen en dos subgrupos: ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos. En contraste con otros compuestos fenólicos, los ácidos hidroxibenzoico y hidroxicinámico presentan un carácter ácido debido a la presencia de un grupo carboxílico en la molécula (Annie y Jean-Jacques 2003). Los compuestos de ácido hidroxicinámico poseen un esqueleto de C6-C3. El ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico y ácido cafeico son algunos ejemplos de esta clase. Los ácidos hidroxibenzoicos (C6-C1) se encuentran en diversas frutas y en su mayoría se producen en forma de ésteres. Los ácidos fenólicos más comunes de esta categoría que se encuentran en las frutas son el ácido gálico, vanílico, elágico y siríngico.

Los **taninos** son la tercera clase de polifenoles que se encuentran en las frutas y están presentes en su mayoría como polímeros fenólicos. Los taninos son sustancias astringentes y amargas de diferentes pesos moleculares, y algunos de ellos, especialmente los taninos hidrolizables, son solubles en agua. Son un grupo de oligómeros polihidroxi-flavan-3-ol y polímeros con enlaces carbono-carbono entre las subunidades de flavanoles (Schofield y col 2001). Los taninos tienen la capacidad para precipitar las proteínas. Los dos tipos principales de taninos son los taninos condensados (proantocianidinas) y los hidrolizables. El ácido galotanino o ácido tánico es un tipo de tanino hidrolizable que se encuentra en las frutas. Las proantocianidinas, al entrar en contacto con las proteínas salivales, son responsables de la astringencia del fruto (El Gharras 2009).

Los **estilbenos** son un grupo de compuestos derivados de fenilpropanoides caracterizado por un esqueleto de 1,2-difeniletileno (C6-C2-C6) (Goyal y col 2012). Cantidades bajas de estilbenos están presentes en la dieta humana, y su principal representante es el resveratrol, en su mayoría en forma glicosilada (Delmas y col 2006 Ignat y col 2011). El resveratrol es una fitoalexina, esta sustancia se produce principalmente en la vid en respuesta a la lesión y la infección micótica (Atanackovic y col 2012). El quinto grupo de polifenoles comprende los **lignan**os, una gran variedad de estructuras individuales que en su mayoría consta de dos restos fenilpropanoides conectados a través de sus átomos de carbono de su cadena lateral (Davín y Lewis 2003; Aehle y col 2011), por lo general se encuentran como glucósidos. Los lignanos son una de las principales clases de fitoestrógenos, que son sustancias químicas similares al estrógeno. En el tracto gastrointestinal, estas moléculas se convierten en compuestos (enterodiol y enterolactona) que tienen propiedades estrogénicas y anti-estrogénicas (Meagher y Beecher 2000).

3. Absorción y biodisponibilidad

La absorción y posterior distribución, metabolismo y excreción de los flavonoides en el ser humano han sido poco estudiados. Durante mucho tiempo, se consideró que la absorción de los flavonoides de la dieta era insignificante, dado que la mayoría de los flavonoides de los alimentos están presentes unidos a azúcares como β -glucósidos (con la excepción de catequinas). Se esperaba que sólo los flavonoides libres, sin una molécula de azúcar (los llamados “agliconas”) pasaran libremente al torrente sanguíneo desde la pared intestinal, ya que no hay enzimas secretadas en el

intestino o presentes en la pared intestinal que puedan escindir los enlaces glicosídicos (Griffiths 1982; Kühnau 1976).

En el colon, la hidrólisis sólo se produce por microorganismos, que al mismo tiempo degradan los flavonoides en la dieta (Kühnau 1976). Así, es de esperarse sólo una absorción marginal de los flavonoides en la dieta. Sin embargo, se encontró en seres humanos que la absorción de la aglicona de quercetina administrada por vía oral fue menor que la de los glucósidos de quercetina (24% vs 52%) (Hollman y col 1995), mostrando que la absorción de los glucósidos en el intestino delgado es posible, además de que la molécula de azúcar de los glicósidos de quercetina es un determinante importante de su absorción y biodisponibilidad, observando que su conjugación con glucosa mejora la absorción del intestino delgado.

En cuanto a los ácidos hidroxicinámicos, se observa que cuando éstos son ingeridos bajo su forma libre, son absorbidos rápidamente en el estómago o en el intestino delgado y son conjugados por enzimas de desintoxicación hepáticas y/o intestinales. Se demostró que el ácido ferúlico fue bien absorbido en la parte superior del intestino (Adam y col 2002; Zhao y col 2004; Konishi y col 2006).

Los transportadores de ácidos monocarboxílicos (TAM) parecen estar implicados en la absorción de algunos ácidos fenólicos y sus metabolitos microbianos. Estos transportadores se expresan en muchos tejidos (Price y col 1998), por lo tanto podrían estar implicados en el proceso de absorción, y transporte de ácidos fenólicos en los tejidos diana.

4. Efectos metabólicos

a. Actividad antioxidante

La propiedad más descrita de casi todos los grupos de ácidos fenólicos y flavonoides es su capacidad de actuar como antioxidantes. Las flavonas y catequinas parecen ser los flavonoides más poderosos para la protección del cuerpo contra especies reactivas de oxígeno (ERO). Los radicales libres y ERO se han asociado a un gran número de enfermedades humanas (Bravo 1988, Nijveldt 2001).

Contienen estructuras de anillo conjugadas y grupos hidroxilo que tienen el potencial de funcionar como antioxidantes *in vitro* o en sistemas libres de células mediante el secuestro del anión superóxido, el oxígeno singulete, peroxiradicales de lípidos, y la estabilización de los radicales libres implicados en procesos oxidativos a través de hidrogenación o acomplejamiento con especies oxidantes (Duthie y col 1999, Birt y col 2001).

Las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos y flavonoides están mediadas por los siguientes mecanismos: (1) secuestro de especies de radicales tales como ERO/ especies reactivas de nitrógeno (ERN); (2) supresión de la formación de ERO/ ERN mediante la inhibición de algunas enzimas, o quelando metales traza involucrados en la producción de radicales libres, y por lo tanto inhibiendo la iniciación de la reacción lipoxigenasa; (3) regulación o protección de la defensa antioxidante (Cotelle 2001).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos es determinada por su estructura, en particular, la facilidad con la que un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático puede ser donado a un radical libre y la capacidad de un

compuesto aromático para apoyar a un electrón desapareado como resultado de la deslocalización alrededor del sistema del electrón. Otros determinantes estructurales importantes de la actividad antioxidante de los flavonoides parecen ser los grupos 4'-OH y 3'-OH. La adición de grupos hidroxilo a los átomos de carbono orto a la posición 4-C parece aumentar aún más el potencial antioxidante (Lien y col 1999). Estudios han indicado que las agliconas tienen mayor actividad antioxidante que los flavonoides conjugados (Noroozi y col 1998), esto puede ser debido al aumento de bloqueo de los grupos fenólicos responsables de la captación de radicales y de la quelación de metales y, posiblemente, a una disminución en la accesibilidad de las membranas debida al grupo glucosídico (Ioku y col 1995) .

b. Actividad antimicrobiana

Algunos flavonoides han mostrado actividad antibacteriana. Desde la década de 1940 se ha reconocido la presencia de flavonoides con actividad antiviral encontrados de manera natural, pero sólo recientemente se han hecho intentos de hacer modificaciones sintéticas de compuestos naturales para mejorar la actividad antiviral (Tapas y col 2008). La actividad antiviral parece estar asociada con los compuestos no glicosidados, y la hidroxilación en la posición 3 es aparentemente un requisito previo para ejercer actividad antiviral (Thomas y col 1988).

c. Actividad anticarcinogénica

Las dietas ricas en captadores de radicales podrían reducir la acción promotora del cáncer de algunos radicales (Sawa y col 1999). Algunos flavonoides pueden modificar enzimas y enlazar carcinógenos al ADN, ejerciendo así un efecto anticancerígeno (Siess y col 1996). Las isoflavonas de soja han sido evaluadas: la

genisteína podría suprimir el desarrollo de cáncer de mama inducido químicamente sin toxicidad reproductiva o endocrinológica. Se ha demostrado que la hesperidina, el principal glicósido de flavanona en zumo de naranja, inhibe la carcinogénesis de colon inducida químicamente (Ren y col 2003).

Algunos estudios han mostrado propiedades antitumorales de quercetina, incluyendo la inhibición de la proliferación y la migración de células cancerosas. (Lim y col 2006).

d. Actividad hipoglucémica

Tadera y col (2005) compararon la actividad inhibitoria de α -glucosidasa intestinal de ratas y de levadura, así como de α -amilasa pancreática porcina de seis grupos de flavonoides, y evaluaron las estructuras químicas de los flavonoides responsables de la actividad inhibitoria. La glucosidasa de levadura fue fuertemente inhibida por los grupos de antocianidinas, isoflavonas y flavonoles, con valores de IC_{50} menores de 15 μ M. Las siguientes estructuras incrementaron la actividad inhibitoria: un anillo C insaturado, 3-OH, 4-CO, el enlace del anillo B en la posición 3, y la sustitución de hidroxilo en el anillo B. La α -glucosidasa intestinal fue débilmente inhibida por varios flavonoides, y ligeramente por los grupos de antocianidina e isoflavonas. 3-OH y la sustitución hidroxil del anillo B incrementaron la actividad inhibitoria. En α -amilasa pancreática porcina, la luteolina, miricetina y quercetina fueron inhibidores potentes con valores de IC_{50} menores de 500 μ M. El doble enlace 2,3, 5-OH, el enlace del anillo B en la posición 3 y la sustitución hidroxil del anillo B incrementaron la actividad inhibitoria, mientras que el 3-OH la redujo.

e. Protección del sistema cardiovascular

1) Agente vasorelajante

El consumo de flavonoides puede prevenir la disfunción endotelial mediante la mejora del proceso de vasodilatación conduciendo a una reducción de la presión arterial (Iijima y Aviram 2001, Bertanova y col 2002). La disfunción endotelial representa un evento crítico en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y la principal complicación de la aterosclerosis y la formación de trombos arteriales (Jayakody y col 1985). El consumo de flavonoides puede prevenir una serie de enfermedades cardiovasculares incluyendo hipertensión y aterosclerosis (Hertag y col 1993a, b).

2) Efecto antiateroesclerótico

La modificación oxidativa de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los radicales libres es un evento temprano en la patogénesis de la aterosclerosis. Los flavonoides pueden secuestrar directamente algunas especies de radicales al actuar como antioxidantes de rompimiento de cadena (De-whallely y col 1990). La capacidad de la quercetina y glucósidos de quercetina para proteger LDL contra la modificación oxidativa ha mostrado un efecto protector significativo (Fuhrman y col 1995). Además, un estudio japonés reportó una correlación inversa entre la ingesta de flavonoides y las concentraciones totales de colesterol en plasma (Arai y col 2000).

3) Efecto antitrombogénico

La agregación de plaquetas desempeña un papel fundamental en la fisiología de enfermedades trombóticas. Las plaquetas activadas se adhieren al endotelio vascular generando peróxidos de lípidos y radicales libres de oxígeno que inhiben la formación de prostaciclina endotelial y de óxido nítrico. Flavonoides tales como quercetina, kaempferol y miricetina demostraron ser inhibidores eficaces de la agregación de plaquetas en perros y monos (Osman y col 1998). Los flavonoles son particularmente antitrombóticos porque atrapan radicales libres de manera directa, manteniendo de este modo la concentración adecuada de la prostaciclina y el óxido nítrico endotelial (Gryglewski y col 1987). Un estudio mostró que flavonoides son poderosos agentes antitrombóticos *in vitro* e *in vivo* debido a su inhibición de la actividad de la ruta de la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa (Alcaraz y Ferrandiz 1987).

4) Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina

Algunos extractos y compuestos obtenidos a partir de plantas han sido identificados como inhibidores de la ECA *in vitro* (Nyman y col 1998, Park y col 2003). Estos efectos beneficiosos en gran medida se han atribuido a la presencia de moléculas de flavonoides, que generan complejos de quelatos en el centro activo de la ECA (Loizzo y col 2007).

Los ácidos fenólicos y flavonoides inhiben a la ECA través de la interacción con el ion zinc; esta interacción es estabilizada por interacciones con otros aminoácidos en el sitio activo. Existe un aumento significativo en la actividad inhibidora de la ECA con el incremento de grupos hidroxilo. Otros compuestos, tales como el resveratrol y

pirogalol, pueden inhibir a la ECA a través de interacciones con los aminoácidos en el sitio activo, bloqueando así la actividad catalítica de la enzima (Shukor y col 2013)

Las principales características estructurales para la actividad inhibidora de los flavonoides son las siguientes: (a) el doble enlace entre los C2 y C3 en el anillo C; (b) el grupo catecol en el anillo B (39,49-dihidroxi) [61]; y (c) el grupo cetona en el carbono C4 del anillo C, que es un grupo funcional el cual se ha observado que es esencial para la inhibición de ECA (Guerrero y col 2012).

C. PÉPTIDOS BIOACTIVOS

1. Definición

Recientemente, ha aumentado el reconocimiento del papel de las proteínas como componentes fisiológicamente activos. Muchas proteínas que se encuentran de manera natural en los alimentos ejecutan su acción fisiológica directamente o a través de hidrólisis enzimática *in vivo* o *in vitro*. En los últimos años se ha reconocido que las proteínas dietarias son una fuente rica de péptidos biológicamente activos (Korhonen y col 1998); éstos se definen como pequeñas secuencias de aminoácidos derivadas de las proteínas alimentarias, que poseen propiedades fisiológicas potenciales además de la nutrición normal y adecuada (Udenigwe y Aluko 2012).

2. Liberación de péptidos encriptados

Los péptidos bioactivos se encuentran encriptados en la estructura primaria de proteínas animales y vegetales como secuencias inactivas de aminoácidos. Estos péptidos usualmente consisten en secuencias de 3–20 aminoácidos y pueden ser liberados por fermentación, a través de hidrólisis por microorganismos proteolíticos o a través de la acción de enzimas proteolíticas derivadas de microorganismos o

plantas, el procesamiento de alimentos, proteólisis catalizada por enzimas digestivas *in vitro* o *in vivo* y por métodos químicos, es decir, por tratamiento con ácidos o bases (Korhonen y col 1998; Hartmann y Meisel 2007; Aluko 2008a; Möller y col 2008, Segura-Campos y col 2010). En la mayoría de los casos, estos hidrolizados proteínicos y péptidos han demostrado mejor bioactividad comparada con sus proteínas de procedencia, lo que muestra que la hidrólisis de los enlaces peptídicos es importante en la liberación de péptidos potentes (Udenigwe y Aluko 2011).

Varios factores afectan las propiedades bioactivas de los péptidos, incluyendo las enzimas utilizadas para la hidrólisis, las condiciones de procesamiento, y el tamaño de los péptidos resultantes, lo cual afecta enormemente su absorción a través de los enterocitos y la biodisponibilidad en tejidos diana.

En comparación a las enzimas digestivas, las enzimas microbianas, ya sea en el intestino o en los alimentos, utilizan diferentes sitios activos, por lo que los péptidos liberados por esas enzimas pueden diferir de los liberados por enzimas digestivas. Estos péptidos también podrían ser precursores de péptidos liberados en el tracto intestinal (Möller y col 2011). Por ejemplo, Yamamoto (1997) no encontró efecto antihipertensivo de caseína digerida por tripsina; sin embargo, la secuencia KVLVPVQ fue liberada tras digestión con una proteinasa extracelular de *L. helveticus*, con débil actividad antihipertensiva ($IC_{50} > 1,000 \mu M$), la cual se vio aumentada ($IC_{50}: 5 \mu M$) tras digestión pancreática, donde se liberó el péptido (KVLVPV).

3. Absorción de péptidos durante la digestión gastrointestinal

Los factores principales que afectan la absorción de los péptidos son las diferencias metabólicas, anatómicas, fisiológicas y bioquímicas del tracto gastrointestinal, la actividad enzimática del mismo, la poca permeabilidad de los biopéptidos al cruzar las membranas biológicas, así como su naturaleza hidrofílica y tamaño molecular (Lee 2002). Sin embargo, algunos fragmentos son parcialmente resistentes a la hidrólisis y logran de ser absorbidos en cantidades fisiológicamente activas y llegar intactos a la circulación sanguínea (Robert y Zaloga 1994). De este modo, los péptidos sólo pueden ejercer su actividad biológica si logran atravesar las barreras potenciales de activación o inactivación (Yamamoto y col 1999).

La mayoría de los péptidos bioactivos no son absorbidos en el tracto intestinal, sino que actúan directamente en el tracto intestinal o via receptores y comunicación celular en el sistema digestivo. Los biopéptidos pueden ser liberados de las proteínas alimenticias a través del intestino, exhibiendo éstos su bioactividad en los intestinos delgado y grueso. No obstante, como la mayoría de las proteínas alimenticias son degradadas durante el tránsito a través del intestino delgado y dado que la actividad microbiana ocurre principalmente en el intestino grueso, la liberación de biopéptidos durante la digestión es conferida a las proteínas que logran alcanzar este sitio (Ross y col 1995; Drescher y col 1999).

La primera barrera enzimática para los péptidos es el lumen del intestino delgado, que contiene una gran cantidad de proteasas pancreáticas, principalmente tripsina, elastasa y quimiotripsina junto con exopeptidasas como la carboxipeptidasa A y B, y proteasas de células de la mucosa. En la segunda barrera los oligopéptidos producidos por acción de las enzimas gástricas y pancreáticas son hidrolizados por

proteasas de la membrana intestinal de borde en cepillo de las células epiteliales, generando dipéptidos y tripéptidos. Tales proteasas contienen al menos quince peptidasas que en conjunto tienen una amplia especificidad pudiendo degradar tanto proteínas como péptidos (Lee 2002).

Los péptidos no digeridos y/o no absorbidos en el intestino delgado entran al intestino grueso a través de la válvula ileocecal donde pueden ser metabolizados por la microbiota intestinal, ejercer una función local como relajantes de la mucosa gástrica o inhibidores de la secreción de enzimas, o si su acción es sistémica deben atravesar el epitelio y pasar al torrente circulatorio (Arhewoh y col 2005).

El proceso de permeación puede ser mediado a través de transportadores peptídicos específicos. Dichos transportadores permite la absorción de dipéptidos y tripéptidos de manera intacta a través de la membrana intestinal (Sataka y col 2002).

La simulación *in vitro* de la digestión fisiológica con proteasas gastrointestinales es una herramienta muy útil para evaluar la estabilidad de los biopéptidos frente a las enzimas digestivas (Cornish y col 2006). De esta manera se emula en dos etapas el proceso de digestión que tiene lugar en el organismo, efectuando en primer lugar una hidrólisis con pepsina a pH ácido y a continuación una digestión con extracto pancreático a pH básico (Cross y Gill 2000). La resistencia de algunos péptidos a las barreras enzimáticas depende en parte de su composición aminoacídica. De esta manera, péptidos con residuos de prolina e hidroxiprolina aislados de la caseína y la gelatina han resistido la degradación de las enzimas digestivas (Crouch y col 1992). A veces, durante el tránsito gastrointestinal, las enzimas digestivas liberan péptidos de su posición encriptada, incrementando su actividad biológica.

4. Efectos metabólicos

Se han atribuido diferentes efectos a la salud a los péptidos derivados de alimentos, incluyendo propiedades opiodes, antimicrobianas, inmunomoduladoras, citomoduladoras, antitrombóticas, de incremento de la absorción o biodisponibilidad de metales, hipocolesterolémicas, antioxidantes y antihipertensiva (inhibitoria de ECA). Además, algunos péptidos son multifuncionales y pueden desempeñar más de uno de los efectos mencionados (Meisel 2004).

1) Péptidos opiodes

Péptidos con actividad opioide fueron encontrados en los años 1970s (Zidrou y col 1979) y se les denominó “exorfinas” en base a su estructura similar a ligandos endógenos (endorfinas y enkefalinas), que interactúan con receptores opiodes (Clare y Swaisgood 2000).

Los péptidos opiodes son ligandos de receptores de opiodes con actividad agonista o antagonista. Los receptores de opiodes se encuentran en el sistema nervioso, endócrino e inmune, así como en el tracto gastrointestinal de mamíferos, y pueden interactuar con sus ligandos endógenos, con opiodes exógenos y con antagonistas de opiodes. Así, los péptidos opiodes administrados de manera oral pueden modular los procesos de absorción en el intestino e influir en la función gastrointestinal ya sea afectando los músculos suaves, lo que reduce el tiempo de tránsito y/o afectando el transporte intestinal de electrolitos, lo que explica sus propiedades anti-secretorias (Korhonen y Pihlanto 2006).

La estructura común exhibida por los ligandos endógenos y exógenos es un residuo N-terminal de tirosina (excepto en opiodes de α -caseína) y la presencia de

otro residuo aromático en la tercera o cuarta posición desde el extremo N-terminal (Phe o Tyr). Además, un residuo de prolina en la segunda posición es crucial para la orientación tridimensional de las cadenas laterales de tirosina y fenilalanina. La actividad agonista es comparable a la de los ligandos endógenos, mientras que los péptidos antagonistas ejercen efectos inhibidores similares a la naloxona, un antagonista del receptor opiáceo potente que se aplica como un medicamento (Clare y Swaisgood 2000).

2) Péptidos antimicrobianos

Se han identificado péptidos antimicrobianos de muchos hidrolizados de proteínas, especialmente de la leche. Las más estudiadas son las lactoferrinas, derivadas de bovinos y la lactoferrina humana (Kitts y Weiler 2003). Se ha observado que la lactoferrina, así como los péptidos liberados de lactoferrina por digestión con pepsina o por tratamiento térmico a pH ácido, previenen el crecimiento microbiano, y se ha asumido que este efecto se debe a su capacidad para unirse al hierro y privando de este mineral a los microorganismos (Bullen y col 1972; Tomita y col 1991; Saito y col 1994). La disrupción de la permeabilidad normal de la membrana es parcialmente responsable del mecanismo antibacteriano de lactoferrinas (FitzGerald y Murray 2006).

Péptidos antifúngicos derivados del frijol común han exhibido un efecto inhibitorio sobre un número de patógenos para plantas tales como *Mycosphaerella arachidicola*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahlia* y *Setosphaeria turcica*, así como para hongos que pueden ser patógenos para humanos tales como *Helminthosporiummaydis*, *Fusarium oxysporuma* y *Candida albicans*. Se ha descrito actividad antifúngica de

péptidos de frijol común, los cuales inducen cambios morfológicos en las hifas (Chan y col 2012), disrupción de la membrana celular (Chan y col 2013), permeabilización de membrana (Lam y Ng 2013; Wong y col 2012) e inducción de la acumulación de quitina en las puntas de las hifas (Lin y col 2010).

3) Péptidos inmunomoduladores y citomoduladores

La inmodulación es la manipulación del sistema inmune mediante el incremento (inmunoestimulación) o disminución (inmunosupresión) de la magnitud de la respuesta inmune (García y col 2013).

Los péptidos inmunomoduladores pueden mejorar las funciones celulares inmunes, medidas como la proliferación de linfocitos, actividad autolítica celular, síntesis de anticuerpos y regulación de citoquinas (FitzGerald y Murray 2006, Horiguchi y col 2008), así como reducir las reacciones alérgicas en los seres humanos atópicos y mejorar la inmunidad de la mucosa en el tracto gastrointestinal (Korhonen y Pihlanto 2003). Péptidos inmunomoduladores derivados de hidrolizados de proteínas de arroz y soya actúan para estimular aniones superóxido, que desencadenan los sistemas de defensa inmunológicos no específicos (Kitts y Weiler 2003).

El péptido Met-Ile-Thr-Leu-Ala-Ile-Phe-Val-Asn-Lys-Phe-Gly-Arg, es un péptido de la soya derivado de la subunidad α de la β -conglucina, que es liberado mediante la digestión con tripsina de las proteínas de la soya. Este péptido tiene un sitio de unión específico en las células fagocíticas de la sangre humana que estimulan la muerte bacteriana por fagocitosis (Domínguez-Vega y col 2011).

4) Péptidos antitrombóticos

Se han identificado secuencias de péptidos que inhiben la agregación de plaquetas de la sangre y la unión del fibrinógeno humano a los receptores de fibrinógeno en la superficie de las plaquetas; éstos están codificados dentro de la secuencia de un glicomacropéptido, que se libera a través de la escisión de la caseína κ por la renina (Fiat y col 1993).

A los péptidos derivados de la caseína y bovina con un efecto sobre la coagulación de las plaquetas se les conoce como casoplatelinas. Se ha informado que un gran número de casoplatelinas tienen una actividad antitrombótica *in vitro* (Jolles y col 1986) y en cerdos de guinea después de la administración parenteral (Bal dit Sollier y col 1996). KRDS, un análogo de péptido (f39-42) a partir de la lactoferrina humana, inhibe la agregación plaquetaria inducida por ADP después de la administración parenteral (Jolles y col 1993)

Dos péptidos (Asp-Glu Glu y Ser-Ser-Gly-Glu) se han purificado e identificado como inhibidores de la agregación plaquetaria en los hidrolizados de proteínas de soya fabricados por sucesivas digestiones enzimáticas con endopeptidasas y exopeptidasas (Lee y Kim 2005).

5) Péptidos que enlazan metales

Una alta cantidad de calcio soluble o disponible en el intestino contribuye a mejorar la mineralización de los huesos y de este modo a prevenir la osteoporosis (Möller y col 2011). La caseína de la leche estabiliza a los iones calcio y fosfato. La digestión con tripsina de las proteínas genera caseinfosfopéptidos (CFPs) de la región N terminal polar, que contiene residuos serilo fosforilados (Cross y col 2005).

Se ha hipotetizado que tales residuos son responsables de la interacción de las caseínas y el fosfato, a través de la formación de complejos, que conlleva a la formación de micelas de caseína, incrementando su biodisponibilidad. Como los CFPs pueden unir y solubilizar minerales, han sido considerados fisiológicamente benéficos en la prevención de osteoporosis, caries dentales, hipertensión y anemia. (FitzGerald 1998).

6) Péptidos hipocolesterolémicos

La enzima triacilglicerol lipasa (EC 3.1.1.3) y su cofactor colipasa son esenciales para la escisión de triglicéridos de la dieta y la posterior absorción de los ácidos grasos en el tracto intestinal. La inhibición de la lipasa ha demostrado reducir los triglicéridos postprandiales y LDL en ayunas, para acelerar la reducción de peso, para mejorar el control metabólico en la diabetes tipo 2, y para prevenir la diabetes tipo 2 (Drent y col 1995; Hollander y col 1998).

Se han reportado efectos hipocolesterolémicos para péptidos derivados de caseína y de suero, así como para los péptidos de proteína de soya (parcialmente unidos a fosfolípidos) (Junfeng y col 2003). Las propiedades hipocolesterolémicas de la soya han sido evaluadas por numerosos estudios clínicos. Este efecto es mayor con hidrolizados de soya que con proteínas de soya no hidrolizadas (Sugano y col 1988). La digestión trípica de la fracción de glicina de la soya ha permitido el aislamiento del péptido Leu-Pro-Tyr-Pro, que mostró alta actividad hipocolesterolémica. Además de la hidrólisis, los productos de soya fermentados como el tofoyu también han demostrado efectos hipocolesterolémicos (Kuba y col 2004). Muy recientemente, el grupo de Zhang y col (2012) investigó el potencial de

proteínas de salvado del arroz hidrolizadas para reducir el colesterol. Ellos hidrolizaron el salvado de arroz con diferentes proteasas (alcalasa, neutrasa, papaína y tripsina) y observaron la actividad más alta en los hidrolizados con alcalasa.

7) Péptidos antioxidantes

Los métodos más habituales para la obtención de péptidos antioxidantes es la hidrólisis enzimática, siendo alcalasa la enzima más empleada (Korhonen y Pihlanto 2006).

Los péptidos antioxidantes suelen presentar una gran cantidad de aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr, Phe) y aminoácidos básicos (His, Arg) en la secuencia formada después de la hidrólisis, ya que los grupos fenólicos, indol e imidazol presentes en los residuos de aminoácidos antes mencionados, actúan como donadores de protones a los radicales con deficiencia, para mantener la estabilidad molecular (Sarmadi e Ismail 2010). Se ha demostrado que los péptidos antioxidantes pueden contener residuos de aminoácidos hidrófobos tales como Val, Leu, Ile o Ala en el extremo N-terminal; por lo que la presencia de estos aminoácidos en la secuencia de los hidrolizados contribuye a esta actividad (Guo y col 2009). Sobre la posición de los aminoácidos en la cadena peptídica, los aminoácidos valina y leucina poseen mayor AAox cuando se encuentran en posición N-terminal, así como triptófano y tirosina en posición C-terminal (Medina-Godoy y col 2012).

Se han encontrado propiedades antioxidantes que previenen la peroxidación enzimática (lipoxigenasa) y no enzimática de los ácidos grasos esenciales en los péptidos liberados de caseínas en la hidrólisis por enzimas digestivas y en la

fermentación de la leche con cepas proteolíticas de bacterias ácido-lácticas (Korhonen y Pihlanto 2003).

8) Péptidos antihipertensivos

La enzima convertidora de angiotensina I (ECA, hidrolasa peptidil dipeptidido, EC 3.4.15.1) se ha asociado con el sistema renina-angiotensina, que regula la presión sanguínea periférica. La inhibición de esta enzima puede ejercer un efecto antihipertensivo. Un gran número de péptidos inhibidores de la ECA se han aislado a partir de la digestión enzimática de diversas proteínas y son, en la actualidad, el grupo más estudiado de los péptidos bioactivos (Korhonen y Pihlanto 2006).

Para ejercer un efecto antihipertensivo después de la ingestión oral, los péptidos activos deben ser absorbidos de forma intacta en el intestino y además ser resistentes a la degradación por peptidasas plasmáticas con el fin de llegar a los sitios diana. La digestión gastrointestinal usualmente se simula por digestión secuencial de las proteínas con pepsina (pH 2, 37°C) y pancreatina (pH 7.5, 37 °C) y, en algunas ocasiones, también se realiza la digestión con quimotripsina y tripsina (pH 6.5-6.8, 37°C) (García y col 2013).

Los péptidos inhibidores de ECA poseen algunas características relevantes para la inhibición, tales como una secuencia corta de 2 a 12 aminoácidos, además de contener aminoácidos hidrofóbicos en la posición C-terminal (Norris y FitzGerald 2013); los péptidos que contienen prolina son generalmente resistentes a la degradación por las enzimas digestivas (Korhonen y Pihlanto 2006).

El garbanzo (*Cicer arietinum*) (Pedroche y col 2002; Yust y col 2003; Barbana y Boye 2010; Medina-Godoy y col 2012), chícharo (*Pisum sativum*) (Barbana y Boye

2010; Segura-Campos y col 2011), frijol común (*P. vulgaris*) (Torruco-Uco y col 2009; Rui y Barbana 2012; Rui y col 2012; Ruiz-Ruiz y col 2013a, b), entre otros, han producido hidrolizados inhibidores de ECA. Hidrolizados de la misma fuente pueden presentar diferentes péptidos inhibidores de ECA dependiendo de la enzima utilizada, la relación enzima:sustrato y el tiempo de hidrólisis (López-Barrios y col 2014).

Además de la inhibición de la ECA, los péptidos pueden ejercer efectos antihipertensivos también a través de otros mecanismos, tales como la estimulación de la actividad de la bradiquinina (Perpetuo y col 2003), la mejora de la producción de óxido nítrico derivado del endotelio (Sipola y col 2002), la mejora de la acción vasodilatadora de la unión a los receptores de opiáceos (Nurminen y col 2000) y la inhibición de la liberación de endotelina-1 por las células endoteliales (Maes y col 2004). La endotelina es un vasoconstrictor incluso más fuerte que la angiotensina II. La enzima convertidora de endotelina (ECE, EC 3.4.24.71) unida a la membrana convierte el precursor de endotelina en la endotelina activa. Por lo tanto, la inhibición de la ECE conlleva a una disminución de la presión arterial. Maes y col (2004) utilizaron la endotelina-1 (ET-1), liberada de las células endoteliales, para evaluar la actividad de péptidos antihipertensivos en un enfoque más global al complejo de vasoregulación. Okitsu y col (1995) investigaron las propiedades inhibidoras de la ECE de bonito y de carne de res digeridas con pepsina, y hallaron 40 y el 45% de inhibición de la enzima, respectivamente.

D. ESTRÉS OXIDATIVO

1. Estrés oxidativo

Bajo concentraciones fisiológicas, las especies reactivas de oxígeno (ERO) actúan como moléculas mediadoras de señalización, crecimiento celular, migración y diferenciación (Valko y col 2006), generándose a partir de procesos fisiológicos para producir energía y metabolitos, o para generar defensas contra los microorganismos invasores (Cornelli 2009). El estrés oxidativo surge cuando la producción de especies reactivas sobrepasa las defensas intrínsecas antioxidantes o por un aumento de los procesos oxidativos en el cuerpo (Burton y Jauniaux 2011; Vetrani y col 2013), induciendo muerte celular, apoptosis y senescencia (Chandra y col 2000). Los efectos dañinos de las ERO son balanceados por la acción de antioxidantes no-enzimáticos en conjunto con enzimas antioxidantes (Halliwell 1996). El estrés oxidativo tiene que ser una condición temporal, porque si llega a ser permanente, puede determinar una enfermedad. Muchas enfermedades diferentes (tales como enfermedades cardiovasculares, cáncer, y trastornos neurológicos y endocrinos) se han relacionado con el estrés oxidativo (Cornelli 2009). Una mala nutrición (ingesta insuficiente de α -tocoferol, ácido ascórbico, aminoácidos azufrados, entre otros) puede generar estrés oxidativo (Abilés 2007).

2. Radicales libres

Los radicales libres se definen como especies que contienen uno o más electrones no apareados, y es esta capa incompleta de electrones la que confiere su alta reactividad. Los radicales libres pueden generarse a partir de muchos elementos,

pero los sistemas biológicos que implican oxígeno y nitrógeno son los más importantes (Burton y Jauniaux 2011).

La célula viva está constantemente expuesta a especies de radicales libres potencialmente dañinos, cuyo origen puede ser intracelular, tales como las derivadas de metabolismo celular normal, o extracelular, producida como consecuencia, por ejemplo, de la exposición a la radiación ultravioleta, o las radiaciones ionizantes. De particular interés son las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Evans y col 2003).

3. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las especies reactivas de oxígeno juegan papeles importantes como segundos mensajeros en muchas cascadas de señalización intracelulares destinadas a mantener la célula en la homeostasis con su entorno inmediato. En niveles más altos, pueden causar daño indiscriminado a las moléculas biológicas, lo que lleva a la pérdida de la función e incluso a la muerte celular (Burton y Jauniaux 2011).

En condiciones fisiológicas, el radical libre de oxígeno más común es el anión superóxido (O_2^\bullet), y las mitocondrias se consideran la fuente principal (Cadenas y Davies 2000), debido a fugas de electrones de oxígeno molecular, en particular de los complejos I y III, que se traducen en la formación de O_2^\bullet . Del mismo modo, el superóxido también puede ser generado a través de la fuga de electrones de la cadena de transporte de electrones dentro del retículo endoplásmico (Tu y Weissman 2004). La generación excesiva de superóxido también puede conducir a interacciones con el óxido nítrico (NO^\bullet) para formar peroxinitrito ($ONOO^\bullet$), un potente pro-oxidante (Pacher y col 2007). Otras especies reactivas de oxígeno incluyen el

radical hidróxilo ($\text{OH}\cdot$), el oxígeno singulete ($\text{O}\cdot$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Evans y col 2003).

4. Daño por ROS a biomoléculas

Los daños ocasionados por los radicales libres al ADN, proteínas y lípidos se han relacionado con el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas (Morrow 2005; Stephens y col 2009). A continuación se describen los daños causados por estrés oxidativo a estas biomoléculas.

a. Lípidos

Los radicales hidroxilo son capaces de causar la peroxidación lipídica en la membrana plasmática o en cualquier orgánulo que contenga grandes cantidades de cadenas laterales de ácidos grasos poliinsaturados. Mediante la abstracción de hidrógeno de la cadena lateral de hidrocarburo de un ácido graso, se genera un radical. Si el oxígeno está presente, éste puede reaccionar para formar un radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), que a su vez es capaz de abstraer hidrógeno a partir de un ácido graso adyacente, por lo que la reacción se propaga (Burton y Jauniaux 2011).

Una vez formados los radicales peroxilo, éstos se pueden reorganizar a través de una reacción de ciclación a endoperóxidos, siendo el producto final del proceso de peroxidación el malondialdehído (Marnett 1999). Además del malondialdehído, otro producto importante de la peroxidación de lípidos es el 4-hidroxi-2-nonenal. El malondialdehído es mutagénico en células bacterianas y de mamíferos, y cancerígeno en ratas. El hidroxinonenal es débilmente mutagénico pero parece ser el producto tóxico importante de la peroxidación lipídica. Además, el hidroxinonenal tiene poderosos efectos sobre las vías de transducción de señales, que a su vez

tienen un efecto importante en las características fenotípicas de las células (Valko y col 2006).

b. Proteínas

Las reacciones con radicales hidroxilo conducen a la abstracción de un átomo de hidrógeno de la cadena principal del polipéptido de proteína para formar un radical centrado en el carbono, que en condiciones aeróbicas reacciona fácilmente con dióxígeno para formar radicales peroxilo (Stadtman 1992). Prolina, arginina, lisina y treonina son particularmente vulnerables al ataque (Dalle-Donne y col 2003). Los radicales peroxilo se convierten luego en peróxidos de alquilo por reacción con la forma protonada de superóxido.

Los daños catalizados por metales a las proteínas implican la escisión oxidativa, la pérdida de residuos de histidina, reticulaciones de tirosina, la introducción de grupos carbonilo, y la formación de radicales alquilo $R\bullet$, alcoxilo, $RO\bullet$, y alquilperoxil, $ROO\bullet$, (Davies 1987; Davies y Delsignore 1987; Davies y Lin 1987; Davies y col 1987; Stadtman 1990). Los derivados de radicales alcoxilo de proteínas son capaces de experimentar escisión del enlace peptídico. La escisión del enlace peptídico también puede producirse por un ataque iniciado por radicales de hidroxilo de los residuos de ácido glutámico y prolina de proteínas para formar una mezcla de diversos productos. Se ha reportado evidencia de que dos proteínas mitocondriales (aconitasa y nucleótidos de adenina – translocasa) pueden ser objetivos importantes de daño oxidativo a largo plazo (Stadtman 2004). La abstracción de iones de hidrógeno del grupo tiol de la cisteína puede conducir a la formación de enlaces disulfuro y el plegamiento anormal de proteínas, que puede conducir a la pérdida de

la función, a la agregación de proteínas y a la muerte celular (Burton y Jauniaux 2011).

c. Ácido desoxirribonucleico (ADN)

Se sabe que el radical hidroxilo reacciona con todos los componentes de la molécula de ADN: daña tanto a bases de purina como de pirimidina y también la columna vertebral de desoxirribosa (Dizdaroglu y col 2002). 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 (Halliwell y Gutteridge 1999). La modificación permanente del material genético resultante del daño oxidativo representa el primer paso en la mutagénesis, carcinogénesis y el envejecimiento.

El ADN mitocondrial es particularmente vulnerable a los ataques debido a su proximidad al lugar de generación de O_2 de la cadena de transporte de electrones, la falta de protección de las histonas y los mecanismos mínimos de reparación que existen. En consecuencia, los daños en el ADN mitocondrial son extensos incluso en condiciones normales. Como el ADN mitocondrial codifica varias proteínas, incluyendo enzimas de la cadena de transporte de electrones, las mutaciones pueden conducir a impedimentos en la producción de energía y el riesgo de nuevos escapes de electrones, lo que agrava la tensión inicial (Richter y col 1988).

E. RELACIÓN ENTRE DIETA Y ENFERMEDAD

La composición de la dieta puede influir tanto en la intensidad del daño oxidativo como en los mecanismos antioxidantes, lo que explica en parte la relación existente entre la dieta y algunas enfermedades crónicas (Pérez y col 2002). De acuerdo a la

OMS (1990), las investigaciones epidemiológicas han demostrado que existe una relación estrecha y sistemática entre el establecimiento de dietas con exceso de alimentos de gran densidad energética, ricos en grasas y azúcares simples refinados y con una deficiencia de carbohidratos complejos, y la aparición de una serie de enfermedades crónicas no infecciosas. La ingestión excesiva de grasas saturadas y las concentraciones elevadas de colesterol en la sangre están asociadas con la cardiopatía coronaria, la enfermedad cardiovascular más frecuente en los países desarrollados. El principal factor de riesgo de apoplejía, el trastorno cardiovascular más importante en muchos países en desarrollo, es la hipertensión arterial, en la cual desempeñan una función coadyuvante la obesidad, la ingesta de alcohol y la ingestión excesiva de sal. La obesidad también se vincula con la aparición de diabetes. Se ha estimado que alrededor de un tercio de los cánceres se relacionan con factores de la dieta, por ejemplo, la vinculación de la ingesta excesiva de grasas con mayor incidencia de cáncer de mama y de colon. También las caries dentales, trastornos gastrointestinales, osteopatías y artropatías, se relacionan con el tipo de dieta que lleva a cabo un individuo.

F. HIPERTENSIÓN

1. Generalidades

La presión arterial es el resultado de la cantidad de sangre que bombea el corazón por minuto y la resistencia con la que circula, dada por el tamaño de los vasos sanguíneos (Weber 2007). La presión sistólica se define como la fuerza de la sangre en las arterias mientras el corazón se contrae (late) bombeando sangre al organismo, mientras que la presión diastólica se refiere a la fuerza de la sangre en

las arterias cuando el corazón se relaja, es decir, cuando se llena de sangre entre medio de los latidos (ASH 2010). En condiciones basales, el corazón bombea de 5 a 8 litros de sangre por minuto y la presión es de 120/80 mmHg, lo que significa que el corazón ejerce una presión máxima de 120 mmHg durante la fase sistólica, mientras que durante la fase diastólica sólo ejerce una presión de 80 mmHg (Firman 2004).

La HTA sistémica se trata de un aumento anormal de la presión de la sangre en la circulación, la cual se ha considerado como un síndrome cardiovascular progresivo que se ha asociado con anormalidades cardiovasculares de naturaleza funcional y estructural, que resultan en el daño de órganos diana como corazón, riñones y cerebro, hasta ocasionar una muerte prematura (Cervera y Ortiz 2004; Firman 2004; Venkata y Ram 2007).

2. Prevalencia de la hipertensión arterial

La hipertensión arterial se ha considerado el trastorno de salud más extendido en el mundo, identificándose como factor de riesgo mayor para diversas enfermedades cardiacas y vasculares (Leyva y col 2000). Según la OMS, el 51% de los accidentes cerebrovasculares y 45% de las cardiopatías se deben a una presión arterial alta (OMS, 2012). Un total de 7.5 millones de personas mueren al año debido a la hipertensión arterial, representando un 12.8% del total de defunciones (OMS, 2013).

Las enfermedades isquémicas del corazón son la primera causa de muerte en la región de América. La prevalencia de HTA en Mexico se encuentra entre las más elevadas en el plano mundial (Kearney y col 2004). La Encuesta Nacional de Salud y

Nutrición (ENSANUT) del año 2012 reporta una prevalencia de HTA en México de 31.5%, de los cuales 47.3% desconocía su padecimiento.

El norte del país presenta una prevalencia más elevada de HTA en su población adulta (36.4%) en comparación al sur (28.5%). En Sinaloa, esta condición ha aumentado en proporción a través de los años: en el año 1993 se contaba con un 10.1% de sinaloenses hipertensos, cifra que aumentó a 12.5% en el año 2000, a 15.4% en el año 2006 y a 37.8% en el año 2012 (Olaíz-Fernández y col 2006; Pacheco-Ureña y col 2012).

3. Mecanismos de la hipertensión

El sistema renina-angiotensina es un poderoso mecanismo para controlar la presión arterial. Cuando la presión arterial disminuye, los riñones se someten a varias reacciones intrínsecas de conversión de prorenina a renina. La glucoproteína angiotensinógeno es segregada por el hígado al torrente sanguíneo, así es que cuando la renina entra al torrente sanguíneo, ésta hidroliza al angiotensinógeno liberando un decapeptido llamado angiotensina I (Chen y col 2009). La enzima convertidora de angiotensina I (ECA: EC 3.4.15.1) es una hidrolasa dipeptidil-dicarboxilasa que utiliza Zn^{2+} y Cl^- como cofactores. Esta actúa sobre la angiotensina I, un decapeptido inactivo, hidrolizando His-Leu desde su extremo C-terminal, produciendo al octapeptido angiotensina II, un potente vasoconstrictor y retenedor de sal (Pihlanto y Mäkinen 2013). Cuando la angiotensina I circula a los pequeños vasos de los pulmones, de inmediato es hidrolizada por ECA, la cual se encuentra anclada a la membrana de las células endoteliales de la red pulmonar a través del C-terminal (Zimmerman 1997; Candido y col 2004).

Al hidrolizarse la angiotensina I por acción de la ECA, se forma angiotensina II, que eleva la presión sanguínea mediante la severa constricción de los vasos sanguíneos. Finalmente, la angiotensina II provoca que las glándulas suprarrenales liberen aldosterona, lo que aumenta la absorción de sales y agua en el riñón, conduciendo a un aumento en el volumen de líquido extracelular y por lo tanto al aumento de la presión arterial (Chen y col 2009). Por lo tanto, la inhibición la ECA tiene un efecto hipotensivo (Pihlanto y Mäkinen 2013).

La acción de la ECA no es tan específica como la de la renina, por lo que es capaz de degradar otros péptidos pequeños, como es el caso de la bradiquinina, un potente vasodilatador que regula diversos procesos biológicos, incluyendo la liberación de óxido nítrico endotelial, un vasodilatador arterial que aumenta el flujo sanguíneo renal, con la consiguiente caída en la presión arterial. Al inhibir a la ECA no sólo disminuye la formación de angiotensina II, sino que también aumenta la bradiquinina disponible, reduciendo la presión sanguínea (Zimmerman 1997; Candido y col 2004; Chen y col 2009).

a. Enzima convertidora de angiotensina I (ECA)

La enzima convertidora de angiotensina ECA (EC 3.4.15.1) es una glicoproteína monomérica que se encuentra distribuida en varios tejidos y fluidos biológicos (Riordan 2003). Esta es una proteína integral de membrana tipo I, pero también puede ser liberada como enzima soluble hacia fluidos extracelulares como el plasma y fluidos seminales y cerebroespinales (Balyasnikova y col 2002; Hooper y Turner 2003; Parkin y col 2004).

Posee un dominio citoplasmático C-terminal hidrofílico de 28 residuos, un dominio transmembrana hidrófobo de 22 residuos que ancla la proteína en la membrana y un ectodominio N-terminal que está fuertemente glicosilado con manosa, galactosa, fructosa, ácido N-acetilneuramínico y N-acetilglucosamina (Murray y FitzGerald 2007). El ectodominio de ACE se divide a su vez en dos dominios similares (dominio N y dominio C); cada dominio contiene una secuencia activa His-Glu-XX-His (HEXXH) (Riordan 2003).

El dominio C tiene una preponderancia de α -hélices con un ión zinc y dos iones cloruro incorporado. Un canal profundo y estrecho separa la molécula en dos subdominios, encontrándose el sitio activo hacia la parte inferior de este canal. Un "tapa" N-terminal en la parte superior de la molécula parece permitir el acceso a la hendidura del sitio activo sólo a sustratos peptídicos pequeños (Natesh y col 2003).

Los dos residuos de histidina del motivo funcional HEXXH y el glutamato posicionado 23-24 residuos más hacia el C-terminal son los ligandos para el cofactor zinc (Coates 2003). Una molécula de agua activada acomplejada con Zn^{2+} sirve como nucleófilo para atacar el grupo carbonilo del enlace peptídico (Lew 2004).

La actividad de la ECA también es cloruro-dependiente. El cloruro activa los sitios activos de la ECA y mejora la unión de sustratos (Riordan 2003). Cada dominio activo de la ECA muestra diferencias en la sensibilidad a la activación por cloruro (Wei y col 1991). Se sabe que la activación del dominio N requiere concentraciones bajas de cloruro y sólo un anión se une al dominio N, mientras que en el dominio C se unen dos cloruros, siendo este dominio inactivo en ausencia de tal anión, por lo que la actividad de este dominio depende en gran medida de la concentración de ion cloruro (Jaspard y col 1993; Araujo y col 2000).

Los dos dominios activos de la ECA también son ligeramente diferentes en la especificidad de sustrato. Hidrolizan la bradiquinina casi por igual, pero el sitio activo del dominio C puede hidrolizar Ang I (Jaspard y col 1993) e Hipuril-His-Leu (Corradi y col 2007) de manera más eficiente. Esta diferencia en la especificidad catalítica podría deberse a una variación sutil en la especificidad de sustrato de aminoácidos (Araujo y col 2000) y a una alteración conformacional de los sitios activos inducida por el cloruro (Jaspard y col 1993).

4. Estrategias contra la hipertensión

Si la tensión arterial sólo es un poco alta (120/80 a 140/90), podrá controlarse mediante unos sencillos cambios de estilo de vida, como cambiar la alimentación o hacer ejercicio regularmente, mantener un peso corporal sano y no fumar. Si la tensión arterial es moderadamente elevada o muy alta (140/90 y más alta), el tratamiento consiste en la toma de medicamentos antihipertensivos (NHS Choices 2008) (**Figura 2**).

a. Medicamentos comercialmente disponibles

Comercialmente se pueden encontrar diversos medicamentos para el control de la hipertensión arterial, como los inhibidores de la enzima de la conversión de la angiotensina (ECA), tales como el captopril, benazepril, enalapril y el lisinapril; los bloqueadores del receptor de la angiotensina II, como el candesartán, eprosartán e irbersartán; los inhibidores directos de la renina, como el aliskirén; los bloqueadores de los canales de calcio, como propranolol, nadolol y metoprolol, que actúan relajando los músculos que forman las paredes de las arterias, haciendo que se dilaten, disminuyendo la tensión arterial; así como los diuréticos tiazidas, de asa

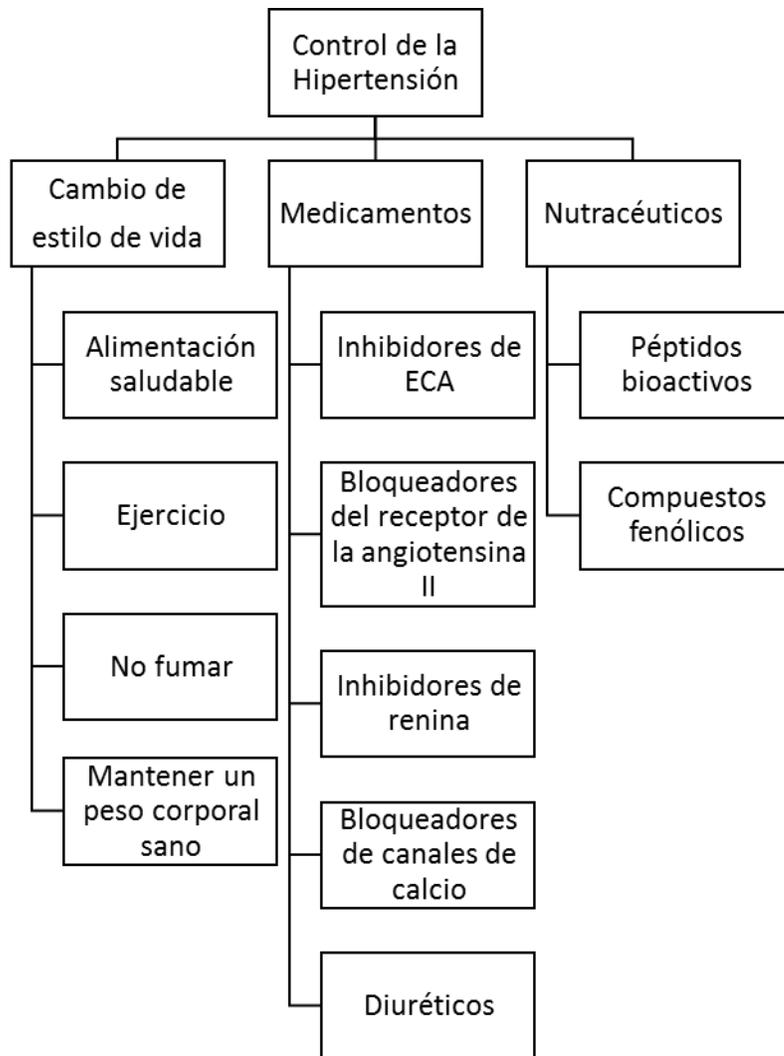


Figura 2. Control de la hipertensión. (Wagner y col 1991; Actis-Goretta y col 2003; Kozuma y col 2005; Erdmann y col 2008; NHS Choices 2008; AHRQ 2011).

(furosemida, bumetanida, torasemida y ácido etacrínico), ahorradores de potasio (amilorida y triamtereno) y antagonistas de aldosterona (espironolactona), actúan reduciendo la cantidad de agua y sal del organismo y dilatando las paredes de las arterias (NHS Choices 2008; AHRQ 2011). La utilización de inhibidores de la ECA sintéticos se considera un enfoque terapéutico importante en el tratamiento de la hipertensión arterial, aunque tales medicamentos pueden producir efectos secundarios como tos, molestias cutáneas y un descenso excesivo de la presión arterial. Además, el uso prolongado de muchos de estos medicamentos puede causar efectos secundarios, tales como un mal funcionamiento del sistema renal (Akillioglu y Karakaya 2009; Afonso y col 2013).

b. Biopéptidos con propiedades antihipertensivas

La secuencia de aminoácidos y la longitud de la cadena del péptido inhibidor afectan la eficacia de las propiedades antihipertensivas del péptido. La mayor parte de los péptidos inhibidores de ECA son péptidos cortos con 2 a 12 aminoácidos (Norris y FitzGerald 2013). Los péptidos más grandes (10-51 aminoácidos) se absorben fácilmente, sin embargo su potencial inhibidor de la ECA se reduce considerablemente (Roberts 1999).

Los aminoácidos hidrófobos, especialmente aquellos con cadenas alifáticas tales como Gly, Ile, Leu y Val son característicos para el extremo N-terminal de un péptido. Los aminoácidos con anillos cíclicos o aromáticos (Pro, Tyr, Trp) se encuentran en el extremo C-terminal de los inhibidores de la ECA (FitzGerald y col 2004; Vermeirssen y col 2004).

Prupp y col (2005) reportaron que, en general, un péptido altamente activo debe estar compuesto de aminoácidos grandes, hidrófobos, aromáticos con un grupo funcional polar en el C-terminal. La investigación realizada por Wu y col (2006a) llevó a establecer algunos atributos estructurales que caracterizan a di- y tripéptidos inhibidores de la ECA. Los dipéptidos estaban compuestos de aminoácidos con cadenas laterales voluminosas e hidrófobas. En el caso de tripéptidos, el primer residuo suele ser aromático, el segundo estar cargado positivamente, y el tercer residuo (C-terminal) ser hidrófobo. Los péptidos con cadenas más largas que aquellos contruidos a partir de 2 o 3 aminoácidos poseen aminoácidos básicos (Arg, Lys) en el extremo C.

La acción de inhibidores de la ECA requiere una interacción entre la molécula inhibidora y el sitio de unión aniónico, que difiere del sitio catalítico de la ECA (FitzGerald y col 2004). Wu y col (2006b) sistematizaron los requisitos estructurales para inhibidores de la ECA con una longitud de las cadenas que va desde 2 a 10 aminoácidos.

El aminoácido C-terminal determina la potencia de los péptidos inhibidores de la ECA compuestos por 4 a 10 residuos. En el caso de tetrapéptidos, los aminoácidos más favorables (empezando del C-terminal) son Tyr y Cys. Residuos como His, Trp y Met se encuentran generalmente en la segunda posición de un tetrapéptido. En la tercera posición de la cadena peptídica, se encuentra Ile, Leu, Val y Met, mientras que Trp se coloca como el cuarto residuo (Wu y otros 2006b). Algunas de las secuencias de inhibidores de la ECA poseen ácido glutámico en el extremo C. Esto se puede explicar por la capacidad del péptido para quelar zinc mediante el ácido glutámico, que es un componente del centro activo de ECA (Fitzgerald y col 2004).

c. Fitoquímicos con propiedades antihipertensivas

Entre los fitoquímicos contenidos en alimentos, los compuestos fenólicos han sido ampliamente investigados debido a sus diversos beneficios para la salud como antioxidantes, y para la prevención de la inflamación crónica, enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes (Acosta-Estrada y col 2014). El estrés oxidativo se ha asignado como un factor causante de la hipertensión por la disminución de la disponibilidad de óxido nítrico para la relajación del músculo liso (Berry y col 2001). La actividad antioxidante de compuestos fenólicos puede mejorar la función endotelial por la disminución de los aniones superóxido que reaccionan con el óxido nítrico, como se ha reportado en componentes del café como flavonoides y ácido clorogénico que demostraron poseer actividad antihipertensiva (Kozuma y col 2005). Un análisis cinético sugiere que los flavanoles y procianidinas compiten con el sustrato por los sitios activos de la ECA (Actis-Goretta y col 2003), generando complejos de quelatos de iones de zinc en el centro activo de la enzima que resulta en la inhibición de la actividad de la enzima (Wagner y col 1991).

Shukor y col (2013) estudiaron la actividad inhibidora de la ECA de 22 compuestos fenólicos y la relación estructura-actividad de éstos. Los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos mostraron un aumento significativo en la actividad inhibidora de ECA con el incremento de grupos hidroxilo. Además, observaron una reducción de la actividad inhibidora de ECA en presencia de grupos metoxi, lo cual se podría explicar por el impedimento estérico causado por esta estructura, lo que podría dificultar la unión al sitio activo de ECA. La presencia de ciertos grupos funcionales, tales como hidroxilo, carboxilo, y los grupos de ácido acrílico, que pueden actuar como aceptores o donadores de enlaces de hidrógeno,

parece aumentar la potencia para inhibir ECA. La mayoría de los ácidos fenólicos forma interacciones carga-carga con el ión zinc en el sitio activo de la ECA, vía el átomo de oxígeno en la molécula carboxilada. Estos compuestos hacen diferentes interacciones moleculares con los aminoácidos en el sitio activo de ECA, que da lugar a un complejo estable entre la molécula de ácido fenólico y ECA. Esta interacción con el ion zinc, estabilizado por interacciones con otros aminoácidos en el sitio activo, puede ser causante de la actividad inhibidora de ECA observada por los ácidos fenólicos.

Otros flavonoides (rutina), estilbenos (resveratrol), y los otros compuestos fenólicos (catecol y pirogalo) pueden inhibir la actividad de la ECA sólo mediante interacciones con los aminoácidos en el sitio activo. Se ha demostrado que la ECA puede escindir un sustrato sin la interacción entre el sustrato y zinc (Wang y col 2011). Otros compuestos fenólicos inhibieron la actividad de la ECA, pero no mostraron ninguna interacción con el zinc en el sitio activo. Por lo tanto, la actividad inhibidora de ECA puede ser debida a las interacciones establecidas a través de enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo y aminoácidos en el sitio activo, bloqueando la actividad catalítica de la ECA (Shukor y col 2013).

Guerrero y col (2012) evaluaron la inhibición de ECA *in vitro* en 17 flavonoides pertenecientes a cinco subtipos estructurales, con el fin de establecer bases estructurales de su bioactividad. Observaron que la presencia de un doble enlace C2-C3 parece ser esencial para que la molécula ejerza una actividad inhibitoria de ECA significativa. La distribución electrónica molecular conferida por este doble enlace podría permitir el mantenimiento de una conjugación estructural definitiva, desde el anillo B a los anillos A y C, en contraste con la estructura de flavanona, con

la que esta conjugación estructural definitiva no es posible. Además, el mantenimiento de una estructura casi plana desaparecería si este vínculo se saturara, produciendo una cadena de flavonoide con un ángulo obtuso, que variaría en el resto de los constituyentes de la molécula.

La presencia de varios grupos hidroxilo en los flavonoides parece ser importante para la inhibición de las metaloproteinasas de zinc (Parellada y col 1998). Además, la posición exacta de este grupo parece ser muy importante para la inhibición de la ECA. La hidroxilación en la posición 4 'del anillo B parece ser de especial relevancia, y, además, la presencia de un grupo catecol en el anillo B (3,4-dihidroxi) parece ser fundamental para lograr un aumento de la actividad inhibidora de la ECA (Guerrero y col 2012).

La ausencia del grupo carbonilo en C4 (anillo C) representa una importante reducción en la capacidad para inhibir la actividad de la ECA. Sin embargo, la desaparición del grupo carbonilo está acompañada simultáneamente por la desaparición del doble enlace C2 = C3. Este efecto quizás está relacionado con la pérdida de la estructura espacial planar (Navarro-Nuñez y col 2009; Sartor y col 2002).

G. IMPORTANCIA DEL GARBANZO EN LA ALIMENTACIÓN

1. Generalidades

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es una leguminosa que se cultiva principalmente en el oeste de Asia, Europa del Sur, Etiopía y el norte de África Central y Oriental (Ladizinsky y Adler 1976). La especie cultivada de garbanzo fue una de las primeras leguminosas en ser domesticadas en el viejo mundo (van der Maesen 1972). Muy

probablemente se originó en un área del actual sudeste de Turquía y áreas adyacentes de Siria (Singh 1997).

El garbanzo pertenece a la familia *FABACEAE*, subfamilia *Papilionaceae*, tribu *Cicereae* y género *Cicer*, el cual comprende 43 especies, 9 anuales y 34 perennes (Singh y Diwakar 1995; Taylor y Ford 2007).

Las semillas de garbanzo están compuestas por una cubierta o testa, dos cotiledones, y un embrión. La cubierta de la semilla se compone de dos capas, la testa exterior y el tegmen interior, y un hilio (hiliun) (Singh y Diwakar 1995). En base a su tamaño de semilla y color, el garbanzo cultivado es de dos tipos: macrosperma (tipo kabuli), de semillas redondas color crema, de más de 25 g; y microsperma (tipo desi) de semillas angulosas, pequeñas y color que varía desde crema, negro y marrón a verde (Cubero, 1975).

El garbanzo es la tercera leguminosa cosechada más importante mundialmente, con una producción global del 20% (Bibi y col 2007). En el año 2013, India ocupó el primer lugar en producción de garbanzo en el mundo, produciendo un total de 8,832,500 toneladas. México con una producción de 209,941 toneladas ocupó el octavo lugar (FAOSTAT, 2015), cosechando Sinaloa 122,246 toneladas, representando el 58.2% de la producción de garbanzo blanco para exportación, siendo el líder de producción de garbanzo en México (FAOSTAT 2013; SAGARPA-SIAP 2015).

2. Composición química

La composición química del garbanzo se muestra en el **Cuadro 3**. Es una buena fuente de carbohidratos y proteínas, constituyendo juntos cerca de 80% de su peso

Cuadro 3. Composición química del grano de garbanzo.

Parámetro	Tipo Desi		Tipo Kabuli	
	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.
Proteína ^a	16.70	30.57	12.60	29.00
Cenizas ^a	2.04	4.20	2.00	3.90
Lípidos ^a	2.90	7.42	3.40	8.83
Ac. Linoleico(18:2) ^d	45.95	61.50	16.40	70.40
Ac. Linolénico (18:3) ^d	2.16	4.80	0.30	3.30
Carbohidratos total ^a	50.64	64.90	54.27	70.90
Almidón ^b	32.00	56.30	30.00	57.20
Amilosa ^b	20.00	41.00	23.00	47.00
Azúcares solubles ^a	5.33	11.80	6.65	7.50
Azúcares totales ^a	2.20	10.70	5.50	10.85
Fibra cruda ^a	3.70	13.00	1.17	4.95
Fibra dietaria ^a	18.40	22.70	10.60	16.63
Vitaminas				
Tiamina ^c	-	0.48	-	0.59
Niacina ^c	-	1.54	-	1.76
Vitamina E ^c	-	0.82	0.82	13.7
Minerales				
Calcio ^c	68.0	269	103	259
Magnesio ^c	107.4	168	119	167
Zinc ^c	2.2	20.00	2	5.4
Hierro ^c	3.0	9.8	3	9.8

^a Porcentaje en base seca (%; bs); ^b Porcentaje de almidón; ^c mg/100g; ^d Porcentaje de aceite Wood y Grusak (2007).

seco, y se considera que su calidad proteínica es mejor que la de otras leguminosas, por lo que es un importante componente en las dietas de individuos en los trópicos semi-áridos, que no pueden obtener proteína de origen animal, así como en personas vegetarianas (Geervani 1991; Chibbar y col 2010; Jukanti y col 2012).

a. Proteínas

El contenido de proteínas en grano de garbanzo va desde 16,7% a 30,6% y 12,6% a 29,0% para los tipos desi y kabuli, respectivamente, y comúnmente este contenido es 2-3 veces mayor que los granos de cereales (Wood y Grusak 2007). Las proteínas de reserva más importantes son las globulinas (57% de la proteína total) seguido de las glutelinas (18%) las albuminas (12%) y finalmente las prolaminas (3%). Los cotiledones contienen a la mayoría de las globulinas, glutelinas y albúminas del grano, el embrión es más rico en albúmina, mientras que la testa contiene principalmente fracciones de nitrógeno no proteico y glutelinas (Singh y Jambunathan 1982).

b. Lípidos

El contenido total de lípidos en grano de garbanzo es mayor que en otras leguminosas. Este contenido varía de 3.40 - 8.83% y 2.90 - 7.42% en los tipos kabuli y desi, respectivamente (Wood y Grusak 2007). El contenido total de lípidos de garbanzo comprende principalmente ácidos grasos poliinsaturados (62-67%), monoinsaturados (19-26%) y ácidos grasos saturados (12-14%). El ácido graso principal en garbanzo es el ácido linoleico (46-62% en aceite de garbanzo tipo desi y 16-56% en el de tipo kabuli), seguido por el ácido oleico (monoinsaturado) que se encuentra en proporciones de 18-23% y 19-32% en aceites de desi y kabuli, respectivamente

(Wood y Grusak 2007). El contenido de aceite del garbanzo también incluye tocoferoles, tocotrienoles y esteroides (Akihisa y col 1992).

c. Carbohidratos

Los hidratos de carbono son el componente nutricional mayoritario en el garbanzo, con 51 a 65% en el tipo de desi y 54-71% en el tipo kabuli (Wood y Grusak 2007). Sánchez-Mata y col (1998) informaron concentraciones de monosacáridos en garbanzo: galactosa (0.05%), ribosa (0.11%), fructosa (0.25%) y glucosa (0.7%). Los más abundantes disacáridos que se encuentran libres en el garbanzo son la maltosa (0,6%) y la sacarosa (1-2%). El garbanzo contiene 0,4-2,8% y 1.2 a 3.9% de oligosacáridos en los tipo desi y kabuli, respectivamente. Los oligosacáridos más importantes encontrados en el garbanzo son rafinosa, estaquiosa, ciceritol y verbascosa, informados en cantidades de hasta 2,2%, 6,5%, 3,1% y 0,4%, respectivamente (Wood y Grusak 2007). El contenido de almidón varía desde 41 hasta 50% del total de carbohidratos en garbanzo, con el tipo kabuli teniendo más azúcares solubles (sacarosa, glucosa y fructosa) en comparación con el tipo desi (Jambunathan y Singh 1980; Dalgetty y Baik 2003; Özer y col 2010).

d. Fibra dietaria total

El garbanzo es una de las leguminosas con mayor contenido de fibra, superando al frijol, habas y chícharos. La fibra dietética incluye carbohidratos no digeribles y lignina. En leguminosas, gran parte de la fracción de fibra se localiza en la testa. La fibra dietética, como proporción del total de carbohidratos, constituye el 20-21% en garbanzo tipo kabuli y 35-37% en tipo desi. Esta gran diferencia entre tipos desi y kabuli se debe principalmente a diferentes contenidos de testa, pues el tipo desi tiene

una testa con niveles 2-3 veces más altos de lignina que tipos kabuli (Singh, 1984). De Almeida-Costa y col (2006) reportan un contenido de fibra insoluble en garbanzo crudo de 13.9 ± 0.09 g/100g, mientras que en el grano cocido este contenido es de 15.4 ± 0.18 g/100g.

e. Almidón resistente

La fracción de almidón no digerible se conoce como almidón resistente (AR), que es fermentado en el colon por la microbiota intestinal junto con la fibra dietética insoluble y soluble, produciéndose ácidos grasos de cadena corta como el acético, propiónico y butírico, que al reabsorberse interactúan en algunas rutas metabólicas y eventos genéticos de tumorigénesis. En leguminosas, este almidón se encuentra atrapado en la matriz celular (Tovar y col 1992). Se considera que aproximadamente el 35% del almidón total en el grano de garbanzo es almidón resistente y el 65% restante de almidón se trata de almidón disponible (Aguilera y col. 2009a, b). Se ha comprobado (Ratnayake y col 2001; Osório-Díaz y col 2003; Tharanathan y Mahadevamma 2003) que el procesamiento térmico induce un aumento en los valores de almidón resistente, debido principalmente a la retrogradación de amilosa.

f. Vitaminas y minerales

El garbanzo contiene varias vitaminas solubles en agua, tales como las vitaminas del complejo B (incluyendo folato en cantidades de 150–557 $\mu\text{g/g}$) y vitamina C (4 mg/100 g), así como varias vitaminas liposolubles como la vitamina A (en forma de provitamina A en β -caroteno, que se encuentra arriba de 49 mg/100 g en el garbanzo), vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles, 13.7 mg/100 g) y la vitamina K (Wood y Grusak 2007). Las semillas de garbanzo crudo proporcionan

aproximadamente 5% de hierro, 4,1% de zinc, 0.138% de magnesio y 0.160% de 100 g de calcio.

3. Valor nutricional

La composición de aminoácidos en el grano de garbanzo es bien equilibrado (**Cuadro 4**) excepto por los aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y triptófano, pero es alta en lisina (Wood y Grusak 2007). Las leguminosas deben ser sujetas a cocción antes de ser utilizadas en la dieta humana, con el fin de mejorar la calidad de la proteína por la destrucción térmica de factores antinutricionales termolábiles (Alajaji y El-Adawy 2006). Modgil y Mehta (1993) reportaron en granos de garbanzo un radio de eficiencia de alimentación (FER) de 0.209 ± 0.06 , en comparación a 0.351 ± 0.05 de la caseína. En cuanto al radio de eficiencia proteica (C-PER) se mostraron valores de 2.09 ± 0.63 , en comparación a 3.51 ± 0.51 de la caseína. Para la utilización de proteína neta (NPU), se obtuvo un 76.07 ± 3.00 , mientras que el NPU de la caseína es de 83.77 ± 4.47 . La digestibilidad aparente de proteína (APD) del grano de garbanzo es de $88.26 \pm 1.36\%$, siendo la de la caseína de $96.40 \pm 1.29\%$. La digestibilidad verdadera de proteína (TPD) del garbanzo fue de $90.09 \pm 3.29\%$ en comparación a $98.58 \pm 1.26\%$ de la caseína. Se reporta un valor biológico (BV) del garbanzo de $84.44 \pm 2.46\%$ y de la caseína de $84.98 \pm 4.26\%$.

1. Fitoquímicos en garbanzo

El **cuadro 5** muestra el contenido de fitoquímicos en garbanzo.

Cuadro 4. Contenido de aminoácidos esenciales en garbanzo.

Aminoácidos^a	Contenido (g/100 g proteína)	FAO^b
Histidina	2.43	2.0
Isoleucina	3.19	3.2
Leucina	7.14	6.6
Lisina	6.39	5.7
Metionina + Cisteína	2.18	2.7
Fenilalanina + Tirosina	8.80	5.2
Treonina	3.46	3.1
Triptófano	1.10	0.9
Valina	3.54	4.3

^a Angulo-Bejarano y col (2008); ^b Patrón de aminoácidos recomendado para niños (0.5 - 3 años) según la FAO (2013)

Cuadro 5. Fitoquímicos en granos de garbanzo

Fitoquímico	Tipo Desi		Tipo Kabuli		Factores antinutricionales (%) ¹	Desi		Kabuli	
	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.		Mín	Máx	Mín	Máx
Ácidos fenólicos (µg/100 g)¹					Oligosacáridos	1.2	3.9	0.4	2.8
Ácido gálico ^a	0.0	22.9	-	-	Fitatos	0.37	1.13	0.25	0.99
Ácido protocatéquico ^a	0.0	22.5	-	-	Taninos	0.36	0.72	0.12	0.51
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico ^a	16.3	39.4	0	1	Inhibidores de tripsina ^c	1.16	15.7	1.39	12.1
Ácido clorogénico ^a	0.0	31.3	-	-	Inhibidores de quimotripsina ^c	2.40	13.19	3.0	10.74
Ácido ferúlico ^a	0.0	0.0	1	43	Polifenoles ^c	0.84	6.0	0.02	2.2
Ácido siríngico ^{ab}	-	-	1	52	Saponinas ^c	17.7	56.0	0.7	21.9
Ácido gálico ^b	0.0	25.9	-	0.0					
Ácido protocatéquico ^b	0.0	15.0	-	0.0					
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico ^b	0.0	21.3	-	8.0					
Ácido <i>p</i> -cumárico ^b	0.0	22.8	-	3.0					
Flavonoides (µg/g)				(µg/g)			Garbanzo desi		
Quercetina 3-O-rutinósido ³				0.52±0.04	Fitoesteroles (%)²		Mín	Máx	
Quercetina-hexósido ⁴				0.71±0.05	Campesterol		12.06	13.67	
Kaempferol 3-O-rutinósido ³				0.60±0.03	Δ ⁷ -Avenasterol		0.79	1.21	
Biocanina B hexósido ³				6.60±0.34	Estigmasterol		4.92	5.38	
Derivados de Biocanina B ³				22.09±1.91	β-Sitosterol		73.12	76.10	
Biocanina A 7-O-glucósido ³				10.26±0.78	Clerosterol		1.94	4.01	
Derivados de Biocanina A ³				18.58±0.96	Δ ⁵ -Avenasterol		3.12	5.72	
Formononetina ⁴				0.943-1.26					

¹ Wood y Grusak 2007; ² Recopilado por Sánchez-Magaña 2014, ³ Aguilera y col 2011, ⁴ Azimova y Vinogradova, 2013. ^a cotiledones; ^b testa; ^c mg/g

a. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son compuestos encontrados comúnmente en garbanzo, los cuales son considerados posibles agentes para combatir enfermedades como cáncer y arterioesclerosis (Aparicio-Fernández 2006), entre otras. Kalogerolopoulus y col (2010) reportaron que la suma total de compuestos fenólicos en garbanzo era de 2.05 mg EAG/g.

b. Isoflavonas

Las isoflavonas son flavonas que tienen anillo B en la posición 3. En garbanzo, las principales son la biocanina A y formononetina. Las agliconas (genisteína, daidzeína y gliciteína) pueden encontrarse formando β -glucósidos (genistina, diadzina y glicitina), acetil-glucósidos (6''-O-acetilgenistina, 6''-O-acetildiadzina y 6''-O-acetilgliciteína) y malonil-glucósidos (6''-O-malonilgenistina, 6''-O-malonildiadzina y 6''-O-malonilgliciteína). El garbanzo es una de las fuentes dietéticas más ricas de isoflavonas, superada solamente por la soya. Debido a que las formas agliconas (sin azúcar unido) podrían ser las más bioactivas, es importante conocer el efecto del procesamiento sobre la composición de las isoflavonas (Ludueña y col 2007; Jukanti y col 2012).

c. Saponinas

Las saponinas son glucósidos con varias unidades de monosacáridos enlazadas mediante un enlace glucosídico a un resto denominado aglicón. Éstas pueden hemolizar los glóbulos rojos y formar una espuma estable cuando se agitan sus soluciones acuosas (Martínez-Martínez, 2001). Las saponinas reducen la

biodisponibilidad de nutrientes y la actividad enzimática retardando el crecimiento de animales. Sin embargo, se les atribuyen propiedades hipocolesterolémicas, debido a su posible unión con el colesterol o ácidos biliares, aumentando su excreción; además de propiedades anticancerígenas e inmunoestimulantes. El garbanzo posee un contenido de saponinas de 25-56 mg/g (Wood y Grusak 2007; Campos-Vega y col 2010; An y col 2011; Singh y Basu 2012).

2. Actividad antioxidante del garbanzo y sus productos

Además de los compuestos fenólicos, carotenoides y ácido ascórbico, se ha reportado (Watanabe y col 2007) que compuestos nitrogenados como oligopéptidos, proteínas y melanoidinas le confieren propiedades antioxidantes al garbanzo. Por el método de DPPH, en garbanzo se ha reportado (Xu y Chang 2007) una actividad antioxidante de 2.06 $\mu\text{mol ET/g}$, mientras que Xu y col (2007) reportaron que tal capacidad era de 1.26 $\mu\text{mol ET/g}$. Zia-UI-Haq y col (2008) obtuvieron valores de 1.06 a 1.24 $\mu\text{mol ET/g}$. Mediante el método de ORAC, Xu y Chang (2007) obtuvieron una actividad antioxidante de 34.66 $\mu\text{mol ET/g}$. Xu y col (2007) reportaron una actividad antioxidante de 9.26 $\mu\text{mol ET/g}$. Zia-UI-Haq y col (2008) obtuvieron valores de 8.58 a 11.4 $\mu\text{mol ET/g}$, mientras que Heiras-Palazuelos y col (2013) reportan una actividad antioxidante de 44.3 $\mu\text{mol ET/g}$. Mediante el método de ABTS Zia-UI-Haq y col (2008) obtuvieron valores de 37.2 a 45.3 $\mu\text{mol ET/g}$. Se observa (Domínguez-Arispuro 2011) que la actividad antioxidante de garbanzo cocido es menor que en garbanzo crudo (298 $\mu\text{mol ET/100 g}$, bs y 722 $\mu\text{mol ET/100 g}$, bs, respectivamente) y que en garbanzo extrudido (569 $\mu\text{mol ET/100 g}$, bs), como resultado de la destrucción de compuestos antioxidantes.

Zhang y col (2011) reportaron la purificación de un péptido con actividad antioxidante obtenido a partir del hidrolizado de proteína de garbanzo digerido con alcalas. Tal péptido fue obtenido por separación del hidrolizado mediante Sephadex G-25, siendo la fracción de menor peso molecular la que presentó la mayor actividad antioxidante. La secuencia de aminoácidos fue identificada como Asn-Arg-Tir-His-Glu. Al evaluar al péptido, en una concentración de 50 µg/mL, este presentó una actividad de captación de radicales libres DPPH, hidroxilo y superóxido, además de actividad quelante de hierro y cobre, de 76.9 y 63% respectivamente.

Torres-Fuentes y col (2011) fraccionaron un hidrolizado de proteína de garbanzo, obtenido tras digestión enzimática con pepsina/pancreatina, empleando una columna de afinidad con cobre inmovilizado. Estos investigadores reportaron un valor de quelación de 28, 36.7 y 45% evaluando 60 µg de cada fracción (F1, F2 y F3). La fracción F1 presentó un alto contenido de Lis (11.5 g/100g de proteína) y Arg (24.9 g/100g) mientras que las fracciones F2 y F3 presentaron un alto contenido de His (17.4 y 22.9 g/100g respectivamente) existiendo una correlación positiva entre el contenido de este aminoácido y la capacidad quelante de cobre.

3. Propiedades nutraceuticas del garbanzo y sus productos

Se ha reportado que el consumo de garbanzo tiene algunos beneficios fisiológicos que pueden reducir el riesgo de enfermedades crónicas tales como las enfermedades cardiovasculares, la diabetes tipo 2, enfermedades del aparato digestivo y algunos tipos de cáncer, así como optimizar la salud. Por lo tanto, los garbanzos podrían ser considerados como un "alimento funcional", además de su reconocido papel de proporcionar proteínas y fibra (Jukanti y col 2012).

a. Hipocolesterolémica

Se ha demostrado (Wood y Grusak 2007) que los compuestos polifenólicos en garbanzo pueden tener efectos hipocolesterolémicos beneficiosos mediante la unión con los lípidos y el colesterol. Los ácidos ferúlico y *p*-cumárico son polifenoles que se encuentran en las semillas de garbanzo a bajas concentraciones, y se ha demostrado que éstos reducen los niveles de lípidos en sangre en ratas (Sharma 1980, 1984). Además, se ha reportado (Vioque y col 2006) la presencia de péptidos con función hipocolesterolémica. La ingesta de ácido linoleico (predominante en garbanzo) tiene un efecto beneficioso sobre el control de lípidos séricos (Jukanti y col 2012). El almidón resistente y la fibra dietaria tienen efecto en la reducción del colesterol (Cardador-Martínez y col 2002a, b). Se ha reportado que los alimentos ricos en saponinas reducen el colesterol en plasma en un 16-24% (Thompson 1993). El mecanismo de reducción del colesterol es mediante la unión al colesterol de la dieta (Gestene y col 1972) o a los ácidos biliares, aumentando así su excreción a través de las heces (Sidhu y Oakenful 1986; Zulet y Martínez 1995). El β -sitosterol (el fitosterol dominante en garbanzo) es útil en la disminución de los niveles de colesterol en suero y la incidencia de la cardiopatía coronaria (Ling y Jones 1995; Clark 1996; Moreau y col 2002). Campos-Vega y col (2010) reportaron que suplementos dietéticos a base de garbanzo redujeron significativamente el colesterol sérico total y el colesterol de lipoproteínas de baja densidad en mujeres y hombres adultos).

b. Antidiabética

La inhibición de enzimas que degradan el almidón por compuestos fenólicos presentes en garbanzo y su unión con el almidón puede disminuir la respuesta glicémica e insulina posprandial (Wood y Grusak 2007). El ácido linoleico tiene un efecto sobre la sensibilidad a la insulina, por lo que el consumo de garbanzo (que contiene altos niveles de este ácido) puede ser útil para disminuir el riesgo de enfermedades de resistencia a la insulina (Jukanti y col 2012). Los factores antinutricionales presentes en garbanzo, como fitatos e inhibidores de amilasas pueden afectar la digestibilidad del almidón en las legumbres, disminuyendo la liberación de glucosa en el torrente sanguíneo, lo cual es benéfico para los pacientes diabéticos (Zia-Ul-Haq y col 2007; Sharma y col, 2013). La fibra dietética y almidón resistente ejercen un efecto protector sobre la diabetes, haciendo al almidón más resistente a la digestión en el intestino delgado, resultando en una menor disponibilidad de la glucosa (Cardador-Martínez y col 2002a, b).

c. Antimutagénica

Los compuestos tales como la vitamina E, saponinas, ácido fólico, ácido linoleico, genisteína y daizeína, que se encuentran comúnmente en legumbres, exhiben una actividad anti-mutagénica (Tavan y col 1997; Miyazawa y col 1999 Park y col 2003). Se ha observado (Domínguez-Arispuro 2011) una actividad antimutagénica de 58.55% para garbanzo crudo tipo kabuli, la cual sufre un descenso en procesamientos como extrusión (27.91%) y cocción (23.10%). En otras leguminosas, como el frijol negro, se ha mostrado que los compuestos fenólicos poseen propiedades antimutagénicas contra la aflatoxina B₁ (Fernández-Orozco 2005), el

benzo[a]pireno y el 4-nitroquinoleína N-óxido (Hung 2006). Estas propiedades también fueron encontradas en frijol Flor de Mayo, por González de Mejía y col (1999), y en los cultivares Negro Altiplano, Negro Durango, Negro Sahuatoba, Flor de Mayo Sol, Flor de Mayo Bajío y Flor de Mayo (Rocha-Guzmán y col 2007).

d. Anticarcinogénica

Los componentes de la fibra dietética y el almidón resistente tienen efectos benéficos sobre distintos tipos de cáncer (Cardador-Martínez y col 2002a, b). Las dietas altas en fibra reducen los trastornos del intestino, tales como estreñimiento, diverticulitis y cáncer. La fermentación bacteriana (producción de ácidos grasos de cadena corta tales como acético, propiónico y butírico), estimula el crecimiento de las células epiteliales del colon sanos y promueven la muerte de las células tumorales del intestino (Gurr y Asp 1994). Se ha reportado que el butirato suprime la proliferación celular (Cummings y col 1998) e induce la apoptosis (Mathers 2002), lo que puede reducir el riesgo de cáncer colorrectal. Las dietas altas en fibra también reducen el pH fecal, ayudando con ello a la excreción de los metabolitos de proteínas, que son sustancias carcinógenas potentes (Binghams, 1990). Los compuestos fenólicos y carotenoides se consideran posibles agentes para combatir cáncer (Aparicio-Fernández 2006). Los inhibidores de proteasa han demostrado ser anticancerígenos (Champ, 2002; Mathers, 2002) y el garbanzo generalmente contiene de 1-16 mg/g de inhibidores de tripsina y 2-13 mg/g de inhibidores de quimotripsina.

e. Antihipertensiva

El ácido linoleico, predominante en garbanzo, es biológicamente importante debido a su participación en la producción de prostaglandinas, que están implicadas en la reducción de la presión arterial y constricción del músculo liso (Aurand y col 1987). Adicionalmente, los fitoesteroles como el β -sitosterol son de ayuda en la reducción de la presión sanguínea (Ling y Jones 1995; Clark 1996; Moreau y col 2002).

En garbanzo, se ha reportado (Pedroche y col 2002; Yust y col 2003; Vioque y col 2006; Aluko 2008b; Barbana y Boye 2010; Medina-Godoy y col 2012) la presencia de péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I. Entre los péptidos activos presentes en el garbanzo, se encuentran los quelantes de hierro y los antioxidantes, así como péptidos hipoinmunoreactivos, con actividad antigénica (Aluko 2008b). Mediante el ensayo de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I por biopéptidos obtenidos por hidrólisis enzimática de aislados de proteína de garbanzo, Pedroche y col (2002) obtuvieron valores de IC_{50} de 190 μ g/ml, y en la caracterización de los péptidos responsables de la actividad inhibitoria encontraron la forma hexamérica de legumina, que es la principal globulina en aislados proteicos; además, encontraron a trímeros de legumina y finalmente monómeros de subunidades $\alpha\beta$. El tratamiento de la legumina de garbanzo con alcalasa produce un hidrolizado con actividad IC_{50} inhibitoria de la ECA de 0.18 mg/mL (Yust y col 2003); el fraccionamiento del hidrolizado mediante cromatografía de alta resolución de fase inversa produjo seis péptidos inhibidores, con composición de aminoácidos Met-Asp, Met-Asp-Phe-Leu-Ile, Met, Met-Phe-Asp-Leu, Met-Asp-Leu y Met-Asp-Leu, y un IC_{50} de 21, 11, 20, 13, 21 y 13 μ g/mL, respectivamente. Barbana

y Boye (2010) reportaron un IC₅₀ de 229 a 316 140 µg/mL y de 140 a 228 µg/mL para tipos kabuli y desi, respectivamente. Medina-Godoy y col (2012) obtuvieron hidrolizados de aislados de proteína y de fracciones de proteína (globulina y albúmina) con alcalasa, pancreatina y papaína, reportando un IC₅₀ de 0.01 – 37.33 µg/mL, mostrando mayor actividad en los hidrolizados de globulina. Boschín y col (2014) reportaron un IC₅₀ de 673 µg/mL en sus hidrolizados proteínicos.

En extractos fenólicos de harina de garbanzo, Sreerama y col (2012) reportan inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I, con un valor de IC₅₀ de 61.3 µg/mL. Ademiluyi y Oboh (2013) también reportaron actividad antioxidante relacionada con compuestos fenólicos en leguminosas (soya), obteniendo valores de IC₅₀ de 143.26 µg/mL para fenoles ligados y de 159.74 µg/mL para fenoles libres.

H. FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

1. Generalidades

En términos generales, la fermentación implica el empleo de microorganismos para llevar a cabo transformaciones de la materia orgánica catalizadas por enzimas. (Campbell-Platt 1994). La fermentación realiza, por lo menos, cinco funciones en el procesamiento de alimentos: (1) Enriquece la dieta humana a través del desarrollo de una gran diversidad de sabores, aromas y texturas en alimentos; (2) Preserva cantidades sustanciales de alimentos a través de las fermentaciones ácido lácticas, alcohólica, ácido acética, fermentación alcalina y fermentaciones altas en sal; (3) Enriquece los sustratos alimenticios biológicamente con vitaminas, proteínas, aminoácidos esenciales y ácidos grasos esenciales; (4) Mejora la seguridad del alimento a través de la inhibición de patógenos y remueve compuestos tóxicos y (5)

Disminuye los tiempos de cocción y requerimientos de energía (Steinkraus 2002; Bourdichon y col 2012).

La fermentación en estado sólido ha sido definida como un proceso biotecnológico que consiste en el crecimiento de microorganismos sobre sustratos sólidos (ej. granos) en ausencia, o casi ausencia, de agua libre superficial; sin embargo, el sustrato debe poseer la suficiente humedad para permitir el crecimiento y la actividad metabólica del microorganismo (Pandey 2003). La matriz sólida podría ser la fuente de carbono (y otros nutrientes), o podría ser un material inerte para apoyar el crecimiento de los microorganismos en él (impregnado con solución para su crecimiento) (Thomas y col 2013). El contenido de agua varía entre 40-80%, en comparación a contenidos de más del 95% de agua en una fermentación típica en estado líquido (Mussatto y col 2012).

La fermentación en estado sólido posee ciertas ventajas sobre las fermentaciones sumergidas, entre las que se puede mencionar: 1) Pocos requerimientos de agua y energía, 2) Altos rendimientos, 3) Generación de pocos desechos con menor riesgo de contaminación bacteriana, 4) Bajo costo, 5) Mejora el valor nutricional y sensorial, además de ser una tecnología amigable con el medio ambiente (Paredes-López y Harry 1989; Ali y Zulkali 2011). La principal desventaja es la naturaleza heterogénea del medio debido a la estructura irregular del sustrato, dificultando el mezclado, lo que conlleva a problemas en el control de algunos parámetros como pH y temperatura (Chen y Qiu 2010).

El potencial de la FES es que esta proporciona al microorganismo a ser cultivado un ambiente lo más cercano y parecido al entorno natural donde habitualmente existen y de donde son aislados. Esto aparentemente es de los principales factores

por los cuales los microorganismos se desempeñan bien y dan productos de mayor rendimiento en comparación con la fermentación líquida (Thomas y col 2013).

2. Tempe

a. Origen e historia

Los alimentos producidos por fermentación en estado sólido son diversos; uno de los más importantes es el alimento de origen Indonés (en aquél entonces Java central y oriental), denominado tempe (Agosin y col 1989; Hachmeister y Fung 1993). La más antigua referencia en la literatura data de los años 1800, pero se cree que ha evolucionado mucho antes de este tiempo. Este utiliza tradicionalmente como sustrato soya y como inóculo *Rhizopus oligosporus* (Astuti 2000; Feng y col 2007).

b. Características

La fermentación se lleva sobre sustratos como cereales y leguminosas, que son penetrados y unidos por un micelio denso algodonoso de color blanco, en el cual el sustrato se encuentra embebido; generalmente se lleva a cabo por el hongo *Rhizopus oligosporus* (Nout y Kiers 2005). Como producto final se forma un pastel blanco-grisáceo que posee un aroma agradable similar al de champiñón o de nuez (Nout y Rombouts 1990). Este se fríe o cocina para ser utilizado en una gran variedad de platillos. El producto frito tiene un color café oscuro agradable (Fung y Crozier-Dodson 2008). Su sabor no es ácido y no contiene grandes cantidades de alcohol. Algunas de las razones principales por las que el tempe es ideal como alimento en países en desarrollo como fuente de proteína de calidad económica son: (1) La tecnología para producirlo es simple y de bajo costo, además de amigable con el medio ambiente, (2) Los ingredientes solamente son granos de cereales,

pseudocereales o leguminosas, (3) El clima cálido o tropical característico de muchos países en desarrollo facilita la fermentación para la producción de tempe y (4) La sencillez y brevedad (24-48 h) de la fermentación en comparación de otros alimentos fermentados que requieren hasta meses (Shurtleff y Aoyagi 2001; Ali y Zulkali 2011; Mussato y col 2012)

c. Sustratos

La soya es el sustrato más común y preferido para la elaboración de tempe. Sin embargo, otros sustratos han sido utilizados, como garbanzo (Reyes-Moreno y col 2000, 2004; Angulo-Bejarano y col 2008; Abu-Salem y Abou-Arab 2011; Sánchez-Magaña y col 2014), frijol (Kiers y col 2000; Reyes-Bastidas y col 2010; Guzmán-Uriarte y col 2013; Rochín-Medina y col 2015), cebada (Eklund-Jonsson y col 2006; Feng y col 2007), avena (Eklund-Jonsson y col 2006), sorgo (Mugula y Lyimo 2000) y trigo (Hachmeister y Fung 1993).

Los sustratos utilizados en FES difieren en gran medida en la composición, naturaleza química, propiedades mecánicas, el tamaño de partícula (incluyendo inter- e intra-espacios de partículas), la capacidad de retención de agua, área superficial, etc. Estos factores afectan el diseño del proceso en general y el desarrollo de productos (Thomas y col 2013).

Todos los sustratos utilizados en FES tienen una característica en común: su estructura macromolecular (celulosa, almidón, pectinas, lignocelulosa, fibras, etc) que le confiere propiedades de sólido al sustrato, logrando proveer de una matriz inerte en donde se absorbe la fuente de carbono y energía (azúcares, lípidos, ácidos orgánicos y carbohidratos). En general, el sustrato debe tener una gran área de

superficie por unidad de volumen (10^3 a 10^6 m²/cm³), de modo que las partículas más pequeñas de sustrato proporcionan una mayor superficie para el ataque microbiano, rindiendo más productos, incremento de la biomasa y transformación del sustrato. Un menor tamaño permite el intercambio de gases (aire-humedad-dióxido de carbono), y la transferencia de calor y masa, pero a un tamaño menor de 10^3 , se puede dar lugar a la aglomeración de sustrato, de modo que los sustratos presentan poca porosidad que limita el crecimiento y utilización del sustrato, lo que reduce el área de superficie efectiva (Raimbault 1998; Pandey y col 1999).

d. Inóculos

La microflora del tempe tradicional es el resultado de la fermentación de una mezcla de cultivo mixto de microorganismos, incluyendo hongos, levaduras, bacterias ácido lácticas y otras bacterias diferentes (Steinkraus, 2002; Nout y Kiers 2005). El impedimento del crecimiento de microorganismos causantes de deterioro se debe a la acidificación del sustrato por parte de las bacterias lácticas durante el remojo (Nout y col 1987; Ashenafi y Busse 1991).

En general, los cultivos de hongos y levaduras han sido considerados como los microorganismos adecuados para la FES. Esto se ha basado fundamentalmente en el concepto teórico de la actividad de agua, como los hongos y las levaduras tienen requisitos de actividad de agua más bajos (0.5 a 0.6) mientras que los cultivos bacterianos tienen un mayor requerimiento de actividad de agua (0.8 a 0.9). Sin embargo, se han descrito un gran número de bioprocesos en estado sólido a base de bacterias. La elección del microorganismo debe estar vinculado con la selección del sustrato y el producto que se desea obtener (Thomas y col 2013). Los hongos

filamentosos son los microorganismos más importantes utilizados en este tipo de fermentación, debido a sus propiedades fisiológicas, enzimáticas y bioquímicas. Estos microorganismos se adaptan fácilmente debido al crecimiento en hifas, buena tolerancia a actividades de agua bajas y condiciones de presión osmótica elevada, lo que los vuelve eficientes y competitivos para la bioconversión de sustratos sólidos (Raimbault, 1998). Se reconoce en la literatura el uso de dos tipos fundamentales de inóculo en la FES con hongos: micelio o esporas. Moore y Prior (1993) entre otros han reportado el uso del micelio, cuyas principales ventajas como inóculo son: mejor competitividad del hongo, reducción de la posible colonización del sustrato por microorganismos contaminantes y colonización más rápida debido a que se reducen los tiempos de incubación, principalmente la fase de latencia. Bosch y col (1995) reportan el uso de suspensiones de esporas, cuya ventaja principal es la reducción de costos en la etapa de propagación del microorganismo.

1) *Rhizopus oligosporus*

El género de mayor importancia en la producción de tempe es *Rhizopus* spp con diferentes especies como *R. microsporus*, *R. oryzae* y *R. oligosporus* (Nout y Kiers 2005). *Rhizopus oligosporus* pertenece al reino Fungi, phylum Zygomycota, orden mucorales, familia MUCORAEAE, género *Rhizopus*. Algunas de sus características morfológicas ayudan en la diferenciación entre dichas especies. Las hifas pueden ser o no septadas (6-15 μm en diámetro), las esporangiosporas son de color café y no presentan ramificación, encontrándose solas o formando racimos; los rizoides se localizan en el punto de unión entre el estolón y esporangiospora. El esporangio (40-350 μm en diámetro) se localiza en la punta de la esporangiospora, su forma es

redonda con bases aplanadas. Presentan esporangiospora unicelular, de forma redonda a ovalada, la textura es de suave a estriada (Larone 1995).

El crecimiento de las hifas proporciona al hongo la capacidad de penetrar en la mayoría de los sustratos sólidos hasta 1 mm o 25% del cotiledón, manteniéndolos unidos (Hutkins 2006); secretando en la punta de la hifa las enzimas hidrolíticas que penetran directamente en el sustrato. Estos hongos tienen la capacidad de crecer rápidamente a temperaturas relativamente altas (37-45°C) y condiciones de humedad alta (60-80%). El hongo utiliza el oxígeno disponible y produce CO₂, que inhibe el crecimiento de microorganismos contaminantes. Gracias a la combinación de pH relativamente bajo, agua no libre y temperatura alta en la masa del sustrato, *Rhizopus oligosporus* puede desarrollarse rápidamente (Miszkievicz y col 2004). Este hongo se considera un microorganismo seguro (GRAS) por la FDA.

Las características de las cepas de *Rhizopus* que debe presentar para la producción de tempe son las siguientes: (1) Rápido crecimiento a 37°C, (2) Actividad lipolítica alta, (3) Capacidad antioxidante, (4) Habilidad para producir sabor, aroma y textura típica del tempe, (5) Inhabilidad para fermentar sacarosa y (6) Actividad proteolítica alta, dando como resultado amonio libre después de 48 o 72 h de fermentación. Además de cualidades como la biosíntesis de vitamina B12 e inhibición de la producción de aflatoxinas (Steinkraus 1995). El crecimiento de aflatoxinas B1 de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* se ven inhibidas por *R. oligosporus* (Nout y Rombouts 1990).

a) Actividad enzimática

Rhizopus oligosporus sintetiza varias enzimas durante la fermentación, las cuales actúan sobre los lípidos, polisacáridos y proteínas del sustrato, e hidrolizan el material crudo mejorando su textura, sabor y aroma (Nout y Rombouts 1990), como la fitasa, que hidroliza al ácido fítico, siendo los principales productos finales de la acción de la fitasa el ácido fosfórico y mioinositol (Sabu y col 2002) de modo que aumenta la biodisponibilidad de minerales, solubilidad y digestibilidad de proteínas (Reddy y Pierson 1994). Otra enzima sintetizada por este hongo es la lipasa, que hidroliza la tercera parte de los lípidos neutros durante la fermentación, produciendo ácidos grasos libres como el palmítico, esteárico, oleico, linoléico y linolénico. El contenido de lípidos disminuye durante la fermentación, ya que éstos son utilizados por *Rhizopus* spp en su metabolismo (Ruiz-Terán y Owens 1996; Wiesel y col 1997).

También se ha reportado (Raimbault 1998) la producción de glucoamilasa y α -amilasa durante la fermentación, que se relacionan con la degradación del almidón y la β -glucosidasa, que cataliza la hidrólisis de β -D-glucósidos, así como glucósidos con sólo restos de carbohidratos (Woodward 1982; Wei y col 1996; Sharmila y col 1998).

3. Manufactura de tempe

El proceso general de producción de tempe incluye: limpieza, hidratación y fermentación láctica, descascarillado, cocción parcial, drenado/enfriado, inoculación, colocación en contenedores e incubación.

a. Limpieza

La limpieza se lleva a cabo para la remoción de granos sucios, quebrados, dañados y descompuestos, así como materia extraña presente.

b. Remojo

Durante el remojo los granos se remojan en exceso de agua por 12 o 15 h a temperatura ambiente, lo que facilita la penetración del micelio. Durante la fermentación ácida bacteriana se observa una disminución del pH de los granos en un rango de 5.3 a 4.5, lo que previene el desarrollo de bacterias indeseables mas no afecta el crecimiento de *Rhizopus*. El crecimiento del hongo es estable en un pH mayor a 3.5 y más lento cuando se acidifica a pH más altos (Dinesh y col 2009).

c. Descascarillado

El hongo no puede crecer en grano entero, por lo que se procede a una etapa de descascarillado manual o por abrasión mecánica, de modo que el hongo pueda alcanzar los nutrimentos de los cotiledones (Roubos van den Hil y col 2010).

d. Cocción parcial

La cocción parcial se aplica durante un tiempo que varía de 10 min a 3 h, a temperatura de ebullición, con el fin de destruir la contaminación de bacterias que puedan interferir con la fermentación, destruir factores antinutricionales y liberar algunos nutrientes requeridos para el crecimiento del hongo (Steinkraus y col 1965).

e. Drenado/enfriado

El agua de cocción es retirada y los cotiledones son extendidos en bandejas de bambú, mallas de alambre o cestos perforados. Un inapropiado drenado reduce la

vida de anaquel del producto, pues el exceso de agua favorece el crecimiento microbiano (Winarmo y Reddy 1986; Steinkraus 1995).

f. Inoculación

Para la inoculación se pueden obtener inóculos a través de fuentes como: (1) Lote previo de tempe, (2) Cepas puras liofilizadas o suspendidas en agua. Wang y col (1975) reportaron que para una fermentación óptima se obtienen resultados satisfactorios con 1×10^6 esporas/100 g de sustrato cocido.

g. Contenedores de fermentación

Enseguida, se procede a la colocación en contenedores, los cuales deben ser apropiados para el acceso de oxígeno para el crecimiento del hongo, pero sin promover la esporulación y oscurecimiento del micelio. Durante esta etapa se puede controlar la temperatura de fermentación. No existe agua libre en contacto con el grano y la fermentación se lleva a cabo en condiciones higiénicas (Steinkraus 1995).

Hoy en día se utilizan bolsas de plástico, tubos flexibles (tripas) o cajas de plástico duro con orificios para permitir el crecimiento aeróbico del hongo (Roubos van den Hil 2010).

h. Incubación

Finalmente, en la incubación deben cuidarse la temperatura (25-37°C), el tiempo de fermentación y la humedad relativa. El tiempo requerido para llevar a cabo la fermentación disminuye cuando aumenta la temperatura (Steinkraus 1995; Nout y Kiers 2005). La humedad relativa reportada como óptima (Usmani y Noorani 1986) es de 60-65%, mientras que a >75% se da una esporulación indeseable.

4. Cambios químicos durante la elaboración de tempe

Durante la FES el micelio de *Rhizopus* spp penetra dentro de varias capas de células donde secreta enzimas hidrolíticas, invade el material intercelular y puede llegar a solubilizarse por la actividad de sus enzimas extracelulares, por lo que durante el bioprocesamiento ocurren cambios químicos y bioquímicos que mejoran la calidad nutricional y sensorial del tempe (Nout y Rombouts 1990). El **Cuadro 6** muestra el efecto de la fermentación de leguminosas sobre composición química.

a. Proteínas

Se ha reportado que durante la fermentación existe un pequeño incremento en el contenido de proteína del tempe con respecto al grano sin procesar (Hutkins 2006). Reyes-Bastidas (2008) observó que tras un proceso de fermentación en estado sólido de garbanzo a 34.9°C y 51 h, el tempe contenía un mayor porcentaje de proteína cruda ($25.93 \pm 0.59\%$) que la harina de garbanzo integral ($22.42 \pm 0.69\%$). En cuanto a la proteína verdadera, esta fue de $19.55 \pm 0.12\%$ para la harina integral, aumentando a $20.43 \pm 0.17\%$ en el tempe; asimismo, los resultados de Sánchez-Magaña (2014) concuerdan con lo anteriormente dicho, observándose un incremento de 23.8-31% en tempe de garbanzo procesado por 108 h.

a. Lípidos

Tras la FES en garbanzo realizada por Reyes-Bastidas (2008), se observó que el tempe contenía un menor porcentaje de lípidos ($4.14 \pm 0.06\%$) que la harina de garbanzo integral ($6.23 \pm 0.04\%$).

Cuadro 6. Efecto de la fermentación de leguminosas sobre la composición química

Composición química (% bs)	Frijol común		Garbanzo	
	Crudo	Tempe	Crudo	Tempe
Proteína cruda	23.06-25.36	28.06-29.54	20.09-24.63	26.1-28.85
Proteína verdadera	19.61	21.40	19.70	25.70
Lípidos	1.64	1.01	5.71-6.1	2.6-2.84
Cenizas	4.47	2.56	2.98-3.3	2.0-2.10
Carbohidratos	70.83	68.37	64.6-69.8	64.53-69.3
Almidón total	-	-	49.2	48.4
Almidón resistente	2.41	5.55	1.75-2.07	4.24-7.60
Fibra dietaria total	16.02	35.83	21.64-27.64	29.76-34.1
Soluble	4.74	13.32	4.85-6.35	9.24-16.84
Insoluble	11.30	22.51	17.72-20.36	16.67-21.11
Ácidos grasos (% en aceite)				
Linoleico	-	-	63.40	59.36
Palmítico	-	-	8.33	9.66
Estearico	-	-	28.20	30.82
Oleico	-	-	Trazas	Trazas

Recopilado por Sánchez-Magaña (2014)

Al poseer *R. oligosporus* una fuerte actividad lipolítica, provoca la liberación de ácidos grasos libres, como resultado de la hidrólisis de más del 30% de lípidos neutros, con una utilización preferencial de ácido α -linolénico, de tal modo que se reporta una disminución de los ácidos grasos unidos a glicerol y se reporta un ligero aumento de ácidos grasos C18:1 (oleico) y C18:2 (linoleico) a expensas de C18:3 (linolénico). (Wagenknecht y col 1961; Agranoff 1999).

b. Carbohidratos

Durante el remojo, cocción y fermentación, los azúcares como fructosa, rafinosa y estaquiosa presentes en la pared celular se ven eliminados (Mulyowidarso y Bukle 1991; Egounlety y Aworh 2003). Los carbohidratos insolubles (pectina, celulosa, hemicelulosa) se degradan parcialmente por las enzimas del hongo, lo que aumenta su solubilidad en agua (Kiers y col 2000). Entre las carbohidrasas principales de *R. oligosporus* en tempe se incluyen poligalacturonasas, celulasas, xilanasas y arabinasas (Sarrette y col 1992).

Egounlety y Aworh (2003) reportaron que los contenidos de galactosa, glucosa, fructosa y maltosa incrementan durante las primeras horas de fermentación (30 y 36 h) mientras que los oligosacáridos de la familia de la rafinosa sufrieron un decremento. Reyes-Bastidas (2008) reporta un descenso en el contenido de carbohidratos, de $59.30 \pm 0.54\%$ para harina integral de garbanzo a $57.87 \pm 0.66\%$ para el tempe. Angulo-Bejarano y col (2008) reportan un contenido de almidón total mayores en garbanzo sin tratamiento (49.2g/100g, bs) que en el grano fermentado (48.4g/100g, bs), debido a la remoción parcial de constituyentes no almidonosos durante la FES.

c. Fibra dietaria total

Sánchez-Magaña (2014) reporta un incremento en un 29.6% del contenido de fibra dietaria total de garbanzos procesados por FES, tras 108 h de fermentación. 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 (Shurtleff y Aoyagi, 1979)

d. Almidón resistente

Angulo-Bejarano y col (2008) reportan que la harina de tempe de garbanzo mostró mayores valores de almidón resistente (AR) que el garbanzo sin fermentar (7.6 y 1.9 g/100g, bs, respectivamente); estos resultados concuerdan con lo reportado por Sánchez-Magaña (2014), quien observó un aumento de AR de 1.91% a 4.5% tras el bioprocesamiento por 108 h, debido a que la gelatinización y la retrogradación del almidón son procesos importantes que gobiernan la formación de almidón resistente; durante la FES el contenido de humedad y la temperatura de cocción permiten la formación de enlaces de hidrógeno entre las cadenas moleculares dentro del gránulo de almidón.

e. Vitaminas y minerales

En un estudio realizado por Steinkraus y col (1961) se encontró que en el proceso de la elaboración de tempe, la riboflavina se duplica, la niacina se incrementa siete veces y la actividad de la cobalamina aumenta 33 veces. Por otro lado, la tiamina disminuye por el efecto térmico del tratamiento y el tiempo de fermentación. Kao y Robinson (1978) también reportaron que las vitaminas solubles,

con excepción de la tiamina, sufren un incremento en tempe elaborado a partir de garbanzo. Se ha encontrado (Keuth y Bisping 1993) que *Rhizopus* spp tiene un efecto positivo sobre el crecimiento bacterial de *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae*, las cuales se han utilizado para la producción de vitamina B₁₂. En cuanto al folato, se ha reportado (Arcot y col 2002) que el remojo, cocimiento y sobre todo, la lixiviación, causan una pérdida significativa de esta vitamina.

Reyes-Bastidas (2008) observó una disminución en el contenido de cenizas de harina de garbanzo integral ($3.14 \pm 0.01\%$) respecto al tempe ($1.98 \pm 0.07\%$). Esto puede atribuirse a la etapa de remojo en medio ácido, donde ocurre lixiviación de electrolitos y pérdida de sólidos, así como la consecuente migración al medio de remojo de algunos nutrimentos y componentes indeseables hidrosolubles y la etapa de cocción en medio ácido, donde se da una liberación parcial de calcio y magnesio al medio de cocción (Laurena y col 1986).

5. Efecto de la FES de leguminosas sobre el valor nutricional

En el **Cuadro 7** se muestra el efecto de la fermentación de leguminosas sobre el valor nutricional.

a. 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. Esto indica que el microorganismo libera aminoácidos, como lisina, metionina y triptófano, durante la digestión al romper las proteínas y, además, digiere aminoácidos liberando nitrógeno soluble.

Cuadro 7. Efecto de la fermentación de leguminosas sobre el valor nutricional

Aminoácido esencial (g AAE/100g proteína ¹)	Garbanzo		Frijol común		FAO (2013) ^a
	Crudo	Tempe	Crudo	Tempe	
Histidina	2.43	2.54	2.45	2.62	2.0
Isoleucina	3.19	3.56	3.09	3.33	3.2
Leucina	7.14	7.22	7.21	7.18	6.6
Lisina	6.39	6.09	6.52	6.31	5.7
Metionina	+	2.18	2.59	2.28	2.51
Cisteína					2.7
Fenilalanina	+	8.80	9.87	8.55	9.39
Tirosina					5.2
Treonina	3.46	3.85	3.52	3.78	3.1
Triptófano	1.10	1.06	1.23	1.14	0.9
Valina	3.54	3.76	3.53	3.69	4.3
AAET^{1,b}	38.23	40.5			33.9
AAE limitante¹	Met + Cys	Trp	Met + Cys	-	
Calificación química¹	0.87	0.96	91	100	
PER^{2, c}	1.59 ± 0.08	2.31 ± 0.10			
NPR^{2, d}	2.65 ± 0.06	3.02 ± 0.10			
C-PER^{1, 2, e}	1.54 ± 0.07	2.21 ± 0.08	-	-	
PDCAAS^{2, f}	0.73 ± 0.05	0.92 ± 0.02	-	-	
Digestibilidad <i>in vitro</i> (%)²	<i>in</i> 72.2 ± 0.11	83.2 ± 0.10	69.25	75.14	
Digestibilidad <i>in vivo</i> (%)²	<i>in</i>				
Aparente	81.10 ± 1.4	86.20 ± 1.3	-	-	
Verdadera	83.70 ± 1.1	88.80 ± 1.5	-	-	

¹Reyes-Bastidas (2008); ²Angulo-Bejarano y col (2008). ^a Patrón de aminoácidos recomendado para niños (0.5 - 3 años), ^b Aminoácidos esenciales totales, ^c Relación de eficiencia proteica, ^d Retención de proteína neta, ^e Relación de eficiencia proteica calculada, ^f Puntaje de aminoácidos corregido por digestibilidad proteica

Otros autores indican que algunos aminoácidos esenciales son afectados durante las primeras 24 h de fermentación, y largos periodos del bioprocesamiento resultan en una pérdida de treonina, lisina y arginina en 8.9%, 25% y 13.5%, respectivamente (Fung y Crozier-Dodson 2008). Reyes-Bastidas (2008) reporta en garbanzo una mejora sustancial en general del contenido de aminoácidos esenciales como consecuencia del proceso de FES, viéndose los niveles de lisina y triptófano disminuidos. Angulo-Bejarano y col (2008) también observaron en garbanzo una mejora en el contenido de aminoácidos esenciales; el contenido de Ile, aminoácidos azufrados totales (Met + Cys), aromáticos (Phe + Tir), y Thr se incrementaron significativamente.

a. Digestibilidad

La fermentación realiza una pre-digestión de los macronutrientes del sustrato (Mugula y Lyimo 2000) gracias a proteasas secretadas por el hongo (Erdmann y col 2008). Tras la hidrólisis enzimática, las proteínas se desdoblan y disocian, exponiendo regiones hidrofóbicas (Molina y col 2001, Cui y col 2013) por lo que, de esta manera, pueden ser fácilmente digeridas por enzimas digestivas, tales como pepsina y tripsina; mientras más pre-digerida se encuentre la proteína, más alta será la digestibilidad (Ghe y Zhang 1993; Cui y col 2013). Se ha observado que la digestibilidad *in vitro* de soya y frijol aumenta durante la cocción y la fermentación de 37 a 45% y 15 a 41%, respectivamente (Kiers y col 2000). Se reporta un comportamiento parecido en tempe producido a partir de sorgo mezclado con garbanzo y frijol común, en una fermentación realizada a 30°C por 24 y 30 h utilizando como inóculo al hongo *R. oligosporus*, cuya digestibilidad proteica *in vitro*

aumentó de 10 a 14%, la calificación química de aminoácidos de 62 a 69% y la energía aportada por proteína de 14 a 16% (Kiers y col 2000). Angulo-Bejarano y col (2008) reportan un incremento en la digestibilidad *in vitro* tras la fermentación de garbanzo (72.20% vs 83.20%), debido a la eliminación de factores antinutricionales tras la FES y desnaturalización proteínica durante la cocción.

b. Valor biológico de las proteínas

El valor nutricional de los distintos tipos de proteínas difiere según sea su composición de aminoácidos, relación de aminoácidos esenciales, susceptibilidad a hidrólisis durante la digestión, fuente y efectos de procesamiento (Friedman 1996). Reyes-Moreno y col (2000a) al optimizar las condiciones de proceso de FES en garbanzo observaron un incremento en digestibilidad proteínica *in vivo*, PER, NPR, C-PER y PDCAAS bajo las condiciones óptimas de 34.9°C y 51 h de fermentación. Reyes-Bastidas (2008) observó un incremento en el C-PER de tempe de garbanzo en relación a la harina de garbanzo integral, así como un incremento en la calificación química tras el proceso de fermentación. Los resultados de Angulo-Bejarano y col (2008) concuerdan con lo anteriormente descrito, obteniendo valores de PER, C-PER, NPR y PDCAAS mayores para garbanzo fermentado en comparación a los del grano sin tratar.

6. Efecto de la FES de leguminosas sobre niveles y perfiles de fitoquímicos

El **Cuadro 8** muestra el efecto de la fermentación en las leguminosas sobre fitoquímicos. Los factores antinutricionales termolábiles como inhibidores de tripsina y lectinas son lixiviados o inactivados durante el remojo, cocción e hidrólisis enzimática microbiana, mejorando la calidad nutricional del producto fermentado

Cuadro 8. Efecto de la fermentación de leguminosas sobre fitoquímicos

Compuesto bioactivo	Frijol común		Garbanzo	
	Crudo	Tempe	Crudo	Tempe
Fenólicos totales (mg/100g)	192.3	431.33	221-269.38	836±8.5 ^a
Fenólicos libres (mg/100g)	35.91	190.47	93	631±15.5 ^a
Fenólicos ligados (mg/100g)	156.46	240.86	128	205±7.1 ^a
Taninos (mgEC/g)	-	-	4.63	1.24
Inhibidores de tripsina (mgTI/g)	-	-	10.96	1.12
Ácido fítico (mg/g)	6.84	2.85	7.98-10.8	1.1-2.30

Oligosacáridos (g/100g)	Semillas de tubérculo africano				
	Cruda	Sin testa	Remojo	Cocción	Tempe
Rafinosa	0.57	0.48	0.35	0.26	0.02
Estaquiosa	2.15	2.30	1.88	1.38	0.06
Verbascosa	0.14	0.16	0.15	0.1	0.02
Total	2.85	2.94	2.38	1.77	0.1

Isoflavonas (mg/100 g)	Tempe de soya			
	Soya cruda (µg/100g) ²	Soya amarilla	Soya negra	Germen de soya amarilla desgrasada
Agliconas totales		15.7	17.4	382.6
Diazieína		8.0	6.8	206.1
Gliciteína		0.5	0.7	144.5
Genisteína	460-1820	7.2	9.9	32.0
Total de glucósidos		87.0	85.8	494.5
Daizina		1.7	3.3	25.5
Glicitina		0.4	1.0	59.7
Genistina	200.6-968.1	6.4	18.7	21.0
Malonildaidzina		30.2	14.3	171.2
Malonilglicitina		1.4	2.7	98.3
Malonilgenistina		41.8	38.5	44.0
Acetildaidzina		0.9	1.3	20.8
Acetilglicitina		2.6	0.2	10.6
Acetilgenistina		1.6	5.8	43.4
Isoflavonas totales		102.7	103.2	877.1

Recopilado por Sánchez-Magaña (2014). ^a mg EAG/100 g muestra, bs; tras 108 h de fermentación.

(Reyes-Moreno y col 2000a, b; Reyes-Bastidas y col 2010; Roubos van den Hil 2010). Los microorganismos *Aspergillus* spp. y *Rhizopus* spp. utilizados en la FES producen la enzima fitasa, que cataliza la hidrólisis del ácido fítico a fósforo orgánico y ésteres fosfóricos de mioinositol (Wang y col 1980; Sutardi y Buckle 1985; Nair y Duvnjak 1991; Mugula 1992; Al-Asheh y Duvnjak 1994). Los taninos son reducidos en la etapa de descascarillado debido a su localización en la testa; sin embargo, otros autores han reportado que en el proceso de fermentación existe un incremento de taninos debido a la actividad del microorganismo (Muralami y col 1984; Barampama y Simard 1993; McCue y col 2003; Randhir y col 2004a; Lin y col 2006).

Se sabe que la enzima fúngica β -glucosidasa juega un papel importante en la movilización de los compuestos fenólicos durante el bioprocesamiento (McCue y col 2003; Randhir y col 2004a, b; Chaiyasut y col 2010; Cheng y col 2013; Handa y col 2013), catalizando la liberación de agliconas del sustrato, incrementando de esta forma el contenido fenólico. El tipo y niveles de isoflavonas generadas durante la fermentación dependen del inóculo y de la acción catalítica de la β -glucosidasa durante el proceso de FES (McCue y col 2003). Lee y col (2008) y Juan y Chou (2010) encontraron un incremento en antocianinas y flavonoides en frijol negro y soya negra bioprocesados por FES, respectivamente. El proceso de preparación de tempe conduce a pérdidas del 76% del contenido total de isoflavonas. Aproximadamente 12% son pérdidas por lixiviación (remojo y descascarillado) y el 49% durante la cocción (Chaiyasut y col 2010).

7. Efecto de la FES de leguminosas sobre propiedades nutraceuticas

El **Cuadro 9** muestra el efecto de la fermentación de leguminosas sobre su actividad antioxidante y propiedades nutraceuticas.

a. Actividad antioxidante

Recientemente ha incrementado el interés en antioxidantes en alimentos fermentados, así como sus propiedades nutraceuticas y efectos benéficos. Se ha reportado que la actividad antioxidante incrementa después del bioprocesamiento (McCue y col 2003; Lee y col 2008; Reyes-Bastidas y col 2010; Maiti y Majumdar 2012; Salar y col 2012; Cheng y col 2013; Guzmán-Uriarte y col 2013; Sánchez-Magaña y col 2014; Rochín-Medina y col 2015). Además, se observa una mayor estabilidad contra la peroxidación de lípidos, debido a la presencia del antioxidante ácido 3-hidroxiantranílico (HAA), el cual sólo es producido durante la incubación con *Rhizopus oligosporus* (Esaki y col 1996). Guzmán-Uriarte (2013) y Sánchez-Magaña (2014) observaron un incremento en la actividad antioxidante correspondiente a fitoquímicos libres, ligados y totales en el frijol y garbanzo bioprocesado, respectivamente, en comparación al crudo; esta actividad antioxidante se vio incrementada conforme aumentaba el tiempo de fermentación. La fermentación en estado sólido incrementa el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de semillas procesadas con el hongo, lo que incrementa el potencial de funcionalidad relacionada con la salud de estos alimentos (Madeira-Junior y col 2013; Sánchez-Magaña y col 2014; Torino y col 2013). El incremento de la actividad antioxidante de alimentos basados en granos fermentados durante la FES se debe al

Cuadro 9. Efecto de la fermentación de leguminosas sobre su actividad antioxidante y propiedades nutracéuticas

Propiedad	Valor	Propiedad	Valor	Propiedad	Soya negra		Tempe		
<i>Antihipertensiva (inhibición de ECA)</i>		<i>Hipocolesterolémico y antilipémico (mg/Dl)</i>	<i>Antes del tratamiento</i>	<i>Después del tratamiento</i>	<i>Antimutagénica (% de inhibición)</i>	<i>S. typhimurium TA100</i>		<i>S. typhimurium TA98</i>	
						Nitroq	BenP	Nitroq	BenP
Soya cruda	94.95%	Colesterol LDL			Soya negra				
Soya fermentada (6 días)	95.55%	Okara	20.6	23.9	5 mg/plato	41	63	58	44
Soya cruda (IC ₅₀)	5.3 mg/ml	Tempe de okara	19.7	14.0	2.5 mg/plato	23	55	54	30
Soya fermentada (IC ₅₀)	0.61 mg/ml	Colesterol HDL			1.25 mg/plato	11	29	45	23
Hidrolizado frijol (IC ₅₀)	79.22 µg/ml	Okara	84.3	77.8	0.525 mg/plato	2	5	28	9
Hidrolizado tempe de frijol (IC ₅₀)	0.0117 µg/ml	Tempe+harina+lecitina+aceite vegetal+fibra	Aumento de 24% en pacientes		Tempe de soya negra				
		Tempe de okara	87.2	81.8	5 mg/plato	82	85	74	64
		TCL			2.5 mg/plato	61	65	56	42
		Okara	141	140	1.25 mg/plato	48	40	35	25
		Tempe de okara	144	148	0.525 mg/plato	32	21	28	6
<i>Antidiabética (inhibición de α-amilasa)</i>									
Soya cruda	1.99 %	Antioxidante	DPPH (IC50)	β-Caroteno (% inhibición)	ORAC¹	ABTS¹			
Soya fermentada (6 días)	2.08 %	Frijol crudo	20.09%	19.85%					
Frijol africano	~65 %	Tempe de frijol	42.99%	37.83%					
Tempe frijol africano (4 días)	~80 %	Soya cruda	45.64						
Tempe frijol africano (12 días)	~85 %	Soya fermentada (10 días)	18.83						
Garbanzo	3.56	3.56				2,019±10		517±24	
Tempe de garbanzo (108 h)	5.77±0.24	Frijol fermentado ^a				10,160±212 ^d		6,207±286 ^d	
<i>Antidiabética (inhibición de α-glucosidasa)</i>									
Soya cruda	~1 %	Frijol crudo ^b				4,383±13		4,992±325	
Soya fermentada (6 días)	1.1 %	Frijol fermentado ^b				7,308±117 ^d		7,298±389 ^d	
Garbanzo	2.94	Garbanzo crudo ^a		23.85±2.43% ^c		3,032		1,478	
Tempe de garbanzo (108 h)	4.36±0.28	Garbanzo fermentado ^a		36.17±5.35% ^c		10,040±438 ^d		6,837±342 ^d	
		Garbanzo crudo ^b				2192		1820	
		Garbanzo fermentado ^b				4,593±01 ^d		2,869±284 ^d	

Recopilado por Sánchez-Magaña (2014), ^a extracto metanólico libres, ^b extracto metanólico ligados, ^c totales, ^d 108 horas de fermentación; ¹ µmol ET/100 g, bs

incremento de compuestos fenólicos y flavonoides llevado a cabo por hidrólisis enzimática fúngica (Hur y col 2014).

Las enzimas involucradas en la liberación de compuestos fenólicos dependen de los microorganismos empleados en la fermentación. Estas enzimas hidrolizan los enlaces éster de la estructura de la pared celular de los granos, la cual enlaza a los compuestos fenólicos. Consecuentemente, los compuestos fenólicos libres, así como las formas ligadas, se encuentran más disponibles para su extracción. Entre estas enzimas, se ha reportado ampliamente que β -glucosidasa es responsable de catalizar la hidrólisis de enlaces β (1-4) de β -D-glucósidos para liberar fracciones fenólicas de agliconas (Huynh y col, 2014) y se ha correlacionado (McCue y col 2003; Randhir y col 2004a, b; Chaiyasut y col 2010; Cheng y col 2013; Handa y col 2013) el incremento de la actividad enzimática de β -glucosidasa con el aumento en el contenido de polifenoles, resultante de la liberación y acumulación de agliconas, al incrementar el tiempo de fermentación.

Chaiyasut y col (2010) estudiaron el efecto del tiempo de fermentación sobre el contenido de isoflavonas y la actividad antioxidante de soya fermentada, observando que el contenido y perfil de isoflavonas están relacionados con la duración de la fermentación: las agliconas aumentaron y las gliconas de isoflavona con el tiempo de fermentación. Cheng y col (2013) reportaron que *R. oligosporus* tiene potencial para incrementar significativamente el contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante en soya negra. Encontraron que la actividad de β -glucosidasa aumentó con el tiempo de fermentación y resultó en la acumulación de agliconas fenólicas.

b. Propiedad antihipertensiva

Algunos investigadores (Okamoto y col 1995; Aoki y col 2003; Gibbs y col 2004; Kim y col 2010; Torino y col 2013) han reportado un incremento en la actividad antihipertensiva de soya bioprocesada conferida por los biopéptidos presentes en leguminosas, relacionándolo con la acción hidrolítica de enzimas secretadas por el hongo, las cuales hidrolizan las principales proteínas en péptidos de menor tamaño (Erdmann y col 2008). Nakahara y col (2010) evaluaron el efecto antihipertensivo de los péptidos de salsa de soya fermentada, en comparación con la salsa de soya regular; ellos modificaron el proceso de elaboración de salsa de soya para un mayor contenido de péptidos. Las salsas de soya fueron sometidas a hidrólisis ácida, observándose un rendimiento de péptidos de 79 mg/mL en salsa fermentada, contra 29 mg/mL en salsa regular; se observó que la salsa fermentada, con mayor rendimiento de péptidos, presentó una actividad antihipertensiva mayor que la salsa de soya regular (IC_{50} : 454 vs 1620 μ g/mL, respectivamente).

Guzmán-Urriarte y col (2013) reportan un menor IC_{50} en frijol procesado por FES que la leguminosa sin procesar. Resultados similares son reportados por Rochín-Medina y col (2015); esto es atribuido a la hidrólisis parcial de péptidos tras la fermentación.

Además, se ha observado que los compuestos fenólicos (que aumentan durante la FES) confieren propiedades antihipertensivas al producto, ya sea por sus propiedades antioxidantes (Kozuma y col 2005) o por la inhibición de la ECA al competir por el sitio activo (Wagner y col 1991; Chen y Lin 1992; Wei y col 1992; Actis-Goretta y col 2003).

c. Propiedad antimutagénica

Hung y col (2007) mostraron que los extractos metanólicos de soja negra procesada por FES con *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus sojae*, inhibieron mutagénesis por 4-nitroquinolina-N-óxido, un mutágeno directo y benzo[*a*]pireno, un mutágeno indirecto, en *S. typhimurium* TA100 y TA98, aumentando el efecto anti-mutagénico tras el bioprocesamiento de soja negra, obteniendo mejores resultados con *Aspergillus awamori*, de 92% y 89% de inhibición para cada mutágeno, respectivamente. Los glucósidos flavonoides son menos antimutagénicos que las agliconas correspondientes tales como la daidzeína, genisteína y gliciteína (Edenharder y Tang 1997). Los hongos son capaces de producir β -glucosidasa, que promueve la escisión del enlace β -glicosil en los glucósidos de isoflavonas de leguminosas para formar agliconas (Lee y Chou 2006; McCue y Shetty 2003), promoviendo su incremento. Por lo tanto, estos cambios pueden conducir a la actividad antimutagénica mejorada. Sin embargo, la formación de otros compuestos bioactivos y el aumento de contenido de ácido linoleico en sustratos fermentados, según lo informado por Park y col (2003), también puede contribuir a la antimutagenicidad mejorada.

d. Propiedad anticarcinogénica

El-Sayed (2009) obtuvo L-glutaminasa, una enzima anticarcinogénica mediante FES por *Trichoderma koningii* utilizando diferentes subproductos agroindustriales como sustratos sólidos, incluyendo harina de soja, con la que se obtuvo una actividad específica de 5 U/mg de proteína y un rendimiento de enzima de 7 U/g (bs). Los compuestos fenólicos se consideran posibles agentes para combatir cáncer

(Aparicio-Fernández 2006), los cuales se ven incrementados en leguminosas mediante el proceso de FES (McCue y col 2003; Lin y col 2006; Randhir y Shetty 2007; Lee y col 2008; Oboh y col 2009; Juan y Chou 2010; Reyes-Bastidas y col 2010). El almidón resistente tiene efectos benéficos sobre distintos tipos de cáncer (Cardador-Martínez y col 2002a, b). En garbanzo, este tipo de almidón se vió incrementado tras la cocción, previa a la fermentación (Sánchez-Magaña 2014), debido a la retrogradación de la amilosa durante el procesamiento térmico (Ratnayake y col 2001; Osório-Díaz y col 2003; Tharanathan y Mahadevamma 2003), lo que podría aumentar sus efectos benéficos sobre el cáncer.

IV JUSTIFICACIÓN

El garbanzo es una leguminosa importante en términos económicos y nutricionales, a cuyos componentes se les han atribuido propiedades benéficas para la salud, tales como antioxidante y antihipertensiva.

La fermentación en estado sólido es un bioproceso que mejora las características nutricionales y nutracéuticas que poseen las leguminosas.

Es por ello que se propone obtener un alimento funcional (harina) a partir de garbanzo bioprocesado por FES, el cual posea potenciales antioxidante y antihipertensivo altos.

V HIPÓTESIS

Aplicando condiciones óptimas del bioproceso de FES se puede obtener un alimento funcional (harina) de garbanzo con valores de contenido de compuestos fenólicos totales, potenciales antioxidante y antihipertensivo altos.

VI OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Encontrar la mejor combinación de temperatura y tiempo de fermentación en estado sólido para la elaboración de una harina de garbanzo (*Cicer arietinum* L) bioprocesado con valores de contenido de compuestos fenólicos totales, potencial antioxidante y rendimiento de hidrolizado altos.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimizar el bioproceso de fermentación en estado sólido (FES) de garbanzo para encontrar la mejor combinación de temperatura y tiempo de fermentación para la obtención de una harina de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO) con potencial antioxidante, contenido de compuestos fenólicos totales y rendimiento de hidrolizado altos.
2. Evaluar composición química y propiedades fisicoquímicas de HGBO.
3. Evaluar potencial antioxidante, compuestos fenólicos totales y rendimiento de hidrolizado de HGBO.
4. Evaluar potencial antihipertensivo de HGBO.

VII MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIALES

Como material se utilizó garbanzo (*Cicer arietinum* L.) variedad Blanco Sinaloa 92, sembrado y cultivado en la ciudad de Culiacán, Sinaloa, México. Como inóculo se utilizó al hongo *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710.

B. MÉTODOS

1. Caracterización física de los granos de garbanzo Blanco Sinaloa 92

a. Dimensiones (largo, ancho y grosor)

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

b. Peso de 100 granos

Se determinó el peso de 100 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.

e. Porcentaje de testa

Se utilizó el procedimiento reportado por Reyes-Moreno y col (2000). 25 granos se remojaron en 3 volúmenes de agua destilada a temperatura ambiente por 4 h. El material se drenó y se eliminó el exceso de humedad por medio de papel absorbente. A los granos se les eliminó la cascarilla manualmente para separar testa y cotiledones. Los materiales se secaron en una estufa a 60°C por 48 h, se enfriaron y se colocaron en desecadores. El porcentaje de testa se calculó con la siguiente fórmula:

$$PT = [(PTS)/(PCS+PTS)] \times 100$$

Donde: PT = porcentaje de testa; PTS = peso de testa seca, g; PCS = peso de cotiledones secos, g. La determinación se realizó por triplicado.

2. Composición química de garbanzo Blanco Sinaloa 92

a. Humedad

Se determinó humedad en las muestras aplicando el método 925.09B de la AOAC (1999). Se calculó la pérdida de peso de 2 g de muestra, después de calentar a 130°C durante 1 h en una estufa con circulación de aire forzado (FELISA mod 142^a, México).

b. Proteína cruda

Se utilizó el método 960.52, microKjeldahl, de la AOAC (1999) para la determinación de nitrógeno en un sistema Kjeltex (Mod 1009 y 1002, Tecator, Suecia). Se digirieron 0.2 g de muestra, con 5 mL de ácido sulfúrico y mezcla reactiva de selenio (Merck Co., Alemania) a una temperatura de 200°C. En la destilación de la muestra, previamente diluída con 10 mL de agua, se emplearon

disoluciones de NaOH al 40% y ácido bórico al 4% como indicador para recibir el destilado. La titulación se llevó a cabo con una disolución valorada de HCl 0.1 N. Posteriormente, la proteína cruda se calculó por multiplicación del contenido de nitrógeno total por el factor 6.25.

c. Grasa cruda

Se extrajo 1 g de muestra en un sistema Soxtec (Mod 1043, Tecator, Suecia) durante 4 h a 70°C con éter de petróleo, y se cuantificó según lo recomendado por el método 920.39C de la AOAC (1999).

d. Minerales

El contenido de cenizas se determinó de acuerdo con el método 923.03 de la AOAC (1999). Este se calculó a partir de la pérdida de peso de 2 g de muestra después de incineración en una mufla (Felisa mod FE 330, México) a 550°C durante 3 h.

e. Carbohidratos

Se determinó por diferencia, tomando en cuenta los porcentajes de proteína, grasa y cenizas.

f. Fibra dietaria total

Se determinó de acuerdo al método oficial 985.29 (AOAC 1999), siguiendo las instrucciones del kit de análisis de fibra dietaria total (TDF-100, Sigma). A 1 g de muestra seca desgrasada se le agregaron a 50 mL de solución reguladora de fosfato (pH 6) y se gelatinizó (95°C, 10 min) con 100 µL de alfa-amilasa, posteriormente se ajustó el pH a 7.5 e hizo una digestión enzimática con 100 µL de solución de proteasa (5 mg) (60°C, 30 min), se ajustó el pH (4-4.6) y se agregaron 100 µL de

amiloglucosidasa (60°C, 30 min) para degradar las proteínas y almidón. Se precipitó la fibra adicionando cuatro volúmenes de etanol. El residuo total se filtró y lavó con etanol al 78%, etanol al 96% y acetona. Posteriormente el residuo se secó (70°C, 12 h), se registró el peso, se determinó el contenido de proteína y cenizas del residuo. El contenido de fibra dietética total se calculó empleando la siguiente formula:

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

Dónde: Peso del residuo = promedio de los pesos (mg) de los residuos de las muestras; P y A = pesos (mg) de proteína y cenizas de los residuos; Peso de la muestra = promedio de los pesos (mg) de las muestras crudas.

3. Propiedades fisicoquímicas de harina de garbanzo Blanco Sinaloa 92

a. Actividad de agua (Aw)

Para su determinación se utilizó un equipo marca Aqualab mod CX2 (Decagon Devices Inc, Pullman, WA, EUA). Una muestra de aproximadamente 2 g se colocó en la celda portamuestras del equipo hasta que alcanzó el equilibrio (40-60 min). El instrumento se calibró con una disolución saturada de cloruro de potasio ($a_w = 0.876$). Las mediciones se realizaron por triplicado a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (Milán-Carrillo y col 2002).

b. Diferencia total de color (ΔE)

El color se determinó con un colorímetro, según la metodología de Reyes-Moreno y col (2000), utilizando un colorímetro Minolta Chroma-meter mod CR-210 (Minolta LTD, Japón). 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:

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

Donde: 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 se determinó de acuerdo al método 943.02, AOAC (1999), preparando una suspensión con 10 g de harina y 100 mL de agua destilada a 25°C, recientemente hervida, se agitó por 10 min a velocidad moderada. Posteriormente, en agitación se introdujo un electrodo para medir el pH. La determinación se realizó por triplicado.

d. Índice de absorción de agua (IAA)/ índice de solubilidad en agua (ISA)

Se utilizó el método descrito por Anderson y col (1969). El índice de absorción de agua fue calculado como gramos de gel formados por gramo de muestra seca después de la centrifugación (3000 x g/ 30°C/10 min) de una suspensión de harina (2.5 g de harina/30 mL de agua). El índice de solubilidad en agua se evaluó pesando los sólidos obtenidos después de evaporar en una estufa el sobrenadante de las muestras. Se expresó como el porcentaje de sólidos secos en 2.5 g de muestra. Las pruebas se realizaron por triplicado.

e. Índice de formación y estabilidad de espuma (FEE)

Se determinó mediante la metodología de Hauffman y col (1975), con ligeras modificaciones. En una probeta de 100 mL se agregaron 0.5 g y 50 mL de agua destilada, se agitaron en un Ultraturrax durante 1 min a 12,000 rpm, fue medido el

volumen de espuma formado. La capacidad de formación de espuma se reportó como porcentaje (%CFE) y fue calculada con la siguiente ecuación:

$$\%CFE = \frac{\text{Volumen después de agitación} - \text{volumen antes de agitación}}{\text{Volumen antes de agitación}} \times 100$$

La muestra anterior se dejó reposar durante 30 min, se midió el volumen de espuma residual y la estabilidad de la espuma se expresó como porcentaje de estabilidad de espuma (%EE) mediante la siguiente ecuación:

$$\%EE = \frac{\text{Volumen de espuma después del reposo}}{\text{Volumen total de la espuma}} \times 100$$

f. Actividad y estabilidad de emulsión (AEE)

Se utilizó la metodología reportada por Hauffman y col (1975) con ligeras modificaciones. 0.7 g de muestra y se disolvieron con 10 mL de agua destilada, se adicionaron 10 mL de aceite vegetal, se agitaron en homogenizador Ultraturrax a 12,000 rpm durante 1 min, fue distribuido en dos tubos cónicos graduados para centrífuga y se centrifugó (1,300xg/25°C/5 min). El volumen de emulsión formada se determinó relacionando la capa emulsificada y el volumen total, se reportó como porcentaje de actividad de emulsión (%AE).

La estabilidad de emulsión se determinó usando los mismos tubos utilizados en la determinación de %AE. Los tubos fueron tratados térmicamente en un baño María (80°C/30 min), se enfriaron y fueron centrifugados (1300xg/25°C/ 5 min). Se midió el volumen de emulsión y el porcentaje de estabilidad de emulsión (%EEm) se expresó como porcentaje de emulsión retenida después del tratamiento térmico. Las pruebas se realizaron por triplicado.

g. 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 dejó reposar por 30 min. Luego se cenntrifugaron 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.

h. 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 homogenizaron en Ultraturrax (10,000 rpm x 5 min). La separación de las fases se midió después de 30 min de reposo.

4. Obtención de harinas de garbanzo bioprocesadas (HGB) por fermentación en estado sólido

El método utilizado para la obtención de harinas de garbanzo bioprocesado fue el reportado por Guzmán-Uriarte y col (2013) y Sánchez-Magaña y col (2014) (Figura 3).

a. Preparación del sustrato

Se utilizaron varios lotes de 200 g de granos de garbanzo. Los granos se remojaron en disolución acuosa de ácido acético glacial (pH = 3.0) en una relación 1:3 (p/v) durante 16 h. Después del remojo, la testa del garbanzo se eliminó

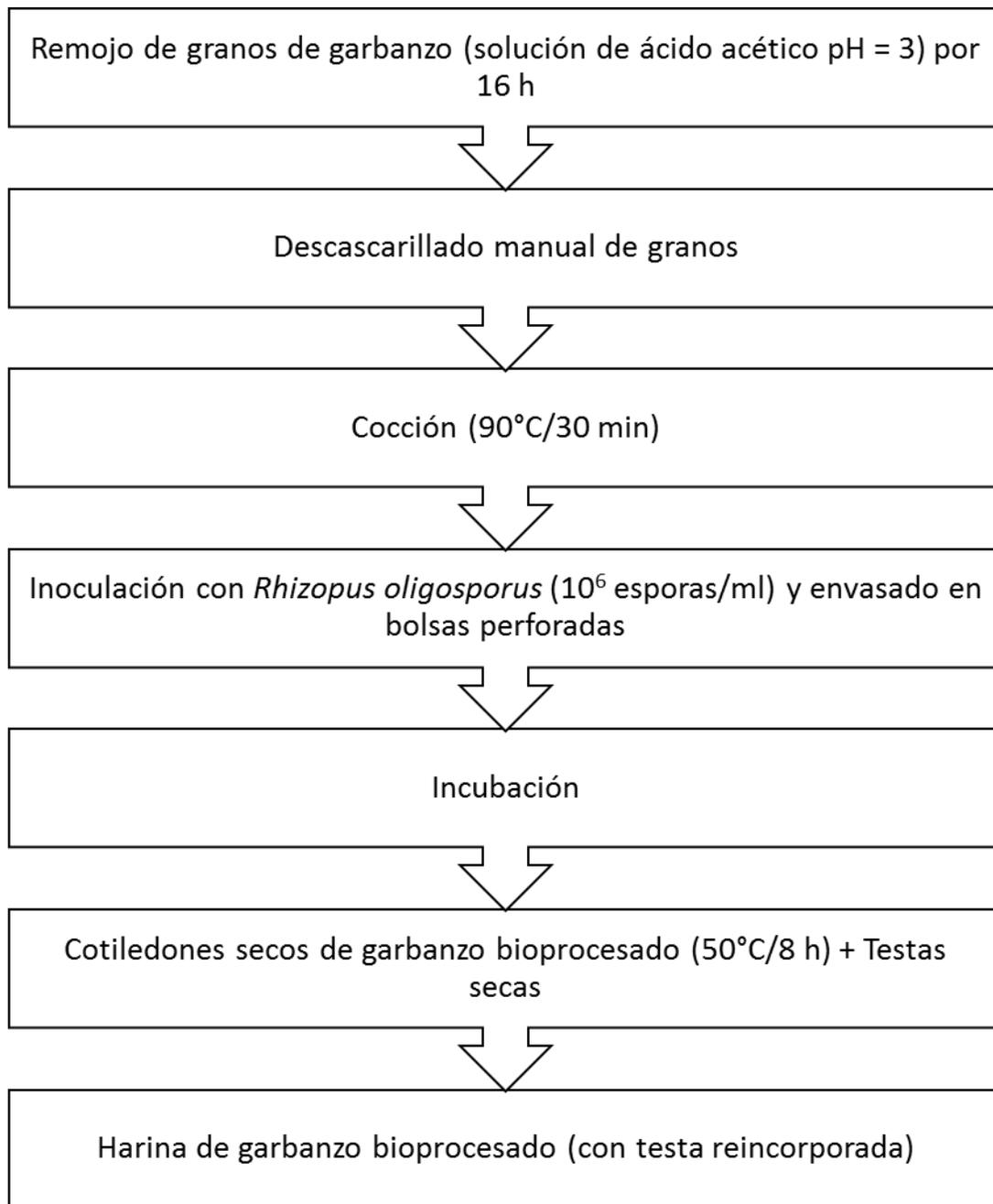


Figura 3. Obtención de harina de garbanzo bioprocesada por FES (Sánchez-Magaña y col 2014)

manualmente, se secó (11% humedad), se molturó hasta pasar por malla 80 (0.180 mm) y almacenó (4 °C) en recipientes herméticos hasta su utilización. Los cotiledones se cocieron en el agua de remojo a 90°C por 30 min. Los sustratos se drenaron y enfriaron a temperatura ambiente.

b. Inóculo

Para llevar a cabo la fermentación, se utilizó el microorganismo *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 (American Type Culture Collection, Manassas, USA). La cepa se propagó en tubos de ensaye los cuales contenían agar papa dextrosa, a 37 °C durante 2-3 días hasta obtener la adecuada esporulación.

Los cultivos producidos se guardaron en refrigeración a 4°C y se resembraron cada mes para su conservación. Para la obtención de la concentración de esporas requeridas (1×10^6 esporas/ml) se utilizó el método nefelométrico de McFarland (Leptospira Laboratory 1997) el cual se basa en la preparación de una suspensión para posteriormente medir la absorbancia y determinar el número de células o esporas que se encuentran suspendidas por mililitro de suspensión, de ese modo se obtuvo la solución de esporas (Paredes-López y Harry 1989).

c. Fermentación

Para llevar a cabo la fermentación, se adicionaron 6 mL de suspensión de esporas por cada 200 g de sustrato, se mezcló con una espátula de acero inoxidable para lograr una distribución homogénea. Se hicieron lotes pequeños de 200 g de la mezcla sustrato-inóculo y se colocaron en bolsas de polietileno de 15 x 25 cm con pequeñas perforaciones realizadas con una aguja de coser (4 cm de distancia). Los

lotes se colocaron en una incubadora (Riossa mod EC-33, México) para llevar a cabo la fermentación.

d. Obtención de harinas

Una vez llevado a cabo el proceso de fermentación en cada uno de los tiempos, las muestras se secaron en estufa (50°C/12 h), enfriaron (25°C) y molturaron (Molino Tecator, mod 1083, Suecia) hasta obtener harinas que atravesaran malla 80 (0.180 mm). Se agregó su testa obtenida anteriormente para obtener harinas integrales de garbanzo bioprocesado. Se almacenaron (4°C) en recipientes con cierre hermético hasta su utilización.

5. Evaluación de la actividad antioxidante (AAox), compuestos fenólicos totales (CFT) y rendimiento de hidrolizado (RH) en harinas de garbanzo bioprocesado (HGB) por fermentación en estado sólido

Se obtuvieron extractos de fitoquímicos libres y ligados, así como hidrolizados proteicos para evaluar actividad antioxidante, compuestos fenólicos totales y rendimiento de hidrolizados; el material sin procesar fue utilizado como referencia.

a. Extracción de fitoquímicos libres

La extracción de fitoquímicos libres se realizó de acuerdo al método descrito por Adom y Liu (2002). Los fitoquímicos libres se extrajeron de 0.5 g de muestra (proveniente de cada tiempo y temperatura de fermentación), 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. Después se centrifugó a 3,000 xg/10°C durante 10 min. El sobrenadante se colocó en un tubo cónico y se concentró a 45°C a presión baja (Apud Vac Concentrator, Thermo Elector Corporation) hasta alcanzar un volumen final de 2 mL.

El concentrado se almacenó a -20°C hasta su posterior utilización en la determinación de capacidad antioxidante y fenólicos correspondientes a fitoquímicos libres. El precipitado se guardó para la obtención de los extractos fitoquímicos ligados.

b. Extracción de fitoquímicos ligados

La extracción de fitoquímicos ligados se realizó según el procedimiento de Adom y Liu (2002), con ligeras modificaciones (Mora-Rochín y col 2010). El precipitado fue digerido con 10 mL de NaOH 2 M, se eliminó el oxígeno con presencia de N_2 gas y la muestra se sometió a tratamiento térmico, en baño María a $95^{\circ}\text{C}/30$ min, posteriormente se agitó durante 1 h a temperatura ambiente (25°C). La mezcla se neutralizó con 2 mL de HCl concentrado, se agitó por 2 min en un vórtex y se centrifugó a $3,000\times g/10^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Posteriormente se realizó una extracción con hexano para remover lípidos y se realizaron extracciones de los fitoquímicos ligados con acetato de etilo, el cual fue colectado y almacenado en tubos cónicos; esta extracción se realizó 5 veces. La fracción de acetato de etilo se evaporó hasta sequedad (Apuc Vac Concentrator, Thermo Electror Corporation). Los compuestos extraídos se reconstituyeron con metanol y almacenaron a -20°C hasta su posterior utilización.

c. Actividad antioxidante (AAox) hidrofílica total

Se determinó la capacidad de captación de radicales libres mediante el método de ABTS [ácido 2,2'-azino-bis (3-etibenzotiazolina-6-sulfónico)], el cual es un potente radical libre. El ensayo se realizó según la metodología reportada por Re y col (1999), con algunas modificaciones. Este método se basa en la generación de un

cromóforo del radical ABTS* (color verde) y la capacidad del antioxidante para decolorar este radical. Se preparó una solución de ABTS mezclada con persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) a una concentración de 2.45 mM en etanol, la solución restante se almacenó en oscuridad por 16 h para permitir el desarrollo del radical. Posteriormente se realizó una dilución de la solución en agua desionizada hasta alcanzar una absorbancia de 0.7 – 1.0 a 735 nm. Se prepararon diluciones de los extractos de los fitoquímicos libres y ligados en agua desionizada a diferentes concentraciones, se tomaron 20 μ l del blanco (agua) y se mezclaron con 1980 μ l de la solución de ABTS*, se homogeneizaron suavemente y su absorbancia fue leída después de 15 min a 735 nm. La capacidad antioxidante de los hidrolizados se expresó en μ mol equivalentes de Trolox (ET)/100g de muestra, base seca (bs).

d. Compuestos fenólicos totales (CFT)

Para determinar la concentración de compuestos fenólicos totales (libres + ligados) se empleó el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton y col (1999). En una placa de 96 celdas, se agregaron 20 μ l de una solución estándar de ácido gálico para construir una curva de calibración, en las siguientes celdas se agregaron 20 μ l de extracto de fitoquímicos libres y ligados y se utilizó etanol como blanco. El estándar y los extractos se mezclaron con 180 μ l del reactivo de Folin, la reacción se neutralizó con 50 μ l de Na_2CO_3 al 7% y posteriormente se incubó en el espectro. Después de 90 min se midió la absorbancia a 750 nm en un lector de microplatos (Synergy HT, Biotek Instrument). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (GAE) / 100 g de muestra, bs. El contenido de

compuestos fenólicos totales se calculó al sumar los compuestos fenólicos presentes en los extractos de fitoquímicos libres y ligados.

e. Rendimiento de hidrolizados

1) Obtención de hidrolizados proteicos

Las HGB fueron sometidas a hidrólisis enzimática con pepsina y pancreatina (una mezcla de enzimas digestivas); su acción simula la digestión gastrointestinal. Esto fue realizado siguiendo las metodologías descritas por Adler-Nissen (1986) y Humiski y Aluko (2007) con modificaciones. Se suspendieron 3 gramos de cada una de las harinas en agua desionizada para obtener soluciones al 10%, posteriormente se ajustó el pH a 2.0 y los matraces se colocaron a baño María a 37°C, con agitación. Se agregó la cantidad de pepsina correspondiente para tener una relación enzima-proteína 1:10. Después de tres horas de hidrólisis, durante las cuales se mantuvieron la temperatura y el pH constantes, se ajustó el pH a 7.5 y se agregó la cantidad de pancreatina correspondiente para tener una relación enzima-proteína 1:10. La hidrólisis se realizó por dos horas, manteniendo la temperatura y pH constantes. La hidrólisis enzimática se detuvo ajustando el pH de la solución a 4.0 con HCl 2 M, seguida de un tratamiento térmico (95°C/10 min). La proteína hidrolizada se centrifugó (10,000 x g/30 min/25°C) y se recuperó el sobrenadante, que corresponde a la fracción hidrolizada.

2) Determinación de rendimiento de hidrolizados de HGB

La concentración de péptidos en los hidrolizados de HGB se determinó colorimétricamente mediante el método del ácido bicinconínico (Brown y col 1989).

Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) como estándar en la construcción de la curva de calibración.

El valor de rendimiento de hidrolizado se calculó mediante la siguiente fórmula (Nakahara y col 2010, Nalinanon y col 2011, Ramakrishnan y col 2013):

$$\text{Rendimiento de hidrolizado} = \frac{\text{Proteína en hidrolizado de HGB}}{\text{Proteína en HGB}} \times 100$$

6. Optimización del bioproceso de fermentación de los granos de garbanzo

a. Diseño experimental, análisis de regresión y análisis de varianza

Para determinar las condiciones óptimas para la producción de harina de tempe de garbanzo a través del proceso de FES, se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) y un diseño central compuesto rotatable (DCCR). Datos de la literatura y ensayos preliminares se tomaron en cuenta para seleccionar el número y los niveles de variación de las variables de proceso en el diseño experimental, para esto se trabajaron temperaturas de 22-45°C y tiempos de 6 a 132 h (Reyes-Moreno y col 2004; Guzmán-Uriarte y col 2013; Sánchez-Magaña y col 2014; Rochín-Medina y col 2015). Se utilizó un diseño central compuesto rotatable (DCCR), con dos factores [temperatura de fermentación (TF, 22 – 45°C), tiempo de fermentación (tF, 6 – 132 h)] y cinco niveles de variación (**Cuadro 10**). Los experimentos individuales fueron llevados a cabo en orden aleatorio.

Se asumió un modelo de regresión cuadrático para predecir las variables de respuesta (Y). Se desarrollaron modelos de predicción para cada una de las variables de respuesta:

Cuadro 10. Diseño experimental utilizado para obtener diferentes combinaciones de temperatura de fermentación/tiempo de fermentación para producir harinas de garbanzo bioprocesado

Orden estándar	Orden de corrida	Temperatura de fermentación (°C)	Tiempo de fermentación (h)
1	12	25.4	24.5
2	6	41.6	24.5
3	3	25.4	113.6
4	9	41.6	113.6
5	5	22.0	69.0
6	8	45.0	69.0
7	7	33.5	6.0
8	1	33.5	132.0
9	4	33.5	69.0
10	11	33.5	69.0
11	2	33.5	69.0
12	13	33.5	69.0
13	10	33.5	69.0

$$Y_k = \beta_{k0} + \sum_{i=1}^2 \beta_{ki} X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{kii} X_i^2 + \sum_{i=1}^1 \sum_{j=1+1}^2 \beta_{kij} X_i X_j + \varepsilon$$

Donde \hat{Y}_i es el valor predicho de la variable de respuesta considerada (AAox o CFT), X_1 y X_2 son los valores de TF y tF, respectivamente, β_{k0} es el valor del intercepto, β_{ki} es un coeficiente lineal, β_{kij} es un coeficiente de interacción y β_{kii} es un coeficiente cuadrático. Aplicando un análisis de regresión, los términos no significativos ($p > 0.1$) fueron eliminados del polinomio de segundo orden y un nuevo polinomio fue recalculado, obteniendo un modelo de predicción para cada variable de respuesta (AAox, CFT y RH). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software de Design Expert software Ver. 7.0.0.

b. Optimización del proceso de fermentación

Se aplicó el método numérico de deseabilidad descrito por De la Vara y Domínguez (2002) para encontrar la mejor combinación de variables de proceso [TF/tF] que resultan en una HGB con óptimos valores de las variables dependientes (AAox, CFT y RH). La combinación de las respuestas en una función de deseabilidad requiere el cálculo de la función de deseabilidad de forma individualizada. Se predijeron valores para cada variable de respuesta [$Y_1(X)$, $Y_2(X)$, $Y_3(X)$] a partir de los modelos matemáticos de predicción correspondientes, mediante la selección de un punto de la zona experimental $X = (X_1, X_2, X_3)$.

Cada $\hat{Y}_i(X)$ fue transformado a un valor de deseabilidad individual $d_i(X)$, el cual está en el rango 0 – 1, midiendo el grado de deseabilidad de la respuesta en referencia al óptimo valor determinado a ser alcanzado. En esta investigación, se

deseó que los valores de las variables de respuesta fueran lo más altos posible. Por ende, la transformación matemática para el cálculo de d_i fue:

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

donde: $d_i(X)$ = Valor de la deseabilidad de la i^{a} variable de respuesta, $\hat{Y}_i(X)$ = Respuesta estimada de la variable, Y_i^* = Máximo valor aceptable de la i^{a} variable de respuesta, Y_{i*} = Mínimo valor aceptable de la i^{a} variable de respuesta. Una vez calculadas las tres deseabilidades individuales, éstas se utilizaron para el cálculo de la deseabilidad global (D), utilizando la función matemática de transformación $D = (d_1 * d_2 * d_3)^{1/3}$. El software seleccionó varios puntos experimentales (X) de manera aleatoria y calculó los valores correspondientes de D en cada punto experimental. Tales valores fueron utilizados para la construcción de un gráfico de deseabilidad global, en el cual la zona roja representa los valores predichos máximos posibles para cada respuesta, de entre los cuales se seleccionó un valor óptimo con las condiciones de FES (TF, tF) que dieron por resultado los valores de AAox, contenido de CFT y RH máximos posibles. Este valor fue encontrado usando el programa Design Expert versión 7.0.0.

7. Composición química de harina de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO)

La composición química de HGBO se evaluó según lo descrito en el apartado VII.B.2.

8. Propiedades fisicoquímicas de harina de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO)

Las propiedades fisicoquímicas de HGBO fueron evaluadas según lo descrito en el apartado VII.B.3.

9. Actividad antioxidante hidrofílica en harina de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO)

a. Método ABTS

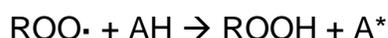
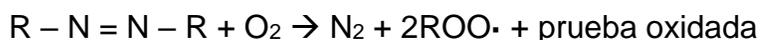
La actividad antioxidante hidrofílica total se determinó de acuerdo a lo establecido en la sección VII.B.5.c del presente trabajo.

b. Método ORAC

La determinación de capacidad antioxidante hidrofílica total se llevó a cabo por el método de capacidad de absorbanza de radicales oxígeno (oxygen radical absorbance capacity, ORAC), se llevó a cabo desarrollado para compuestos hidrofílicos (Cao y col 1993; Ou y col 2001; Wu y col 2004). La degradación térmica del compuesto 2-2'-Azobis amidinopropano (AAPH) produce radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), los cuales oxidan al compuesto fluorescente, diclorofluoresceína (DCFH) al compuesto no fluorescente, diclorofluoresceína ($\text{DCF}\cdot$). El grado de inhibición de los antioxidantes (fitoquímicos) de atrapar o secuestrar los radicales es usado como base para calcular la actividad antioxidante.

Para preparar la solución generadora de radicales libres AAPH, se pesaron 0.207 g del reactivo y se aforó en un matraz volumétrico de 5 ml con solución reguladora de fosfato (pH 7.4). La fluoresceína se preparó hasta el final, ya que puede ser oxidada muy lentamente en condiciones ambientales, a una concentración de 0.1 μM con

fosfato (pH 7.4). Se realizaron diluciones correspondientes para los extractos de las muestras (fitoquímicos libres y ligados) usando una solución reguladora de fosfato (pH 7.4) y posteriormente se transfirieron 25 µl de cada dilución a una placa de 96 celdas. La placa con las muestras se colocó en el lector de microplatos (Synergy Multi-Detection, BioTek, Inc, Winooski, VT) del espectrofotómetro fluorescente, por medio de un autodispensador del equipo se agregaron 150 µl de fluoresceína a cada celda del microplato, la solución se mezcló agitando a 1200 rpm por 20 segundos. La reacción se inició agregando 25 µl de AAPH por medio del autodispensador del equipo previamente programado. Las muestras y el control se analizaron por cuatruplicado. La reacción se llevó a 37°C y la fluorescencia se midió a 485 nm de excitación y 538 nm de emisión. Los datos se recolectaron por el software del equipo. La reacción con los radicales peroxilo genera la pérdida de la fluorescencia con el tiempo como se indica en la siguiente reacción de radicales peroxilo con los compuestos fluorescentes.



El efecto de un antioxidante es integrado por el área neta bajo la curva sobre la pérdida de fluorescencia (AUC) $[AUC_{AOX} - AUC_{no\ AOX}]$. Los valores ORAC se reportaron como equivalentes de Trolox. Se generó una curva estándar de cinco puntos (concentración de 25 a 100 µM), y los equivalentes de Trolox de la muestra se calcularon usando la siguiente ecuación lineal o cuadrática ($Y = a + bX$, lineal; o $Y = a + bY - cX^2$, cuadrática) que relaciona la concentración de Trolox (Y) (µM) y el área neta bajo la curva de la disminución de la fluoresceína (X) $[ABC_{muestra} - ABC_{blanco}]$. La

regresión lineal se utilizó en un rango de 100-25 μM de Trolox. Los datos se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox en (ET) por 100 g (bs) de muestra ($\mu\text{mol ET}/100 \text{ g, bs}$) (Ou y col, 2001; Prior y col, 2005).

10. Compuestos fenólicos totales en harina de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO)

Los compuestos fenólicos totales determinaron de acuerdo a lo establecido en el apartado VII.B.5.d del presente trabajo.

11. Rendimiento de hidrolizado en harina de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO)

El rendimiento de hidrolizado se determinó de acuerdo a lo establecido en el apartado VII.B.3.e del presente trabajo.

12. Evaluación de potencial antihipertensivo de HGBO (inhibición de ECA por hidrolizado proteínico de HGBO)

La inhibición de la ECA se determinó mediante el kit ACE Kit-WST (A502-10), que se basa en la detección colorimétrica de ácido 3-hidroxi-butílico (3HB) generado a partir del 3-hidroxi-butiril-Gly-Gly-Gly (3HB-GGG). La ECA hidroliza Gly-Gly, generando 3-hidroxi-butiril-Gly; posteriormente, por acción de una aminoacilasa, se obtiene ácido 3-hidroxi-butílico, el cual próximamente se hace reaccionar con una solución indicadora. En una microplaca se agregaron 20 μL de los hidrolizados a evaluar, posteriormente se agregó el sustrato 3HB-GGG y la ECA, además de un blanco 1 (sin muestra) y un blanco 2 (sin muestra ni solución enzimática). La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 1 h en una incubadora y posteriormente se agregaron 20 μL de la solución indicadora. Se incubó por 10 min a temperatura

ambiente y enseguida se midió la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm en un lector de microplacas.

Para determinar el porcentaje de inhibición se preparó una curva de inhibición utilizando la concentración de la muestra para el eje X y el porcentaje de inhibición de ECA para el eje Y, calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{Abs_{blanco\ 1} - Abs_{muestra}}{Abs_{blanco\ 1} - Abs_{blanco\ 2}} \times 100$$

13. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos para HGBO se analizaron estadísticamente con un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía y las medias de los resultados se compararon con la prueba de rangos múltiples de Duncan, con un nivel de significancia de 0.05 (Statgraphics-Plus 6.0).

VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE GRANOS Y HARINA DE GARBANZO CRUDO (SIN PROCESAR)

1. Características físicas de granos de garbanzo Blanco Sinaloa 92

En el **Cuadro 11** se muestran las características físicas del grano de garbanzo Blanco Sinaloa 92.

Las características físicas de los granos enteros son indicadores importantes de la calidad comercial, manejo y almacenamiento de los mismos. Tales características están relacionadas con las características de remojo y calidad de cocción de los granos. Los granos de garbanzo presentaron las siguientes dimensiones en promedio: 1.27 cm de largo, 0.92 cm de ancho y 0.95 cm de grosor.

El peso de 100 granos indica el tamaño del grano y el peso hectolítrico es una medida indirecta de la densidad del grano. El garbanzo presentó un peso de 100 granos de 65.83 g y peso hectolítrico de 78.40 kg/hL.

El porcentaje de testa está relacionado con la calidad de cocción y mayor tendencia al endurecimiento; a mayor porcentaje menor calidad de cocción y mayor tendencia al endurecimiento (Reyes-Moreno y col 1994). El porcentaje de testa de garbanzo fue de 4.29%.

Las características físicas de los granos de garbanzo fueron similares a las reportadas por Reyes-Bastidas (2008), Quintana-Najera (2014) y Argüelles-López (2015), por lo que se puede concluir que el garbanzo utilizado es de buena calidad.

Cuadro 11. Características físicas del grano de garbanzo variedad Blanco Sinaloa 92

Características físicas	
Dimensiones (cm)	
Largo	1.27 ± 0.06
Ancho	0.92 ± 0.05
Grosor	0.95 ± 0.06
Peso de 100 granos (g)	65.83 ± 0.95
Peso hectolítrico (kg/hL)	78.40 ± 0.35
% testa	4.29 ± 0.17

† Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar

2. Composición química y propiedades fisicoquímicas de harina de garbanzo crudo (sin procesar) variedad Blanco Sinaloa 92

El **Cuadro 12** muestra la composición química y las propiedades fisicoquímicas de la harinas de garbanzo crudo. El contenido de proteína cruda fue de 20.93%. Este valor se encuentra dentro del rango reportado por Reyes-Moreno y col (2004), Reyes-Bastidas (2008), Quintana-Najera (2014) y Argüelles-López (2015), para el mismo tipo de garbanzo. El contenido de lípidos (6.85%) es cercano a lo reportado por los mismos autores.

El contenido de cenizas es un reflejo del contenido de minerales presentes en el grano; en garbanzo, se obtuvo un 3.62% de cenizas. Este grano es una buena fuente de minerales tales como calcio, fósforo, magnesio, hierro y potasio (William y Singh 1987).

La harina de garbanzo crudo presentó un contenido de fibra dietaria insoluble (FDI), soluble (FDS) y total (FDT), en base seca, de 12.58%, 3.25% y 15.83%, respectivamente. El contenido de FDS y FDT fue ligeramente superior a los reportados por Argüelles-López (2015) (0.57 y 12.7%, bs, respectivamente), para esta misma variedad de garbanzo.

En el **Cuadro 12** se muestran las propiedades fisicoquímicas de la harina de garbanzo crudo. Éste obtuvo un valor Hunter "L" de 88.45 y una diferencia total de color (ΔE) de 17.50; este parámetro representa la diferencia total de color en referencia a un estándar color blanco. Valores mayores de ΔE significan harinas más oscuras. La harina de garbanzo crudo presentó un valor de actividad acuosa de 0.45,

Cuadro 12. Composición química y propiedades fisicoquímicas de harina de garbanzo crudo (sin procesar) variedad Blanco Sinaloa 92

Propiedad	
<i>Composición química (% , bs)</i>	
Proteínas	20.59 ± 0.36
Lípidos	6.85 ± 0.10
Minerales	3.62 ± 0.02
Carbohidratos	68.94 ± 0.48
Fibra dietaria	
Soluble	3.25 ± 0.38
Insoluble	12.58 ± 0.02
Total	15.83 ± 0.40
<i>Fisicoquímicas</i>	
Color	
Valor Hunter L	88.45 ± 0.22
Diferencia total de color	17.50 ± 0.18
Actividad acuosa (a _w)	0.45 ± 0.001
pH	6.3 ± 0.08
Índice de absorción de agua (g gel/g muestra seca)	2.55 ± 0.032
Índice de solubilidad en agua (g sólidos/100 g muestra seca)	23.97 ± 0.18
Dispersabilidad (%)	51.37 ± 1.07
Capacidad de absorción de aceite (mL aceite absorbido/g muestra)	1.13 ± 0.11
Capacidad de formación de espuma (%)	25.00 ± 0.00
Estabilidad de espuma (%)	96.45 ± 0.51
Actividad de emulsión (%)	38.33 ± 1.44
Estabilidad de emulsión (%)	93.76 ± 2.48

† Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar

correspondiente a valores donde el desarrollo de actividad enzimática, crecimiento de microorganismos y reacciones químicas se llevan a cabo muy lentamente, lo cual se traduce en una larga vida de anaquel (Fennema, 2001). El pH de la harina de garbanzo crudo fue de 6.3.

La harina de garbanzo crudo presentó un índice de absorción de agua de 2.55 g gel/g muestra seca. La absorción de agua de leguminosas se debe básicamente a los principales biopolímeros constituyentes de estos granos (almidón y proteína) (Ugrozov y col 2008). En cuanto al índice de solubilidad de agua y capacidad de absorción de aceite, la harina presentó valores de 23.97 g sólidos/100 g muestra seca y 1.13 mL aceite absorbido/g muestra, respectivamente.

La capacidad de formación y de estabilidad de espuma fue de 25.00 y 96.45%, respectivamente. La capacidad de formación de espuma es determinada por la habilidad de la proteína para reducir la tensión superficial, la flexibilidad molecular y las propiedades fisicoquímicas (hidrofobicidad, carga neta y distribución de las cargas, propiedades hidrodinámicas) (Pedroche y col 2004). Por otro lado, la actividad de emulsión fue de 38.91%, con una estabilidad de 93.76%. El índice de estabilidad mide la habilidad de la emulsión a resistir cambios en su estructura en un periodo de tiempo definido. Las proteínas actúan como agentes emulsionantes por la afinidad que tienen hacia el aceite y agua, debido a su estructura anfifílica, forman una película protectora alrededor de las gotas dispersas en el medio acuoso, por tanto, previenen cambios en la estructura tales como coalescencia, cremado, floculación o sedimentación. La habilidad para actuar como emulsionantes varía de acuerdo a sus propiedades moleculares: hidrofobicidad, estabilidad conformacional, carga y factores fisicoquímicos tales como el pH, fuerza iónica y temperatura

(Mohamed y col 2008). Los valores de propiedades fisicoquímicas fueron similares a los reportados por Angulo-Bejarano y col (2008), Reyes-Bastidas (2008), Quintana-Najera (2014) y Argüelles-López (2015).

B. CONDICIONES ÓPTIMAS DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO PARA PRODUCIR HARINA DE GARBANZO BIOPROCESADO CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y RENDIMIENTO DE HIDROLIZADO ALTOS.

En el **Cuadro 13** se muestran 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 harinas de garbanzo bioprocesado (HGB), y los valores experimentales de las variables de respuesta [actividad antioxidante (AAox), contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) y rendimiento de hidrolizados (RH)] evaluadas a las HGB.

1. Modelos experimentales de predicción

A partir de los datos experimentales de AAox, CFT y RH de las HGB mostrados en el **Cuadro 13** se obtuvieron modelos de predicción, como resultado de ajustar el polinomio “ $\hat{Y}_i = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2$ ”, que relaciona las variables de respuesta (AAox, CFT y RH) evaluadas a las HGB, con las variables del proceso de FES (TF y tF). A estos modelos de predicción se les probó su idoneidad y ajuste por análisis de varianza (ANOVA, **Cuadro 14**). Myers y Montgomery (2002) reportaron que un buen modelo de predicción debe tener una R^2 ajustada (coeficiente de determinación) ≤ 0.80 , un nivel de significancia de $P < 0.05$, un valor

Cuadro 13. Diseño experimental¹ empleado para obtener diferentes combinaciones de temperatura y tiempo de fermentación en estado sólido (TF, tF) para la producción de harinas de garbanzo bioprocesado (HGB), y resultados experimentales de las variables de respuesta (AAox, CFT y RH)

Tratamiento ²	Variables de proceso		Variables de respuesta ³		
	Temperatura de fermentación (°C)	Tiempo de fermentación (h)	AAox (μmol ET/100g, bs)	CFT (mg EAG/100g, bs)	RH (%)
1	25.4	24.5	3,535	63.7	14.1
2	41.6	24.5	3,808	81.3	14.9
3	25.4	113.6	8,486	171.8	16.7
4	41.6	113.6	5,112	119.9	14.3
5	22.0	69.0	4,189	76.1	17.3
6	45.0	69.0	3,606	84.6	14.4
7	33.5	6.0	3,595	69.2	13.8
8	33.5	132.0	9,139	170.4	14.9
9	33.5	69.0	6,513	129.9	13.5
10	33.5	69.0	5,649	123.6	12.9
11	33.5	69.0	6,846	137.7	13.2
12	33.5	69.0	6,644	139.1	12.9
13	33.5	69.0	5,533	115.2	13.5

¹ Diseño central compuesto rotatable con dos factores y cinco niveles; 13 tratamientos.

² No corresponde al orden de procesamiento.

³ AAox = Actividad antioxidante; CFT = Compuestos fenólicos totales; RH = Rendimiento de hidrolizado.

Cuadro 14. Coeficientes de regresión y análisis de varianza de los modelos experimentales de predicción que muestran la relación entre las variables de respuesta (AAox, CFT, RH) y variables de proceso (TF, tF) para la producción de harinas de garbanzo bioprocesado (HGB).

Coeficientes	AAox		CFT		RH	
	Codificado	Sin codificar	Codificado	Sin codificar	Codificado	Sin codificar
Intercepto β_0	6300.16	- 19841.469	127.46	-398.26043	13.22	33.55805
Lineal β_1	- 490.70*	1284.453*	- 2.78 ^{NS}	25.06507 ^{NS}	- 0.69***	- 1.24076***
β_2	1761.98***	123.861***	36.23***	2.42193***	0.42**	0.044616**
Cuadrático β_{11}	- 1155.85***	-17.479***	- 21.80***	-0.32976***	1.29***	0.019496***
β_{22}	NS	NS	NS	NS	0.55**	0.0002758**
Interacciones β_{12}	- 911.67**	- 2.516**	- 17.40**	-0.048022**	- 0.79***	-0.002183***
P modelo	< 0.0001		< 0.0001		0.0003	
P falta de ajuste	0.6234		0.4338		0.1380	
CV	9.99		9.16		2.91	
R²	0.9407		0.9455		0.9434	
R² ajustada	0.9110		0.9182		0.9030	
R² predicha	0.8178		0.8142		0.6875	

* Nivel de significancia a $P \leq 0.10$

** Nivel de significancia a $P \leq 0.05$

*** Nivel de significancia a $P \leq 0.01$

NS No significativo

de coeficiente de varianza (CV) $\leq 10\%$, y prueba de falta de ajuste > 0.1 ; todos estos parámetros fueron usados para decidir el nivel de satisfacción del modelo.

a. Actividad antioxidante (AAox)

Las HGB presentaron valores de AAox entre 3,535 y 9,139 μmol equivalentes de trolox (ET)/100 g de HGB (bs) (**Cuadro 13**). En todos los tratamientos de fermentación, la AAox del garbanzo aumentó como consecuencia de la acción enzimática del microorganismo [harina de garbanzo crudo = 3,410 μmol ET/100 g de HG (bs)].

En el **Cuadro 14** se muestran la estimación de los coeficientes de regresión y análisis de varianza del modelo de predicción para AAox de las HGB, el cual muestra la relación entre esta variable de respuesta y las variables del proceso de fermentación (TF y tF). El análisis de varianza mostró un modelo cuadrático significativo ($p < 0.001$) para AAox. Este análisis también mostró que la AAox de las HGB fue significativamente dependiente de los términos lineales de la temperatura de fermentación (TF) y el tiempo de fermentación (tF), así como del término de interacción (TF*tF) y el término cuadrático de temperatura de fermentación (TF²) ($P < 0.05$). El modelo de predicción para la AAox de las HGB usando variables codificadas fue:

$$AAox = 6300.16 - 490.70 TF + 1761.98 tF - 911.67 TF*tF - 1155.85 TF^2$$

El modelo de predicción para la AAox de las HGB usando variables no codificadas fue:

$$AAox = - 19841.46909 + 1284.45346 TF + 123.86170 tF - 2.51669 TF*tF - 17.47979 TF^2$$

Este modelo de predicción explicó el 94.07% de la variabilidad total ($p < 0.0001$) de los valores de AAox de las HGB. El coeficiente de determinación R^2 ajustada del modelo fue 0.9110 y la falta de ajuste no fue significativa (0.6234). Además, la dispersión relativa de los puntos experimentales con respecto a los valores predichos con el modelo (CV) fue de 9.99%. Estos valores indican que el modelo experimental para la AAox de las HGB fue adecuado y reproducible.

A partir de los modelos matemáticos de predicción se construyeron gráficos de superficie de respuesta y de contorno (**Figura 4**) en los cuales se observa el efecto de las variables del proceso de fermentación TF y tF sobre la AAox de las HGB. En los gráficos se observa que ambas variables de proceso (TF, tF) tuvieron un efecto significativo en el comportamiento de la actividad antioxidante, tanto en sus términos lineales como de interacción, y el término cuadrático de TF. El valor más bajo de AAox (3,535 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g}$) se localizó a una TF de 25.4°C y un tF de 24.5 h. En las gráficas se observa que el máximo valor de AAox se encuentra a TF baja a media y tF alto, mientras que a TF alta el tF no ejerce efecto significativo sobre la AAox. Al aumentar el tF, hay un incremento en la actividad antioxidante de HGB, mismo comportamiento ha sido reportado por investigadores, como Sánchez-Magaña y col (2014) quienes trabajaron con tempe de garbanzo, producido con *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710, fijando la temperatura de fermentación en 35°C y variando el tiempo de fermentación de 24 a 108 h, encontrando la máxima AAox [9,710 $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g}$ (bs)] a las 108 h de fermentación; resultados similares fueron reportados por Guzmán-Uriarte y col (2013) al trabajar con tempe de frijol bajo las mismas condiciones anteriorente descritas.

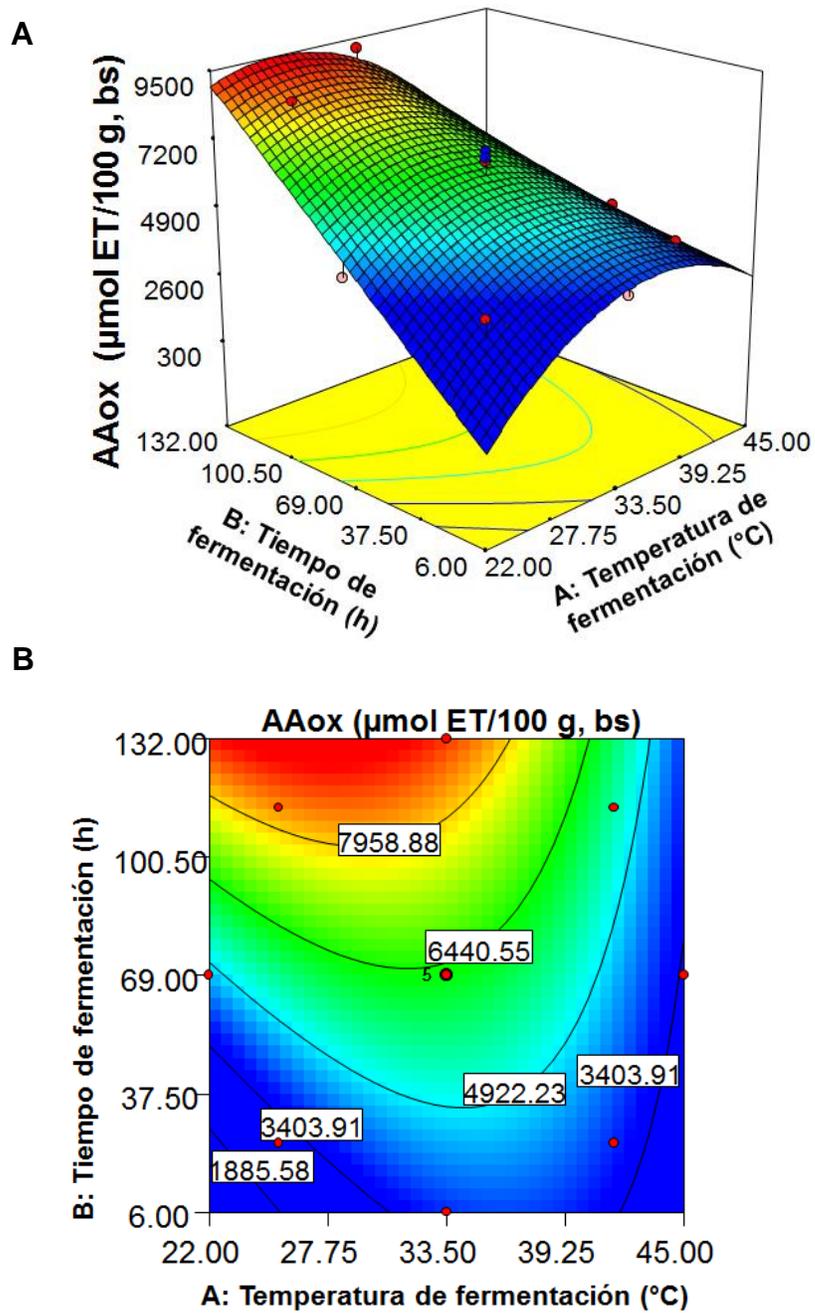


Figura 4. Gráficas de superficie de respuesta **(A)** y contornos **(B)** mostrando el efecto de las variables de proceso de fermentación [TF: temperatura de fermentación ($^{\circ}\text{C}$), tF: tiempo de fermentación (h)] sobre la actividad antioxidante [AAox ($\mu\text{mol ET}/100\text{g, bs}$)] de las harinas de garbanzo bioprocesado (HGB).

b. Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT)

Las HGB presentaron valores de CFT entre 63.7 y 171.8 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g de HGB (bs) (**Cuadro 13**). En todos los tratamientos de fermentación, los CFT del garbanzo aumentaron como consecuencia de la actividad enzimática del microorganismo [harina de garbanzo crudo = 61.9 mg EAG/100 g (bs)].

En el **Cuadro 14** se muestran la estimación de los coeficientes de regresión y análisis de varianza del modelo de predicción para CFT de las HGB, el cual muestra la relación entre esta variable de respuesta y las variables del proceso de fermentación (TF y tF). En análisis de varianza mostró un modelo cuadrático significativo ($p < 0.001$) para CFT. Este análisis también mostró que el contenido de CFT de las HGB fue significativamente dependiente de los términos lineales de la temperatura de fermentación (TF) y el tiempo de fermentación (tF) ($p < 0.05$), el término de interacción (TF*tF) y el término cuadrático de temperatura de fermentación (TF²). El modelo de predicción para el contenido de CFT de las HGB usando variables codificadas fue:

$$CFT = 127.46 - 2.78 TF + 36.23 tF - 17.40 TF*tF - 21.80 TF^2$$

El modelo de predicción para el contenido de CFT de las HGB usando variables no codificadas fue:

$$CFT = - 398.26043 + 25.06507 TF + 2.42193 tF - 0.048022 TF*tF - 0.32976 TF^2$$

Este modelo de predicción explicó el 94.55% de la variabilidad total ($p < 0.001$) de los valores de CFT de las HGB. El coeficiente de determinación R² ajustada del modelo fue 0.9182 y la falta de ajuste fue no significativa (0.4338). Además, la dispersión relativa de los puntos experimentales con respecto a los valores predichos

con el modelo (CV) fue de 9.16%. Estos valores indican que el modelo experimental para el contenido de CFT de las HGB fue adecuado y reproducible.

A partir de los modelos matemáticos de predicción se construyeron gráficos de superficie de respuesta y de contorno (**Figura 5**) en los cuales se observa el efecto de las variables del proceso de fermentación TF y tF sobre el contenido de CFT de las HGB. En los gráficos se observa que ambas variables de proceso (TF y tF) tuvieron un efecto significativo en el comportamiento de CFT. El valor de CFT más bajo (63.7 mg EAG/100 g de HGB, bs) se localizó a una TF de 25.4°C y un tF de 24.5h.

Se observa una mayor concentración de CFT a tF alto y TF baja a media. A estas temperaturas (22 – 39°C) existe un incremento de CFT al aumentar el tiempo de fermentación; por otro lado, a TF alta (40 – 45°C) no hay un incremento sustancial en CFT de HGB. Este comportamiento es similar al observado en AAox, por lo que podemos asumir que el incremento de CFT contribuye al aumento en AAox.

El aumento de AAox durante la FES puede deberse al incremento del contenido de CFT, llevado a cabo por enzimas hidrolíticas producidas por el hongo durante la fermentación (Hur y col 2014), que hidrolizan enlaces éster de la pared celular de los granos, liberando compuestos fenólicos enlazados. Además, la enzima β -glucosidasa, producida por el hongo, se ha reportado como responsable de catalizar la liberación de fracciones fenólicas de agliconas (McCue y col 2003; Randhir y col 2004a, b; Chaiyasut y col 2010; Cheng y col 2013; Handa y col 2013; Huynh y col 2014).

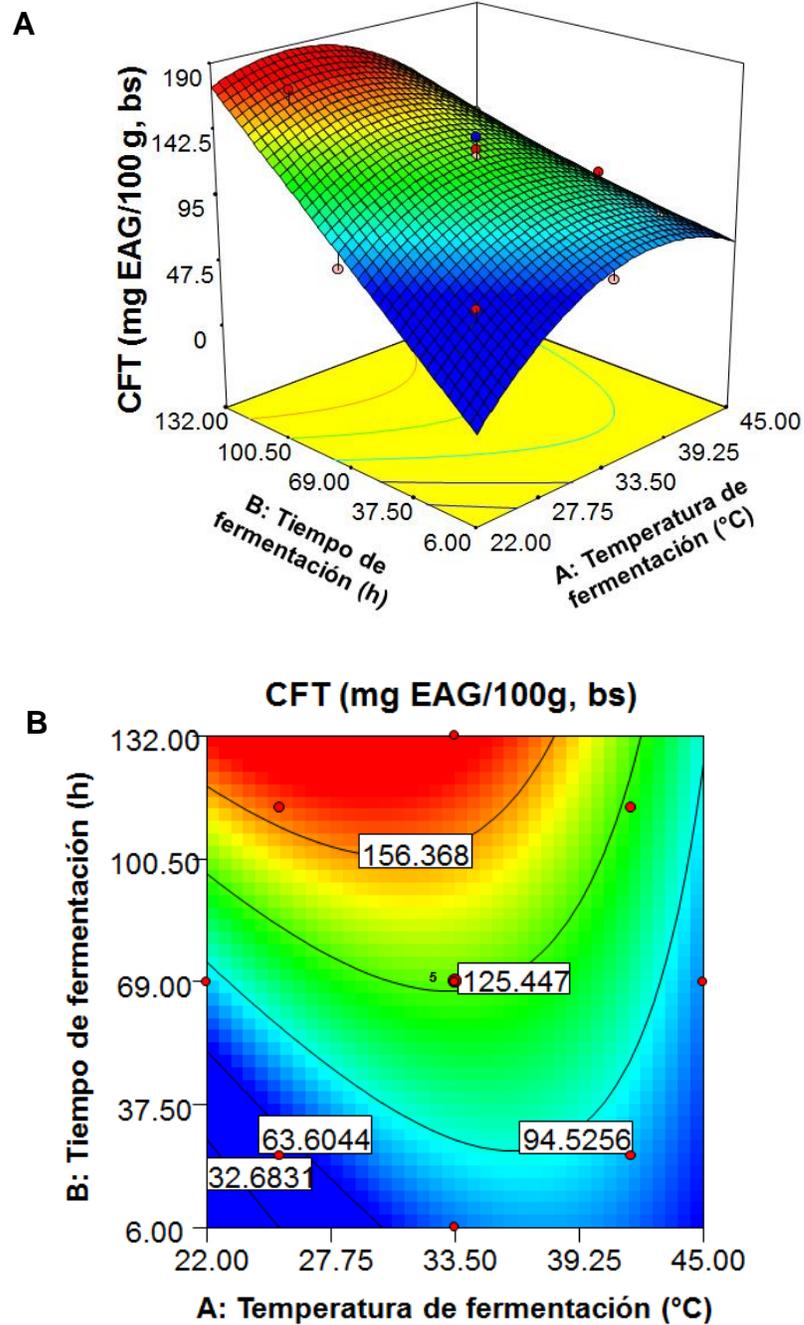


Figura 5. Gráficas de superficie de respuesta **(A)** y contornos **(B)** mostrando el efecto de las variables de proceso de fermentación [TF: temperatura de fermentación (°C), tF: tiempo de fermentación (h)] sobre el contenido de fenólicos totales [CFT (mg EAG/100g, bs)] de las harinas de garbanzo bioprocesado (HGB).

Observamos que a TF medias a bajas hay un aumento de CFT conforme incrementa el tF; este incremento puede deberse a una mayor actividad de las enzimas hidrolíticas mencionadas, que actúan liberando compuestos fenólicos. Dicho aumento en la actividad enzimática ha sido reportado en estudios como el de Cheng y col (2013), quienes fermentaron soya negra con *R. oligosporus* y encontraron una correlación entre el incremento de la actividad enzimática de la enzima β -glucosidasa y el aumento en el contenido de polifenoles, al incrementar el tiempo de la fermentación.

c. Rendimiento de hidrolizado (RH)

Las HGB presentaron valores de RH entre 12.9 y 17.3% (**Cuadro 13**). En el **Cuadro 14** se muestran la estimación de los coeficientes de regresión y análisis de varianza del modelo de predicción para RH de las HGB, el cual muestra la relación entre esta variable de respuesta y las variables del proceso de fermentación (TF y tF). El análisis de varianza mostró un modelo cuadrático significativo ($p = 0.0003$) para RH. Este análisis también mostró que el contenido de RH de las HGB fue significativamente dependiente de los términos lineales de la temperatura de fermentación (TF) y el tiempo de fermentación (tF) ($p < 0.05$), el término de interacción (TF*tF) y los términos cuadráticos de temperatura de fermentación (TF²) y tiempo de fermentación (tF²). El modelo de predicción para RH de las HGB usando variables codificadas fue:

$$RH = 13.22 - 0.69 TF + 0.42 tF - 0.79 TF*tF + 1.29 TF^2 + 0.55 tF^2$$

El modelo de predicción para RH de las HGB usando variables no codificadas fue:

$$RH = 33.55805 - 1.24076 TF + 0.044616 tF - 0.00218316 TF*tF + 0.019496 TF^2 + 0.000275758 tF^2$$

Este modelo de predicción explicó el 94.34% de la variabilidad total ($p = 0.0003$) de los valores de RH de las HGB. El coeficiente de determinación R^2 ajustada del modelo fue 0.9030 y la falta de ajuste fue no significativa (0.1380). Además, la dispersión relativa de los puntos experimentales con respecto a los valores predichos con el modelo (CV) fue de 2.91%. Estos valores indican que el modelo experimental para el contenido de RH de las HGB fue adecuado y reproducible.

A partir de los modelos matemáticos de predicción se construyeron gráficos de superficie de respuesta y de contorno (**Figura 6**) en los cuales se observa el efecto de las variables del proceso de fermentación TF y tF sobre el contenido de RH de las HGB. En los gráficos se observa que ambas variables de proceso (TF y tF) tuvieron un efecto significativo en el comportamiento de RH. El valor de RH más bajo (12.9%) se localizó a una TF de 33.5°C y un tF de 69 h.

Se observa un mayor porcentaje de RH a tF alto y TF baja. Esto puede deberse a que a estas condiciones hay una mayor actividad de proteasas, que actúan rompiendo enlaces peptídicos, lo cual facilita la posterior extracción de péptidos tras la acción de enzimas digestivas (pepsina y pancreatina). Rauf y col (2010) optimizaron las condiciones de crecimiento de *Rhizopus oligosporus* en harina de semilla de girasol para la producción de proteasas, reportando que temperaturas altas tenían efectos adversos en la actividad metabólica del microorganismo, causando la inhibición del crecimiento fúngico, tras observar que tras incrementos de 5°C, desde 30°C hasta 45°C, la actividad proteolítica sufría un descenso (de 103.7 a

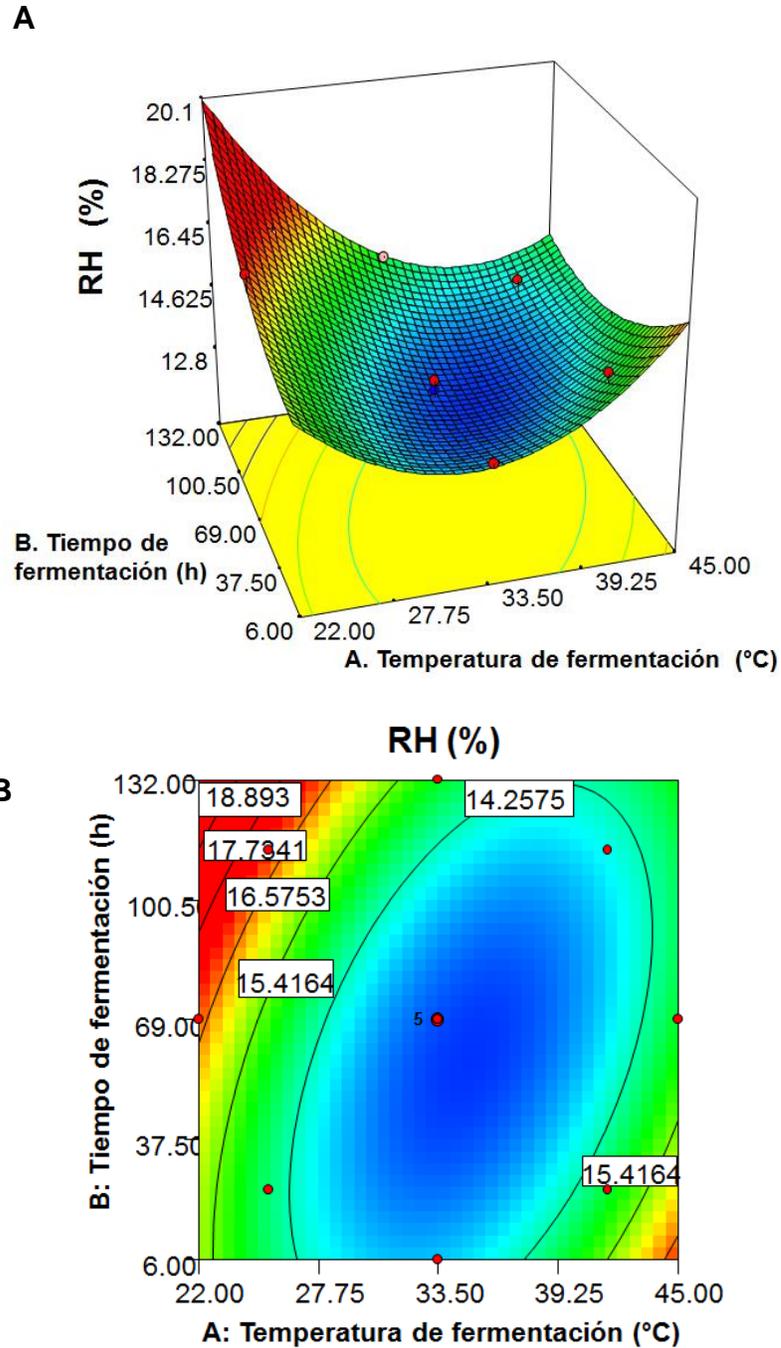


Figura 6. Gráficas de superficie de respuesta **(A)** y contornos **(B)** mostrando el efecto de las variables de proceso de fermentación [TF: temperatura de fermentación (°C), tF: tiempo de fermentación (h)] sobre el rendimiento de hidrolizados (%) de las harinas de garbanzo bioprocesado (HGB).

73.6 unidades/g). Temperaturas altas de fermentación provocan el estiramiento y ruptura definitiva de los enlaces de hidrógeno débiles presentes en las enzimas proteolíticas, perdiendo éstas sus propiedades catalíticas (Haq y Mukhtar 2004, Haq y col 2006), además de dañar a las proteínas transmembranales y alterar la membrana plasmática (Prescott y col 1999). Sumantha y col (2006) obtuvieron resultados similares utilizando *R. microsporus*, *R. oligosporus* y *R. oryzae* en salvado de arroz, reportando que el hongo era altamente sensible a cambios de temperatura por debajo y arriba de su temperatura óptima, tanto para la producción de enzimas como para su crecimiento, obteniendo alrededor de 120 unidades/g de sustrato, bs a 30°C, para *R. microsporus*, hasta una actividad nula a 44°C.

2. Optimización

En la **Figura 7A** se muestra el gráfico de deseabilidad global (D), en el cual la zona roja representó los valores predichos máximos posibles de D para cada respuesta (AAox, CFT, RH), de entre los cuales se seleccionó un valor óptimo ($D = 1$) con las condiciones de FES (TF y tF) que dieron por resultado los valores de AAox, CFT y RH máximos posibles. Los valores de deseabilidad individual para cada respuesta, asociados con este valor de D máximo seleccionado fueron: $d_{AAox} = 1$, $d_{CFT} = 1$ y $d_{RH} = 1$ (**Figura 7B**). Los valores de las variables del proceso de fermentación asociados con la deseabilidad global máxima obtenida fueron: TF = 25 °C y tF = 132 h. 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 y RH usando los modelos de predicción de cada variable de respuesta y las condiciones óptimas de fermentación fueron AAox = 9,496 μmol

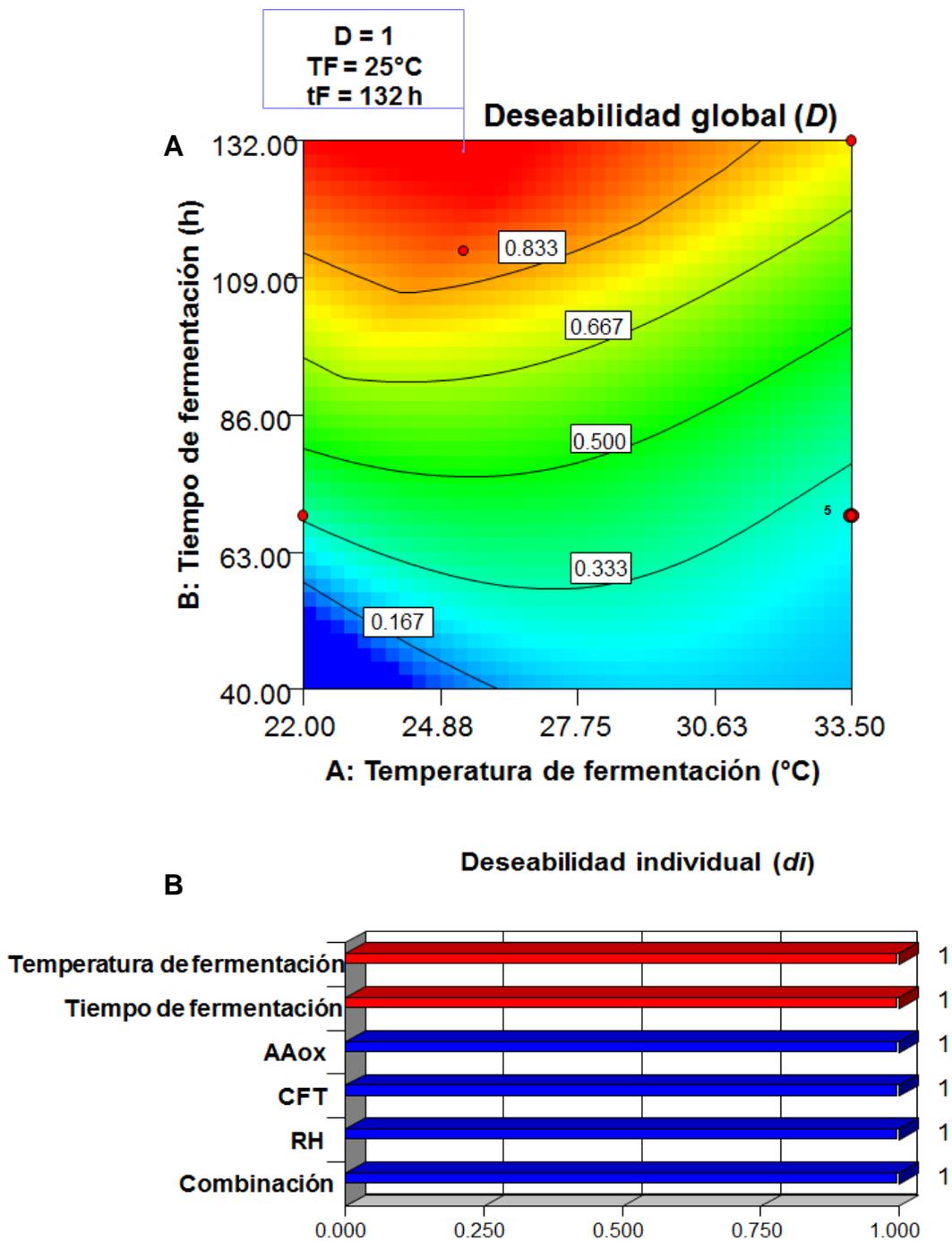


Figura 7. (A) Deseabilidad global ($D = 1$) para obtener la mejor combinación de variables de proceso ($TF = 25^{\circ}C/tF = 132\text{ h}$) y **(B)** deseabilidad individual (d_i) para las variables de respuesta (AAox, CFT y RH).

ET/100 g (bs), CFT = 179.8 mg EAG/100 g (bs) y RH = 18.1 %. Aplicando la mejor combinación de las variables del proceso de fermentación (TF = 25°C/tF = 132 h) se produjo HGBO, realizando tres repeticiones. Los valores experimentales de las variables de respuesta [AAox = 9,663 µmol; CFT = 200.9 mg EAG/100 g (bs) y RH = 18.81%] de HGBO fueron similares a los valores predichos, arriba mencionados, indicando que las condiciones óptimas de fermentación fueron apropiadas y reproducibles.

C. COMPOSICIÓN QUÍMICA, PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y RENDIMIENTO DE HIDROLIZADO DE HARINA DE GARBANZO BIOPROCESADO OPTIMIZADA.

1. Composición química y propiedades fisicoquímicas de harina de garbanzo bioprocesada optimizada.

En el **Cuadro 15** se muestra la composición química y propiedades fisicoquímicas de la harina de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO), preparada con las mejores condiciones del proceso de fermentación (TF=25 °C / tF= 132 h). El contenido de proteína de HGBO fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que el de la harina cruda [28.50 vs 20.6% (bs); aumento=38.3%]. Comportamientos similares han sido reportados en frijol y garbanzo por investigadores como Reyes-Moreno y col (2004), Reyes-Bastidas y col (2010), Guzmán-Uriarte y col (2013), Sánchez-Magaña y col (2014) y Rochín-Medina y col (2015), quienes atribuyen tal incremento al aumento de la biomasa del hongo (Sparringa y Owens 1999), así como

Cuadro 15. Composición química y propiedades fisicoquímicas de harinas de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO) y garbanzo crudo (sin procesar).

Propiedad	Harina de garbanzo	
	Crudo	Bioprocesado
Composición química (% db)		
Proteínas	20.59 ± 0.36 ^b	28.5 ± 0.23 ^a
Lípidos	6.85 ± 0.10 ^b	8.21 ± 0.13 ^a
Minerales	3.62 ± 0.02 ^a	2.98 ± 0.06 ^b
Carbohidratos	68.94 ± 0.48 ^a	60.31 ± 0.42 ^b
Fibra dietaria		
Soluble	3.25 ± 0.38 ^b	5.62 ± 0.26 ^a
Insoluble	12.58 ± 0.02 ^b	18.99 ± 0.48 ^a
Total	15.83 ± 0.40 ^b	24.61 ± 0.74 ^a
Propiedades fisicoquímicas		
Color		
Valor Hunter 'L'	88.45 ± 0.22 ^a	76.41 ± 0.26 ^b
Diferencia total color (ΔE)	17.50 ± 0.18 ^b	25.27 ± 0.72 ^a
Actividad de agua (A_w)	0.45 ± 0.001 ^a	0.44 ± 0.001 ^a
Ph	6.3 ± 0.08 ^a	5.7 ± 0.15 ^b
Índice de absorción de agua (IAA) ¹	2.55 ± 0.032 ^b	3.88 ± 0.16 ^a
Índice de solubilidad en agua (ISA) ²	23.97 ± 0.18 ^a	19.47 ± 0.25 ^b
Dispersabilidad (%)	51.37 ± 1.07 ^b	100 ± 0.00 ^a
Capacidad de absorción de aceite ³	1.13 ± 0.11 ^b	1.33 ± 0.001 ^a
Capacidad de formación de espuma (%)	25.00 ± 0.00 ^b	28.84 ± 0.00 ^a
Estabilidad de espuma (%)	96.45 ± 0.51 ^a	63.88 ± 2.40 ^b
Actividad de emulsión (%)	38.33 ± 1.44 ^b	47.17 ± 0.58 ^a
Estabilidad de emulsión (%)	93.76 ± 2.48 ^a	10.60 ± 0.13 ^b

† Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar; ^{a-b} Medias con letra diferente en el mismo renglón son diferentes (Duncan $p < 0.05$); ¹ g gel/g muestra; ² g sólidos/100g muestra; ³ mL de aceite absorbido/g de muestra.

a la disminución en el contenido de otros constituyentes, al perderse por lixiviación durante el remojo y la cocción. De manera similar, el contenido de lípidos de la HGBO fue significativamente mayor ($p < 0.05$) respecto a la harina cruda [8.21 vs 6.85 % (bs); aumento=19.8%]; sin embargo, tales investigadores reportan una disminución en el contenido lipídico de tempe tras la fermentación en estado sólido de leguminosas. El incremento observado en este estudio podría deberse a que el hongo utilizó preferentemente carbohidratos como fuente de carbono, además de la pérdida de éstos por lixiviación, durante las etapas de remojo y cocción, por lo que el decremento del porcentaje de carbohidratos en el material (de 68.94 a 60.31%; disminución=12.5%) se vio reflejado en un incremento en el contenido lipídico. Por otro lado, Oboh y Akindahunsi (2002), así como Oboh y Olandunmoye (2007) reportan un incremento lipídico en harina de yuca inoculada con *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus oryzae*, atribuyendo este incremento a la posibilidad de que el hongo pudiera secretar aceite microbiano (Oboh y Akindahunsi, 2003), afirmación en concordancia con los hallazgos de Akindumila y Glatz (1998), en la medida de que los microorganismos podrían producir aceite microbiano durante la fermentación. En el **Cuadro 15** también se observa un incremento ($p < 0.05$) en el contenido de fibra dietaria soluble (FDS), insoluble (FDI) y total (FDT) [crudo vs bioprocesado: 3.25 vs 5.62% (bs), aumento=72.9%; 12.58 vs 18.99% (bs), aumento=50.9%; 15.83 vs 24.61% (bs), aumento=55.5%] tras la FES; Sánchez-Magaña y col (2014) reportaron un incremento similar tras fermentar garbanzo. Tal comportamiento se ha atribuido al crecimiento del hongo y el desarrollo de un micelio rico en fibra, así como a la utilización de otros componentes como fuente de energía (Azeke y col 2007).

El contenido de cenizas de HGBO fue menor ($p < 0.05$) que el del material crudo [3.62 vs 2.98% (bs), disminución=17.7%], por el efecto de la etapa de remojo en medio ácido, donde ocurre lixiviación de electrolitos y pérdida de sólidos, así como la consecuente migración al medio de remojo de algunos nutrimentos y componentes indeseables hidrosolubles, así como por la etapa de cocción en medio ácido, donde se da una liberación parcial de calcio y magnesio al medio de cocción (Laurena y col 1986).

La FES disminuyó ($p < 0.05$) el valor hunter 'L' (-12.5%) e incrementó de manera significativa ($p < 0.05$) la diferencia total de color (+44.4%) del grano crudo. La disminución en el valor Hunter 'L' significa un color más oscuro, esto podría deberse a la influencia del color del micelio, que al envejecer oscurece gradualmente, y esporas desarrolladas por *R. oligosporus* durante su crecimiento, o bien por compuestos liberados y sintetizados como consecuencia de la FES y del proceso de cocción y secado (Sánchez- Magaña, 2014). Los valores para actividad de agua (0.44–0.46) se encontraron en un rango donde el crecimiento de microorganismos, así como las reacciones enzimáticas y químicas ocurren lentamente, lo que se traduce en una larga vida de anaquel.

La HGBO presentó un mayor ($p < 0.05$) índice de absorción de agua (IAA) que la harina cruda sin procesar (2.55 vs 3.88 g gel/g muestra, aumento=52.2%), como consecuencia de la gelatinización de los gránulos de almidón y la desnaturalización proteínica parcial ocurrida durante la etapa de cocción del grano, así como la actividad enzimática del hongo. Por otro lado, el índice de solubilidad en agua (ISA) sufrió una disminución significativa ($p < 0.05$) (23.97 vs 19.47, disminución=18.8%),

probablemente debido al grado de degradación que sufrieron los gránulos de almidón (Angulo-Bejarano y col 2014).

El incremento de la dispersabilidad (+94.7%), la capacidad de absorción de aceite (+17.7%), así como de las propiedades emulsificantes (+23.1%) y espumantes (+15.4%) del grano puede deberse a la biosíntesis y liberación de compuestos solubles durante el proceso de fermentación; esto puede relacionarse a un aumento del contenido de proteína soluble de los granos fermentados, el cual podría atribuirse a la fuerte actividad de enzimas proteolíticas secretadas por *Rhizopus*, las cuales hidrolizan las proteínas a péptidos de peso molecular menor y solubilidad mayor en agua (Reyes-Moreno y col 2000a).

Se observó una disminución ($p < 0.05$) de la estabilidad de emulsión (-88.7%) y espuma (-33.8%). 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 (Reyes-Moreno y col 2000a; 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.

2. Actividad antioxidante, compuestos fenólicos totales y rendimiento de hidrolizado de harinas de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO) y garbanzo crudo (sin procesar).

El **Cuadro 16** muestra la actividad antioxidante, compuestos fenólicos totales y rendimiento de hidrolizado de HGBO.

Cuadro 16. Actividad antioxidante, contenido de compuestos fenólicos totales y rendimiento de hidrolizado de harinas de garbanzo bioprocesado optimizada (HGBO) y garbanzo crudo (sin procesar).

Propiedad	Harina de garbanzo	
	Crudo	Bioprocesado optimizado
<i>Actividad antioxidante¹</i>		
ORAC		
Fitoquímicos libres	2,932 ± 147.3 ^b	9,084 ± 152.9 ^a
Fitoquímicos ligados	1,987 ± 122.3 ^b	6,273 ± 138.3 ^a
Total	4,919 ± 79.3 ^b	15,358 ± 129.9 ^a
ABTS		
Fitoquímicos libres	1,972 ± 76.1 ^b	6,574 ± 89.7 ^a
Fitoquímicos ligados	1,383 ± 91.0 ^b	3,089 ± 124.7 ^a
Total	3,410 ± 25.2 ^b	9,663 ± 211.46 ^a
<i>Compuestos fenólicos totales²</i>		
Fitoquímicos libres	23.5 ± 0.66 ^b	129.5 ± 7.4 ^a
Fitoquímicos ligados	38.4 ± 2.03 ^b	71.35 ± 7.9 ^a
Total	61.9 ± 2.88 ^b	200.9 ± 0.5 ^a
<i>Rendimiento de hidrolizado³</i>	13.59 ± 1.13 ^b	18.81 ± 0.06 ^a

† Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar; ^{a-b} Medias con letra diferente en el mismo renglón son diferentes (Duncan $p < 0.05$); ¹ μmol equivalentes de Trolox (ET)/100g, bs; ² mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/100g, bs; ³ porcentaje (%).

La HGBO presentó AAox de 9,663 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ muestra, bs mediante el método ABTS y 15,358 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$ muestra mediante el método de ORAC. En el grano crudo la mayor contribución a la AAox correspondió a los fitoquímicos libres en un 57.8% por ABTS y 59.6% ORAC; mientras que en la HGBO estos porcentajes fueron 68.03 y 59.14% para los métodos de ABTS y ORAC, respectivamente, siendo nuevamente la fracción libre la mayor contribuyente a la AAox. La FES de garbanzo, llevada a cabo bajo condiciones óptimas ($\text{TF}=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $\text{tF}=132\text{ h}$), incrementó ($p<0.05$) un 183% la actividad antioxidante, evaluada mediante el método ABTS, y un 212% evaluada mediante el método ORAC. Esto concuerda con los resultados obtenidos por McCue y col (2003), Lee y col (2008), Reyes-Bastidas y col (2010), Maiti y Majumdar (2012), Salar y col (2012), Cheng y col (2013), Guzmán-Uriarte y col (2013), Sánchez-Magaña y col (2014) y Rochín-Medina y col (2015), que reportan un incremento de AAox tras el proceso de FES en diversos materiales. Asimismo, los CFT se vieron incrementados ($p<0.05$) 225% tras la FES, un incremento mayor que el reportado por Sánchez-Magaña y col (2014), quienes reportaron un aumento de 178% de CFT en garbanzo, tras fermentarlo por 108 h a 35°C . Los compuestos fenólicos son considerados los principales contribuyentes a la AAox presentada por granos (Yao y col 2010). La fracción ligada presentó un mayor contenido de CFT en garbanzo crudo (62%), mientras que en garbanzo fermentado la fracción libre presentó el mayor contenido de CFT (64.45%), este comportamiento concuerda con lo reportado por Sánchez-Magaña y col (2014) quienes obtuvieron una menor proporción de fenólicos libres en el garbanzo crudo, respecto al contenido total de CFT, pero tras la FES esta proporción cambió, siendo mayoritarios los compuestos fenólicos libres. Estos resultados son consistentes con los reportados por otros

investigadores (McCue y col 2003; Randhir y col 2004a, b; Chaiyasut y col 2010; Cheng y col 2013; Handa y col 2013; Huynh y col 2014) quienes observaron que la enzima β -glucosidasa, producida por el hongo, cataliza la liberación de agliconas hidrolizando enlaces β (1-4) de β -D-glucósidos incrementando el contenido de polifenoles, aumentando de esta manera la actividad antioxidante. Chaiyasut y col (2010) observaron que el contenido y perfil de isoflavonas están relacionados con la duración de la fermentación: las agliconas y gliconas de isoflavona aumentaron y disminuyeron, respectivamente con el tiempo de fermentación. Cheng y col (2013) reportaron resultados similares, observando un incremento en actividad antioxidante y contenido de polifenoles, que se correlacionaba con el aumento de la actividad de la enzima β -glucosidasa tras fermentar soya negra con *R. oligosporus*. Estudios como los de Guzmán-Uriarte y col (2013) y Sánchez-Magaña y col (2014) también muestran una correlación lineal positiva significativa entre el contenido de CFT y la AAox de tempe de frijol y garbanzo, respectivamente.

Se ha reportado (Hur y col 2014) que el incremento de la actividad antioxidante durante la FES se debe a la hidrólisis enzimática fúngica, que conlleva al aumento de compuestos fenólicos y flavonoides, al hidrolizar enlaces éster de la estructura de la pared celular de los granos, la cual enlaza a los compuestos fenólicos.

Por otro lado, en el **Cuadro 16** también se observa un aumento (38%) significativo ($p < 0.05$) de RH tras la FES de garbanzo llevada a cabo bajo condiciones óptimas. Este incremento puede deberse a la acción de proteasas fúngicas, que son secretadas por el hongo durante la FES (Erdmann y col 2008). Estas predigieren a las proteínas del garbanzo, que en su predominancia son globulinas (Singh y Jambunathan 1982) las cuales son compactas en estructura y difíciles de digerir

(Hamerstrand y col 1981, Ge y Zhang 1993). Al ser predigeridas, las proteínas se desdoblán (Molina y col 2001, Cui y col 2013) por lo que las enzimas digestivas, pepsina y pancreatina, pueden actuar escindiendo los enlaces peptídicos con mayor facilidad que si las proteínas se encontraran en su forma globular (sin bioprocasar), aumentando de esta forma el contenido peptídico en hidrolizados, y por ende, el porcentaje de rendimiento de hidrolizado.

3. Potencial antihipertensivo de HGBO (inhibición de ECA por hidrolizado de proteína de HGBO)

La FES disminuyó ($p < 0.05$) el porcentaje de inhibición de ECA de garbanzo, observándose un 97.9% de inhibición en el grano crudo y un 88.6% en el bioprocasado. Este resultado difiere a lo reportado por Nakahara y col (2010) quienes observaron que la salsa de soya fermentada, la cual tuvo un mayor rendimiento de péptidos que la salsa regular, poseía un mayor efecto antihipertensivo. Esta disminución de la actividad antihipertensiva tras la fermentación además difiere con lo reportado en soya por investigadores como Gibbs y col (2004), Kim y col (2010) y Torino y col (2013), y en frijol común y negro (Guzmán-Uriarte y col 2013; Rochín-Medina y col 2015). Dado que las enzimas microbianas utilizan diferentes sitios activos que las enzimas digestivas, los péptidos que se liberan por enzimas microbianas y posteriormente por enzimas digestivas difieren de los que son liberados simplemente por enzimas digestivas, lo cual puede influir en la bioactividad de los mismos (Möller y col 2011). Los péptidos inhibidores de la ECA sólo exhiben potencial antihipertensivo si llegan al sistema cardiovascular en su forma activa, por lo que tras la ingestión oral, necesitan resistir la digestión gastrointestinal por

proteasas y peptidasas. La degradación de los péptidos puede darse durante este proceso, con su consecuente inactivación (García y col 2013). Tras la hidrólisis de las proteínas del grano, llevada a cabo por proteasas secretadas por el hongo durante la fermentación (Erdmann y col 2008), que realizan una pre-digestión de las proteínas, los enlaces peptídicos de las proteínas se hicieron más susceptibles al ataque de enzimas digestivas (Mugula y Lyimo 2000; Molina y col 2001, Cui y col 2013), lo que pudo conllevar a su degradación e inactivación. Meisel y col (1997) informaron que la inhibición de la ECA en quesos era dependiente de la proteólisis en cierta medida. La actividad inhibidora en Gouda medianamente madurado era aproximadamente el doble que la del Gouda muy madurado, indicando que los péptidos bioactivos liberados por las enzimas proteolíticas de bacterias ácido-lácticas durante la maduración se degradaron a fragmentos inactivos como resultado de una mayor proteólisis. Otro estudio presentado por Ankolekar y col (2011) reporta un menor porcentaje de inhibición en jugos de cuatro variedades de pera fermentadas con *Lactobacillus acidophilus*, en comparación a los jugos sin fermentar. Dicha actividad inhibitoria fue disminuyendo en todas las variedades conforme incrementaba el tiempo de fermentación, de 0 a 72 h, observándose porcentajes de inhibición desde 28% para el jugo sin fermentar, hasta casi 0% para el jugo fermentado por 72 h. Tales autores señalan que es posible que la contribución de péptidos potenciales pudo ser reducida por la fermentación.

Por otro lado, también es importante recalcar que no siempre se observa una buena correlación entre valores de porcentaje de inhibición y el IC_{50} (Gubler y col 2012), por lo que es posible que, a pesar de presentar una menor actividad

antihipertensiva calculada como porcentaje de inhibición, la HGBO presente un IC_{50} más bajo (una mayor capacidad de inhibición) que la harina sin procesar.

,

X CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron modelos matemáticos de predicción lineales adecuados y reproducibles [$R^2 \geq 0.80$, nivel de significancia $p < 0.05$, coeficiente de varianza (CV) $\leq 10\%$, prueba de falta de ajuste > 0.1] para cada una de las variables de respuesta estudiadas (AAox, CFT y RH).
2. La mejor combinación de variables de proceso de fermentación en estado sólido (temperatura y tiempo de fermentación) para la producción de HGBO con valores altos de AAox [ABTS=9,663 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ muestra (bs), ORAC= 15,358 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ muestra (bs)], CFT [200.9 mg EAG/100g muestra (bs)] y RH (18.81%) fue TF=25 °C/tF=132 h.
3. La FES incrementó ($p < 0.05$) la AAox en un 183% (por el método de ABTS) y 212% (método de ORAC), los CFT en un 225% y el RH en un 38%.
4. El proceso de FES incrementó ($p < 0.05$) el contenido de proteína (+38.3%), lípidos (+19.8%) y fibra dietaria soluble (FDS), insoluble (FDI) y total (FDT) (+72.9%, +50.9% y +55.5%, respectivamente) y disminuyó ($p < 0.05$) el contenido de carbohidratos (-12.5%) y de cenizas (-17.7%).
5. La FES incrementó ($p < 0.05$) la diferencia total de color (+44.4%), el índice de absorción de agua (+52.2%), el índice de dispersabilidad (+94.7%), la capacidad de absorción de aceite (+17.7%), la capacidad de formación de espuma (+15.4%) y la actividad de emulsión (+23.1%), y disminuyó ($p < 0.05$) el valor hunter "L" (-12.5%), el índice de solubilidad en agua (-18.8%) y la estabilidad de espuma (-33.8%) y de emulsión (-88.7%).

6. El proceso de FES disminuyó ($p < 0.05$) un 9.5% el potencial antihipertensivo de garbanzo, medido como porcentaje de inhibición de ECA (de 97.9 a 88.6%).
7. La metodología de superficie de respuesta fue una herramienta útil para la optimización del bioproceso de FES de garbanzo para la obtención de una harina con AAox, CFT y RH altos.

XI BIBLIOGRAFÍA

- Abilés JS. 2007. Estrés oxidativo y su relación con el aporte de antioxidantes nutricionales en el paciente crítico. Tesis de Doctorado. Universidad de Granada, España.
- Abu-Salem FM y Abou-Arab EA. 2011. Physico-chemical properties of tempeh produced from chickpea seeds. *Journal of American Science*, 7: 107-118.
- Acosta-Estrada BE, Gutierrez-Urbe JA, Serna-Saldivar SO. 2014. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152: 46–55.
- Actis-Goretta L, Ottaviani JI, Keen CL y Fraga CG. 2003. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. *FEBS Letters*, 555(3): 597-600.
- Adam A, Crespy V, Levrat-Verny MA, Leenhardt F, Leuillet M, Demigne C, Remesy C. 2002. The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *Journal of Nutrition*, 132: 1962–1968.
- Ademiluyi AO, Oboha G. 2013. Soybean phenolic-rich extracts inhibit key-enzymes linked to type 2 diabetes (α -amylase and α -glucosidase) and hypertension (angiotensin I converting enzyme) in vitro. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65: 305– 309.
- Adler-Nissen J. 1986. Enzymatic hydrolysis of food proteins. New York: Elsevier Applied Science Publication.
- Adom KK y Liu RH. 2002. Antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2297-2306.
- Aehle E, Müller U, Eklund PC, Willför SM, Sippl W y Dräger B. 2011. Lignans as food constituents with estrogen and antiestrogen activity. *Phytochemistry*, 72: 2396–2405.
- Afonso J, Passos CP, Coimbra MA, Silva CM. 2013. Inhibitory effect of phenolic compounds from grape seeds (*Vitis vinifera* L.) on the activity of angiotensin I converting enzyme. *Food Science and Technology*, 54: 265-270.

- Agency of Healthcare Research and Quality (AHRQ). 2011. Cómo escoger medicamentos para la presión arterial alta. Revisión de las investigaciones sobre IECA, BRA e IDR. Disponible en: http://www.effectivehealthcare.ahrq.gov/ehc/products/164/932/HighBloodPressureUpdate_SpanishConsumerGuide_20120117.pdf. Consultado en Marzo de 2014.
- Agosin E, Díaz D, Aravena R y Yáñez E. 1989. Chemical and nutritional characterization of lupine tempeh. *Journal of Food Science*, 54: 102-104.
- Agranoff J. 1999. *The Complete Handbook of Tempe*. Singapore: American Soybean Association.
- Aguilera Y, Esteban RM, Benítez V, Mollá E, Martín-Cabrejas MA. 2009. Starch, Functional Properties, and Microstructural Characteristics in Chickpea and Lentil as Affected by Thermal Processing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 57: 10682-10688.
- Aguilera Y, Martín-Cabrejas MA, Benítez V, et al. 2009b. Changes in carbohydrate fraction during dehydration process of common legumes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22: 678-683.
- Akihisa T, Nishimura Y, Nakamura N, Roy K, Gosh P, Thakur S, Tamura T. 1992. Sterols of *Cajanus cajan* and Three others Leguminosae Seed. *Phytochemistry*, (31):1765-1768.
- Akillioglu HG, Karakaya S. 2009. Effects of heat treatment and in vitro digestion on the angiotensin converting enzyme inhibitory activity of some legume species. *European Food Research and Technology*, 229: 915–21.
- Akindumila F, Glatz BA. 1998. Growth and oil production of *Apiotrichum curvatum* in tomato juice. *Journal of Food Protection*, 61(11): 1515-1517.
- Alajaji SA y El-Adawy TA. 2006. Nutritional composition of chickpea (*Cicer arietinum* L) as affected by microwave cooking and other traditional cooking methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 806-812
- Al-Asheh S y Duvnjak Z.1994. Characteristics of phytase produced by *Aspergillus carbonarius* NRC 401121 in canola meal. *Act Biotechnology*, 14(3): 223-233

- Alcaraz MJ, Ferrandiz ML. Modification of arachidonic metabolism by flavonoids. 1987. *Journal of Ethnopharmacology*, 21:209-229.
- Ali HKHQ y Zulkali MMD. 2011. Design aspects of bioreactors for solid-state fermentation: A Review. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 25 (2): 255-266
- Aluko RE. 2008a. Antihypertensive properties of plant-derived inhibitors of angiotensin I converting enzyme activity: a review. En: Govil JN, Singh VK, editors. *Recent Progress in Medicinal Plants—Phytopharmacology and Therapeutic Values IV*. Vol. 22. Houston, Tex.: Stadium Press. Pp: 541–61.
- Aluko RE. 2008b. Determination of Nutritional and Bioactive Properties of Peptides in Enzymatic Pea, Chickpea, and Mung Bean Protein Hydrolysates. *Journal of AOAC International* Vol. 91, No. 4. P: 947-956
- Amadou I, Yong-Hui S, Sun J y Guo-Wei. 2009. Fermented soybeans products: some methods, antioxidants compound extraction and their scavenging activity. *Asian Journal of Biochemistry*, 4:68-76.
- American Society of Hypertension (ASH). 2010. La presión arterial y su salud. Disponible en: <http://www.ash-us.org/documents/BloodPressureHealthSpanish.pdf>. Consultado en Marzo de 2014.
- An HJ, Kim IT, Park HJ, Kim HM, Choi JH, Lee KT. 2011. Tormentonic acid, a triterpenoid saponin, isolated from *Rosa rugosa*, inhibited LPS-induced iNOS, COX-2, and TNF- α expression through inactivation of the nuclear factor-kb pathway in RAW 264.7 macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2011 Apr; 11(4):504-10.
- Angulo-Bejarano PI, Verdugo-Montoya NM, Cuevas-Rodriguez EO, Milán-Carrillo J, Mora-Escobedo R, López-Valenzuela JA, Garzón-Tiznado JA y Reyes-Moreno C. 2008. Tempeh flour from chickpea (*Cicer arietinum* L.). Nutritional and physicochemical properties. *Food Chemistry*, 106: 106-112.
- Ankolekar C, Pinto M, Green D, Shetty K. 2011. In vitro bioassay based screening of antihyperglycemia and antihypertensive activities of *Lactobacillus acidophilus* fermented pear juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 13: 221–230.

- Annie F y Jean-Jacques M. 2003. Phenolic acids in fruits and vegetables. Flavonoids in Health and Disease, 2nd edn. New York, USA: CRC Press.
- AOAC. 1998. Official Methods of Analysis 16^o ed. Harla, Association of Official Analytical Chemists. St. Paul, EUA.
- AOAC. 1999. Official Methods of Analysis 16th edn. Association of Official Analytical Chemist, Washington, CD, EUA.
- Aoki H, Furuya Y, Endo Y y Fujimoto K. 2003. Effect of gamma-aminobutyric acid-enriched tempeh-like fermented soybean (GABA-tempeh) on the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Journal of Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67: 1806-1808
- Aparicio-Fernández X, García-Gasca T, Yousef GG, Lila MA, González de Mejía E, Loarca-Piña. 2006. Chemopreventive activity of polyphenolics from black Jamapa vean (*Phaseolus vulgaris* L) on HeLa and HaCat cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 2116-2122.
- Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinase N. 2000. Dietary intake of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *Journal of Nutrition*, 130: 2243-2250.
- Arcot K, Wong S y Ashok KS. 2002. Comparison of folate losses in soybeans during the preparation of tempeh and soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82 (12): 1365-1368.
- Argüelles-López OD. 2015. Bebida nutracéutica con potencial antioxidante y alto contenido de fenólicos a base de harinas de maíz (*Zea mays* L) MCP y garbanzo (*Cicer arietinum* L) tostados. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Sinaloa. Pp 136, 140.
- Arhewoh IM, Ahonkhai EI, Okhamafe AO. 2005. Optimising oral systems for the delivery of therapeutic proteins and peptides, *African Journal of Biotechnology*, 4(13): 1591-97.
- Ashenafi M y Busse M. 1991. Development of microorganisms during cold storage of pea and chickpea tempeh and effect of *Lactobacillus plantarum* on storage microflora. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 56: 71-78

- Astuti. 2000. A review. Tempeh, a nutritious and healthy food from Indonesia. *Asia Pacific Journal Clinical Nutrition*, 9: 322-325
- Atanacković M, Petrović A., Jović S, Bukarica LG, Bursać M y Cvejić J. 2012. Influence of winemaking techniques on the resveratrol content, total phenolic content and antioxidant potential of red wines. *Food Chemistry*, 131, 513–518.
- Aurand LW, Woods AE y Wells MR. 1987. *Food composition and analysis*. New York: Van Nostrand Reinhold Company.
- Bal dit Sollier C, Drouet L, Pignaud G, Chevallier C, Caen J, Fiat AM, Izquierdo C, Jolles P. 1996. Effect of kappa-casein split peptides on platelet aggregation and on thrombus formation in the guinea-pig. *Thrombosis Research*, 81:427–437.
- Barampama L y Simard P. 1993. Oligosaccharides, antinutritional factors, and protein digestibility of dry beans as affected by processing. *Journal of Food Science*, 59: 833-837.
- Barbana C, Boye JI. 2010. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of chickpea and pea protein hydrolysates. *Food Research International* 43, 1642–1649.
- Bazzano LA, He J, Ogden LG, Loria C, Vupputuri S, Myers L, Whelton PK. 2001. Legume consumption and risk of coronary heart disease in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study. *Archives of International Medicine*, 161, 2573–2578.
- Berry C, Brosnan MJ, Fennell J, Hamilton CA, Dominiczak AF. 2001. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 10, 247–255.
- Bibi N, Khattak AB, Khattak GSS, Mehmood Z y Ihsanullah I. 2007. Quality and consumers acceptability studies and their inter-relationship of newly evolved desi type chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.). Quality evolution of new chickpea genotypes. *International Journal of Food Science & Technology*, 42:528-534
- Birt DF, Hendrich S, Wang W. 2001. Dietary agents in cancer prevention: Flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 90: 157–177.
- Bosch A, Marona RA y Yantono OM. 1995. A single descriptive model of filamentous fungi spore germination. *Process Biochemistry*, 30 (7): 599-606

- Boschin G, Scigliuolo GM, Resta D y Arnoldi A. 2014. ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. *Food Chemistry* 145: 34–40
- Bougatef A, Balti R, Nedjar-Arroume N, Rovallec R, Adje EY, Souissi N. 2010. Evaluation of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates generated by gastrointestinal proteases: identification of the most potent active peptide. *Eur Food Res Technol* 2010;231:127–35.
- Bourdichon F, Casaregola S, Farrokh C, Frisvad JC, Gerds ML, Hammes WP, Harnett J, Huys G, Laulund S, Ouwehand A, Powell IB, Prajapati JB, Seto Y, Schure ET, Boven AV, Vanjerckhoven V, Zgoda A, Tuijelaars S, Hansen EB. 2012. A Review: Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*, 154: 87-97
- Bravo L. 1988. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56: 317–333.
- Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ. 1989. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Analytical Biochemistry* 180:136-139.
- Bullen JJ, Rogers HJ, Leigh L. 1972. Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants. *British Medical Journal* 1: 69–75.
- Burton JC, Eric Jauniaux, Oxidative stress. 2011. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 25 (2011) 287–299
- Cadenas E y Davies KJA. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29: 222–230.
- Campbell-Platt G. 1994. Fermented foods – a world perspective. *Food Research International*, 27: 253-257.
- Campos-Vega R, Loarca-Piña G y Oomah BD. 2010. Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Research International*, 43 (2): 461-482.
- Campos-Vega R, Oomah D, Loarca-Piña G, Vergara-Castañeda HA. 2013. Common beans and their non-digestible fraction: Cancer inhibitory activity — An overview. *Foods*, 2: 374–392.

- Candido R, Burrell LM, Jandeleit-Dahm KA, Cooper ME. 2004. Péptidos vasoactivos y riñón. En: El Riñón. Capítulo 16. 7ma edición. Brenner & Rector (eds). Elsevier Inc. Pp 663-726
- Cao G, Alessio HM y Cutler RG. 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine* 14: 303-311
- Cardador-Martínez A, Castaño-Tostado E, Loarca-Piña G. 2002a. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds present in common bean (*Phaseolus vulgaris* L) against aflatoxin B1. *Food Additives and Contaminants*, 19:62-69
- Cardador-Martínez A, Loarca-Piña NG, Oomah NBD. 2002b. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:6975-6980
- Cervera CP y Ortiz BJ. 2004. Tratamiento de la hipertensión arterial en un área de salud: auditoría a partir de los datos de la consulta de enfermería. *Farmacéutico de Atención Primaria*. 2: 3-11.
- Chaiyasut C, Kumar T, Tipduangta P y Rungsevijirprapa W. 2010. Isoflavone content and antioxidant activity of Thai fermented soybean and its capsule formulation. *African Journal of Biotechnology*, 9: 4120-4126.
- Champ MMJ. 2002. Non-nutrient bioactive substances of pulses. *British Journal of Nutrition* 88, S307–S318.
- Chan SY, Zhang Y, Ng TB. 2013. Brown kidney bean Bowman–Birk trypsin inhibitor is heat and pH stable and exhibits anti-proliferative activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169: 1306–1314.
- Chan YS, Wong JH, Fang EF, Pan WL, Ng TB. 2012. An antifungal peptide from *Phaseolus vulgaris* cv. brown kidney bean. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 44: 307–315.
- Chandra J, Samali A, Orrenius S. 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress, *Free Radical Biology and Medicine*, 29: 323–333.
- Chen CH, Lin JY. 1992. Inhibition of angiotensin-I-converting enzyme by tetrahydroxyxanthenes isolated from *Tripterospermum lanceolatum*. *Journal of Natural Products*, 55, 691–695.

- Chen H y Qiu W. 2010. Key Technologies for bioethanol production from lignocelluloses. *Biotechnology Advances*, 28: 566-562
- Chen ZY, Peng C, Jiao R, Wong YM, Yang N, Huang Y. 2009. Anti-hypertensive Nutraceuticals and Functional Foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57: 4485–4499.
- 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* spp. *European Food Research and Technology* 236: 1107–1113.
- Chibbar RN, Ambigaipalan P, Hoover R. 2010. Molecular diversity in pulse seed starch and complex carbohydrates and its role in human nutrition and health. *Cereal Chem* 87, 342-352.
- Chun Cui, Mouming Zhao, Boen Yuan, Yuanhong Zhang, and Jiaoyan Ren. 2013. Effect of pH and Pepsin Limited Hydrolysis on the Structure and Functional Properties of Soybean Protein Hydrolysates. *Journal of Food Science*, 78 (12): C1871-C1877.
- Clare DA, Swaisgood HE. 2000. Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83:1187-1195.
- Clark J. 1996. Tocopherols and sterols from soybeans. *Lipid Technology* 8: 111-114.
- Cornelli U. 2009. Antioxidant use in nutraceuticals. *Clinics in Dermatology* 27: 175–194
- Cornish J, Palmano K, Callon KE, Watson M, Lin JM, Valenti P, Naot D, Grey AB, Reid IR. 2006. Lactoferrin and bone; structure–activity relationships. *Biochemistry and Cell Biology*, 84: 297–302.
- Cotelle N. 2001. Role of flavonoids in oxidative stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1: 569-590.
- Cross KJ, Huq NL, Palamara JE, Perich JW, Reynolds EC. 2005. Physicochemical characterization of casein phosphopeptideamorphous calcium phosphate nanocomplexes. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 15362-15369.
- Cross ML, Gill HS. 2000. Immunomodulatory properties of milk. *British Journal of Nutrition*, 84: S81–S89.

- Crouch SP, Slater KJ, Fletcher J. 1992. Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. *Blood*, 80: 235–240
- Cubero, J.I. 1975. The research on chickpea (*Cicer arietinum*) in Spain. Pages 117-122 in Proceedings of the International Workshop on Grain Legumes, 13-16 Jan 1975, ICRISAT, Hyderabad, India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
- Cummings JH, Stephen AM y Branch WJ. 1998. Implications of dietary fibre breakdown in the human colon. In *Banbury Report 7 Gastrointestinal Cancer*, pp. 71-81 [WR Bruce, P Correa, M Lipkin, S Tannenbaum and TD Wilkins, editors]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Dalgetty DD y Baik BK. 2003. Isolation and characterization of cotyledon fibres from peas, lentils, and chickpea. *Cereal Chemistry* 80, 310-315.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D. 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*; 329: 23–38.
- Davies KJA y Lin SW. 1987. Pacifici, Protein damage and degradation by oxygen radicals. Part 4. Degradation of denatured protein. *Journal of Biological Chemistry*, 262: 9914–9920.
- Davies KJA, Delsignore ME, Lin SW. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. Part 2. Modification of aminoacids, *Journal of Biological Chemistry*, 262: 9902–9907.
- Davies KJA, Delsignore ME. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. Part 3. Modification of secondary and tertiary structure. *Journal of Biological Chemistry*, 262 9908– 9913.
- Davies KJA. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. Part 1. General-aspects. *Journal of Biological Chemistry*, 262: 9895–9901.
- Davin L y Lewis N. 2003. An historical perspective on lignan biosynthesis: monolignol, allylphenol and hydroxycinnamic acid coupling and downstream metabolism. *Phytochemistry Reviews*, 2, 257–288.
- De Almeida Costa GE, da Silva Queiroz-Monici K, Machado Reis SMP, Costa de Oliveira A. 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(1): 47-65.
- De Mejía E, Castaño-Tostado E y Loarca-Piña G. 1999. Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. *Mutation Research*, 411(1): 1-9
- Delmas D, Lancon A, Colin D, Jannin B y Latruffe N. 2006. Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising molecule for fighting cancer. *Current Drug Targets*, 7, 423–442.
- De-whallely C, Rankin SM, Houct JRS, Jessup W, Leake DS. 1990. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein by macrophages. *Biochemical Pharmacology*, 39: 1743-1750.
- Dinesh P, Bhakayaraj R y Vidhyalaksmi R. 2009. A Review: A low cost nutritious food “Tempeh”. *World Journal of Dairy and Food Sciences*, 4(1): 22-27
- Dizdaroglu M, P. Jaruga, M. Birincioglu, H. Rodriguez. 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement, *Free Rad. Biol. Med.* 32: 1102–1115.
- Domínguez-Arispuro DM. 2011. Propiedades nutraceuticas de genotipos de garbanzo (*Cicer arietinum* L) del Banco Mundial de Germoplasma. Efecto del procesamiento. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Sinaloa. Pp 132
- Domínguez-Vega E, Kotkowska O, García MC, Crego AL. 2011. Fast determination of the functional peptide soymetide in different soybean derived foods by capillary-high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography .A* 1218(30): 4928-4933.
- Drent ML, Larsson I, William-Olsson T, Quaade F, Czubayko F, von Bergmann K, Strobel W, Sjostrom L, van der Veen EA. 1995. Orlistat (Ro 18-0647), a lipase inhibitor, in the treatment of human obesity: a multiple dose study. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 19(4): 221-6.
- Drescher K, Roos N, Pfeuffer M, Seyfert HM, Schrezenmeir J, Hagemeister H. 1999. Recovery of ¹⁵N-lactoferrin is higher than that of ¹⁵N-casein in the small intestine of suckling, but not adult miniature pigs. *Journal of Nutrition*, 129: 1026–1030.

- Duthie SJ, Dobson VL. 1999. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *European Journal of Nutrition*, 38: 28–34.
- Edenharder, R., Tang, X., 1997. Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarins, quinones and other phenolic compounds. *Food and Chemical Toxicology* 35, 357–372.
- Egounlety M y 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
- Eklund-Jonsson C, Sandberg AS y Alminger M. 2006. Reduction of phytate content while preserving mineral content during whole grain cereal tempeh fermentation. *Journal of Cereal Science*, 44: 154-160
- El Gharras H. 2009. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 2512–2518.
- Erdmann K, Cheung YBW y Schröder H. 2008. The possible roles of food derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19: 643-654
- Esaki H, Onozaki H, Kawakishi S y Osawa T. 1996. New antioxidant isolated from tempe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 696-700
- Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS, Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research* 567 (2004) 1–61
- FAO/WHO. 1991. Protein Quality Evaluation, Food and Agricultural Organization of the United Nations. Roma, Italy. Pp 66.
- FAOSTAT. 2015. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>. Consultado en Marzo de 2015.
- Feng XM, Passoth V, Eklund-Jonsson C, Alminger MLA y Schnurer J. 2007. *Rhizopus oligosporus* and yeast co-cultivation during barley tempeh fermentation – nutritional impact and real-time PCR quantification of fungal growth dynamics. *International Journal of Food Microbiology*, 24: 393-402

- Fernandez-Orozco R, Frias J, Muñoz R, Zielinski H, Piskula MK, Kozłowska H. 2007. Fermentation as a bio-process to obtain functional soybean flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 8972–8979.
- Fiat AM, Migliore-Samour D, Jolle's P, Drouet L, Collier C, Caen J. 1993. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *Journal of Dairy Science*, 76: 301–310.
- FIM. The Foundation for Innovative Medicine. The nutraceuticals initiative: a proposal for economic and regulatory reform, *Food Technology* 1992;6:77
- Firman G. 2004. Hipertension arterial: el asesino silencioso. Educación para pacientes. Disponible en: http://www.intermedicina.com/Avances/Interes_General/AIG25.pdf. Consultado en Marzo de 2014.
- FitzGerald RJ, Murray BA, Walsh DJ. 2004. Hypotensive peptides from milk proteins. *Journal of Nutrition*, 134(4): 980S–8S.
- Fitzgerald RJ, Murray BA. 2006. Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technoly*, 59:118-125.
- FitzGerald RJ. 1998. Potential uses of caseinophosphopeptides. *International Dairy Journal*, 8: 451–457.
- Flight, I., & Clifton, P. (2006). Cereal grains and legume in the prevention of coronary heart disease and stroke: A review of the literature. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60, 1145–1159.
- Friedman M. 1996. A review. Nutritional value of proteins from different food sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44:6-29
- Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. 1995. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoproteins to lipid peroxidation. *American Society for Nutrition*, 61: 549-554.
- Fung CDY, Crozier-Dodson A. 2008. Tempeh: a mold-modified indigenous fermented food: En: Edward R. Farnworth editores. *Handbook of fermented functional foods*. 2da ed. Boca Raton, FL, EUA. Pp 476-491

- Ge SJ, Zhang LX. 1993. Predigestion of Soybean Proteins with Immobilized Trypsin for Infant Formula. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 43: 199-209
- Geervani P. 1991. Utilization of chickpea in India and scope for novel and alternative uses. In *Proceedings of a Consultants Meeting*, pp. 47-54. AP, India: ICRISAT.
- Gibbs BF, Zougman A, Masse R y Mulligan C. 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research International*, 37: 123-131
- González de Mejía A, Castaño-Tostado E, Loarca Piña G. 1999. Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. *Mutation Research* 441: 1–9
- Goyal S, Lambert C, Cluzet S, Mérillon JM y Ramawat KG. 2012. Secondary metabolites and plant defence. En: *Plant Defence: Biological Control*, JMM Mérillon y KGG. Ramawat (ed). Pp. 109–138. Berlin: Springer.
- Griffiths LA. 1982. Mammalian metabolism of flavonoids. En *The Flavonoids: Advances in Research*, ed. J. Harborne and T. Mabry, pp. 681-718. Chapman and Hall, London.
- Gryglewski RJ, Korbut R, Robak J, Swips J. 1987. On the mechanism of anti thrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol*, 36: 317- 322.
- Gubler H, Schopfer U, Jacoby E. 2012. Theoretical and Experimental Relationships between Percent Inhibition and IC50 Data Observed in High-Throughput Screening. *Journal of Biomolecular Screening*, 18(1): 1-13.
- Guerrero L, Castillo J, Quiñones M, Garcia-Vallvé S, Arola L, Pujadas G, Mugerza B. 2012. Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme Activity by Flavonoids: Structure- Activity Relationship Studies. *PLoS ONE* 7(11): e49493. doi:10.1371/journal.pone.0049493.
- Guo H, Kouzuma Y, Yonekura M. 2009. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. *Food Chemistry*, 113: 238–245.
- Gurr, M.I. y Asp, NG. 1994. Dietary fibre. *ILSI Europe Concise Monograph Series*. International Life Sciences Institute, Washington, DC.
- Guzmán-Uriarte L, Sánchez-Magaña LM, Angulo-Meza GY, Cuevas-Rodríguez EO, Gutiérrez-Dorado R, Mora-Rochín S, Milán-Carrillo 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.
- Hachmeister AK y Fung CDY. 1993. Tempeh: a mold modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal grains. *Critical Reviews in Microbiology*, 19: 137-188
- Halliwell B & Gutteridge JMC. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford: Oxford Science Publications, 1999.
- Halliwell B, Gutteridge J, 1998. *Free radicals in biology and medicine*, 3 rd Ed. Oxford Science Publications, Oxford, pp 936.
- Halliwell B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16: 33–50.
- Hamerstrand GE, Black LT, Glover JD. 1981. Trypsin Inhibitors in Soy Products: Modification of the Standard Analytical Procedure. *Cereal Chemistry*, 58: 42-45.
- Han H, Baik BK. 2008. Antioxidant activity and phenolic content of lentils (*Lens culinaris*), chickpeas (*Cicer arietinum* L.), peas (*Pisum sativum* L.) and soybeans (*Glycine max*), and their quantitative changes during processing. *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 1971–1978.
- Handa CL, Couto UR, Vicensoti AH, Georgetti SR, Ida EI. 2014. Optimisation of soy flour fermentation parameters to produce β -glucosidase for bioconversion into aglycones. *Food Chemistry*, 152: 56-65.
- Harborne JB. 1989. General procedures and measurement of total phenolics. En: Harborne JB (ed) *Methods in plant biochemistry*, vol 1, Plant phenolics. Academic, London, pp 1–28.
- Hardy G. 2000. Nutraceuticals and Functional Foods: Introduction and Meaning. *Nutrition Volume 16, Numbers 7/8*. 16:688–689
- Hartmann R, Meisel H. 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnoloy*, 18: 163–9.
- Hertag MG, Feskens EJ, Hallman PC, Katan MB, Kromhout D. 1993a. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet*, 342: 1007-1011.

- Hertag MG, Hallman PC, Katan MB, Kromhout D. 1993b. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutrition and Cancer*, 20: 21-29.
- Hollander PA, Elbein SC, Hirsch IB, Kelley D, McGill J, Taylor T, Weiss SR, Crockett SE, Kaplan RA, Comstock J, Lucas CP, Lodewick PA, Canovatchel W, Chung J, Hauptman J. 1998. Role of orlistat in the treatment of obese patients with type 2 diabetes. A 1-year randomized double-blind study. *Diabetes Care* 21:1288–1294
- Hollman PCH, de Vries JHM, van Leeuwen SD, Mengelers MJB, Katan MB. 1995. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*. 62: 1276-1282.
- Hopia A y Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 76, 139–144.
- Horiguchi N, Horiguchi H, Suzuki Y. 2005. Effect of wheat gluten hydrolysate on the immune system in healthy human subjects. *Bioscience Biotechnoly and Biochemistry*, 69:2445-2449.
- Hsu HW, Vavak DL, Satterlee LD y Miller GA. 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Science*, 42:1269-1273
- Huang D. Ou B, Hampsch-Woodill M y Flanagan J. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(16):4437-4444.
- Humiski LM, Aluko RE. 2007. Physicochemical and bitterness properties of enzymatic pea protein hydrolysates. *Journal of Food Science*, 72: 605-611.
- Hung YH, Huang HY, Chou CC. 2007. Mutagenic and antimutagenic effects of methanol extracts of unfermented and fermented black soybeans. *International Journal of Food Microbiology*, 118: 62–68
- Hung, Y.H., 2006. Antimutagenic activity and mechanism of black soybean koji. Tesis de Maestría. National Taiwan University, Taipei, Taiwan.
- Hur SJ, Lee SY, Kim YC, Choi I, Kim GB. 2014. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry* 160: 346–356

- Hutkins RW. 2006. Microbiology and technology of fermented foods. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. Pp: 436-443
- Huynh NT, Van-Camp J, Smagghe G, Raes K. 2014. Improved release and metabolism of flavonoids by steered fermentation processes: a review. International Journal of Molecular Sciences 15: 19369–19388.
- Ignat I, Volf I y Popa VI. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. Food Chemistry, 126, 1821–1835.
- Iijima K, Aviram M. 2001. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. Current Opinion in Lipidology; 12:41-48.
- Ioku K, Tsushida T, Takei Y, Nakatani N, Terao J. 1995. Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers. Biochimica et Biophysica Acta, 1234: 99–104.
- Jambunathan R y Singh U. 1980. Studies on desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. 1. Chemical composition. In Proceedings of the International Workshop on Chickpea Improvement, pp. 61-66. AP, India: ICRISAT.
- Jolles P, Fiat A-M, Migliore-Samour D, Drouet L, Caen JP. 1993. Peptides from milk proteins implicated in antithrombosis and immunomodulation. En: Benner B, Sawatzki G (eds) New perspectives in infant nutrition, symposium Antwerp. Thieme Medical Publishers, New York, pp 160–172.
- Jolles P, Levy-Toledano S, Fiat AM, Soria C, Gillessen D, Thomaidis A, Dunn FW, Caen JP. 1986. Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from kappa-casein on platelet function. European Journal of Biochemistry, 158: 379–382.
- Juan MY y Chou CC. 2010. Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC14715. Food Microbiology 27. P. 586-591.
- Jukanti AK, Gaur PM, Gowda CLL, Chibbar RN. 2012. Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. British Journal of Nutrition 108 (1): S11-S26.

- Junfeng F, Saito M, Tatsumi E, Lite LI. 2003. Preparation of angiotensin I-converting enzyme inhibiting peptides from soybean protein by enzymatic hydrolysis.
- Kalogeropoulos N, Chiou A, Ioannou M, Karathanos VT, Hassapidou M, Andrikopoulos NK. 2010. Nutritional evaluation and bioactive microconstituents (phytosterols, tocopherols, polyphenols, triterpenic acids) in cooked dry legumes usually consumed in the Mediterranean countries. *Food Chemistry* (121): 682-690.
- Kao C y Robinson RJ. 1978. Nutritional aspects of fermented foods from chickpea, horsebean and soybean. *Cereal Chemistry*, 3: 512-517
- Kaur C y Kapoor HC. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 703–725
- Keuth S y Bisping B. 1993. Formation of vitamins by pure cultures of tempe moulds and bacteria during the tempe solid substrate fermentation. *Journal of Applied Bacteriology*, 75: 427-434.
- Kiers JL, Nout MJR y Rombouts FM. 2000. In vitro digestibility of processed and fermented soy bean, cowpea and maize. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1325-1331
- Kim D, Jeond S, Lee C. 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81: 321-326.
- Kim JE, Hwang K y Lee SP. 2010. ACE inhibitory and hydrolytic enzyme activities in textured vegetable protein in relation to the solid state fermentation period using *Bacillus subtilis* HA. *Food Science and Biotechnology*, 19 (2): 487-495
- Kitts DD, Weiler K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9:1309-1323.
- Konishi Y, Zhao Z, Shimizu M. 2006. Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54: 7539–7543.
- Korhonen H, Pihlanto A. 2003. Food-derived bioactive peptides —opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9:1297-1308.

- Kozuma K, Tsuchiya S, Kohori J, Hase T, Tokimitsu I. 2005. Antihypertensive effect of green coffee bean extracts on mildly hypertensive subjects. *Hypertension Research*, 28: 711-718.
- Kuba M, Shinjo S, Yasuda M. 2004. Antihypertensive and hypocholesterolemic effects of tofuyo in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Health Sciences*, 60: 670-673.
- Kühnau J. 1976. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics* 24: 117-191.
- Kurien PP. 1981. En "Processing of pulses. Proceedings of the workshop on grain legumes" (Aiyer, A.S., Iyer, K.R. Eds.). Bombay: Protein Foods and Nutrition Development Association of India, 68–77.
- Ladizinsky G., Adler A. 1976. The Origin of Chickpea *Cicer Arietinum* L. *Euphytica*, 25: 211 217
- Lam SK, Ng TB. 2013. Purification and characterization of an antifungal peptide with potent antifungal activity but devoid of antiproliferative and HIV reverse transcriptase activities from legumi secchi beans. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169: 2165–2174.
- Larone DH. 1995. Medically important fungi – A guide to identification. 3rd Ed ASM Press, Washington DC. EUA.
- Lattanzio V. 2013. Phenolic compounds: introduction. En: Ramawat KG, Mérillon JM (eds.), *Natural Products*, DOI 10.1007/978-3-642-22144-6_57, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013.
- Laurena AC, García VV, Mendoza EMT. 1986. Effects of soaking in aqueous acid and alkali solutions on removal polyphenols and *in vitro* digestibility of cowpea. *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition*, 36: 107.
- Laursen I, Briand P, Lykkesfeldt AE. 1990. Serum albumin as a modulator on growth of the human breast cancer cell line, MCF-7. *Anticancer Research*, 10: 343–351.
- Lee HJ. 2002. Protein drug oral delivery: The recent progress. *Archives of Pharmacal Research*, 25 (5): 572-84.

- Lee IH, Chou CC, 2006. Distribution profiles of isoflavone isomers in black bean kojis prepared with various filamentous fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 1309–1314.
- Lee IH, Hung YH, Chou CC. 2008. Solid state fermentation with fungi to enhance the antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean. *International Journal of Food Microbiology*, 121: 150-156
- Lee KA, Kim SH. 2005. SSGE and DEE, new peptides isolated from a soy protein hydrolysate that inhibit platelet aggregation. *Food Chemistry*, 90: 389-393
- Leyva LE, del Pozo HA, Perez D. 2000. Óxido nítrico y su relación con la hipertensión arterial. *Rev Cubana Med* 2000; 39(3):174-9
- Li PG, Xu JW, Ikeda K, Kobayakawa A, Kayano Y, Mitani T, Ikami T, Yamori Y. 2005. Caffeic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation induced by angiotensin II in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens. Res.* 4, 369–377.
- Lien EJ, Ren SJ, Bui HUH, Wang RB. 1999. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. 26: 285–94.
- Lin CH, Wei YT y Chou CC. 2006. Enhanced antioxidative activity of soybean koji prepared with various filamentous fungi. *Food Microbiology Journal* 23: 628-633.
- Lin P, Wong JH, Ng TB. 2010. A defensin with highly potent antipathogenic activities from the seeds of purple pole bean. *Bioscience Reports*, 30: 101–109.
- Ling WH y Jones PJ. 1995. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci* 57, 195-206.
- López-Cervantes J, Sánchez-Machado DI y Rosas-Rodríguez JA. 2006. Analysis of free amino acids in fermented shrimp waste by high-performance liquid chromatography. *J Chromatography A*. 1105:106-110
- Ludueña B, Mastandrea C, Chichizola C y Franconi MC. 2007. Isoflavonas en soja, contenido de diadzeina y genisteina y su importancia biológica. *Revista de la Asociación Bioquímica Argentina-Bioquímica y Patología Clínica*, 71(1): 54-66

- Luna Vital DA, González de Mejía E, Dia VP, Loarca-Piña G. 2014. Peptides in common bean fractions inhibit human colorectal cancer cells. *Food Chemistry*, 157: 347–355.
- Maes W, Van Camp J, Vermeirssen V, Hemeryck M, Ketelslegers JM, Schrezenmeier J, Van Oostveldt P, Huyghebaert A. 2004. Influence of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on the release of endothelin-1 by endothelial cells. *Regulatory Peptides*, 118: 105–109.
- Nurminen ML, Sipola M, Kaarto H, Pihlanto-Leppälä A, Piilola K, Korpela R, Tossavainen O, Korhonen H, Vapaatalo H. 2000. α -lactorphin lowers blood pressure via radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, 66: 1535–1543.
- Maes W, Van Camp J, Vermeirssen V, Hemeryck M, Ketelslegers JM, Schrezenmeier J, Van Oostveldt P, Huyghebaert A. 2004. Influence of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on the release of endothelin-1 by endothelial cells. *Regulatory Peptides* 118: 105–109.
- 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
- Marnett LJ. 1999. Lipid peroxidation — DNA damage by malondialdehyde, *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 424: 83–95.
- Martínez C, López G, Ros G, Vidal GM y Abellán BP. 2000. Use of heme iron concentrate in the fortification of weaning foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 2930-2936
- Martínez-Martínez A. 2001. Saponinas esteroides. Facultad de Química Farmacéutica, Medellín, Colombia.
- Mathers JC. 2002. Pulses and carcinogenesis: potential for the prevention of colon, breast and other cancers. *British Journal of Nutrition*. 88(3): S273-S279.
- McCue P y Shetty K., 2003. Role of carbohydrate-cleaving enzymes in phenolic antioxidants mobilization from whole soybean fermented with *Rhizopus oligosporus*. *Food Biotechnology*, 17: 27–37.

- McCue P, Horii A y Shetty K. 2003. Solid-state bioconversion of phenolic antioxidants from defatted soybean powders by *Rhizopus oligosporus*: role of carbohydrate-cleaving enzymes. *Journal of Food Biochemistry*, 27: 501-514.
- Meagher LP y Beecher GR. 2000. Assessment of data on the lignan content of foods.
- 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(9): 1974–81.
- Meisel H, FitzGerald RJ. 2000. Opioid peptides encrypted in intact milk protein sequences. *British Journal of Nutrition*, 84(1): 27–31.
- Meisel H, Goepfert A, Gunther S. 1997. ACE-inhibitory activities in milk products. *Milchwissenschaft* 52: 307-311.
- Meisel H. 2004. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors*, 21:55-61.
- Miguel M, López-Fandiño R, Recio I, Amaya A y Ramos M. 2003. Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de la clara de huevo obtenidos mediante hidrólisis enzimática. Premio a la Investigación 2003. Pp 1-22.
- Miszkievicz H, Bizukojc M, Rozwandowickz A y Stanislaw B. 2004. Physiological properties and enzymatic activities of *Rhizopus oligosporus* in solid state fermentations. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 7 (1): 1-6.
- Miyazawa, M., Sakano, K., Nakamura, S., Kosaka, H., 1999. Antimutagenic activity of isoflavones from soybean seeds (*Glycine max* Merrill). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1346–1349.
- Modgil R y Mehta U. 1993. Protein quality of chickpea (*Cicer arietenum*) with different grades of *Callosobruchus chinensis* L. infestation. *Plant Foods for Human Nutrition* 44: 157-162, 1993. © 1993 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands
- Molina E, Papadopoulou A, Ledward DA. 2001. Emulsifying properties of high-pressure treated soy protein isolates and 7S and 11S globulins. *Food Hydrocolloids* 15: 263–9.

- Möller NP, Scholz-Ahrens KE, Roos N, Schrezenmeir J. 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47:171–182.
- Moore D y Prior C.1993. The potential of mycoinsecticides. *Biocontrol News and Information*. 14:31-40
- Mora-Rochín S, Gutiérrez-Urbe JA, Serna-Saldívar SO, Sánchez-Peña P, Reyes-Moreno C y Milán-Carrillo J. 2010. Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusión cooking. *Journal of Cereal Science*, 52: 502-508.
- Moreau RA, Whitaker BD y Hicks KB. 2002. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res* 41, 457-500
- Morrow JD. 2005. Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and risk of atherosclerosis in humans. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25: 279–286.
- Mugula JK, Lyimo M. 2000. Evaluation of the nutritional quality and acceptability of sorghum-based tempe as potential weaning foods in Tanzania. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 51: 269-277.
- Mugula K. 1992. Evaluation of the nutritive value of maize-soybean tempeh as a potential food in Tanzania. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 43:113-119
- Mulyowidarso FGH y Bukle KA. 1991. Changes in the concentration of carbohydrates during the soaking of soybeans for tempe production. *International Journal of Food Science and Technology*, 26: 595-606.
- Muralami H, Asakawa T, Terao J y Matsushita S. 1984. Antioxidative stability of tempe and liberation of isoflavones by fermentation. *Journal of Agricultural and Biological Chemistry*, 48:2971-2975
- Murphy PA, Song T, Buseman G, Barua K. 1997. Isoflavones in soybased infant formulas. *J. Agric. Food Chem*, 45: 4635–4638.
- Mussato SI, Ballesteros LF, Martins S y Teixeira JA. 2012. Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes. En: *Industrial Waste*. Kuan Yeow

- Show and Xinxin Guo (Ed), ISBN: 978-953-51-0253-3, InTech, Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/industrial-waste/use-of-agro-industrial-wastes-in-solid-state-fermentation-processes>. Consultado en Marzo de 2014
- Nair VC y Duvnjak Z. 1991. Phytic acid content in canola meal by various microorganisms in a solid state fermentation process. *Act biotechnology*, 3:211-218.
- Nakahara T, Sano A, Yamaguchi H, Sugimoto K, Chikata H, Kinoshita E, Uchida R. 2010. Antihypertensive Effect of Peptide-Enriched Soy Sauce-Like Seasoning and Identification of Its Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Substances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 821–827.
- Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H, Shahidi F. 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry*, 124: 1354–1362.
- Nardini M., Ghiselli A. 2004. Determination of free and bound phenolic acids in beer. *Food Chemistry*, 84(1): 137–143.
- Navarro-Nuñez L, Castillo J, Lozano M, Martínez C, Benavente-García O, Vicente V, Rivera J. 2009. Tromboxane A2 receptor antagonist by flavonoids: structure-activity relationships. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57: 1589–1594.
- NHS Choices. 2008. Tensión arterial alta. Queen's Printer and Controller of HMSO. Disponible en: http://www.nhs.uk/translationspanish/documents/blood_pressure_high_spanish_final.pdf. Consultado en Marzo de 2014
- Nijveldt RJ, Van Nood E, Van Hoorn DEC, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen PAM. 2001. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74: 418–425.
- Noroozi M, Angerson WJ, Lean MEJ. 1998. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *American Journal of Clinical Nutrition*. 67:1210–18.
- Norris R, FitzGerald R. 2013. Antihypertensive peptides from food proteins. En: Hernández-Ledesma B, Hsieh CC, editors. *Bioactive food peptides in health and disease*. Rijeka, Croatia: Intech Prepress. Pp: 45–72.

- Nout MJR y Kiers JL. 2005. Tempe fermentation innovation and functionality: up-date into the 3rd millennium. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 789-805
- Nout MJR y Rombouts FM. 1990. A review: Recent developments in tempe research, *Journal of Applied Bacteriology*, 69: 609-633
- Nout MJR, Beernink G y Bonants van Laarhoven TMG. 1987. Growth of *Bacillus cereus* in soybean tempeh. *International Journal of Food Microbiology*, 4: 293-301
- Oboh G, Ademiluyi AO y Akindahunsi AA. 2009. Changes in polyphenols distribution and antioxidant activity during fermentation of some underutilized legumes. *Food Science and Technology International*, 15(1):41-46
- Oboh G, Akindahunsi AA. 2003. Biochemical changes in Cassava products (flour & gari) subjected to *Saccharomyces cerevisiae* solid media fermentation. *Food Chemistry*, 82(4): 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.
- Okamoto A, Hanagata H, Kawamura Y y Yanagida F. 1995. Anti-hypertensive substances in fermented soybean, natto. *Plant Foods Human Nutrition*, 47: 39-47
- Okitsu M, Morita A, Kakitani M, Okada M, Yokogoshi H. 1995. Inhibition of the endothelin-converting enzyme by pepsin digests of food proteins. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 59: 325–326.
- Olaíz-Fernández G, Shama T, Rojas R, Villalpando S, Hernández M, Sepúlveda J. 2006. Encuesta nacional de salud y nutrición (ENSANUT). Instituto Nacional de Salud Pública y Secretaría de Salud. Pp. 76-82
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 1990. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades. Serie de informes técnicos 797. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_797_%28part1%29_spa.pdf. Consultado en Marzo de 2014.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2002. Quantifying selected mayor risks to health. The World Health Report. World Healt Organization. Disponible en: http://www.who.int/whr/2002/en/whr02_ch4.pdf. Consultado en Marzo de 2014.

- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2015b. Raised blood pressure: Situation and trends. Disponible en: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence_text/en/. Consultado en Marzo de 2015
- Osman HE, Maalej N, Shanmuganayagam D, Folts JD. 1998. Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits plate activity in dogs and monkey's. *Journal of Nutrition*, 128: 2307-2312
- Ou B, Hampsch-Woodill M y Prior RL. 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(10): 4619-4626
- Özer S, Karaköy T, Toklu F, et al. (2010) Nutritional and physicochemical variation in Turkish kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) landraces. *Euphytica* 175, 237-249.
- Pacher P, Beckman JS y Liaudet L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, 87: 315–424.
- Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR y Nigam P. 1999 Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, 77, 149–162.
- Pandey A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 81–84.
- Papenburg R, Bounous G, Fleischer D, Gold P. 1990. Dietary milk proteins inhibit the development of dimethylhydrazine-induced malignancy. *Tumour Biology*, 11: 129–136.
- Paredes-López O y Harry GI. 1989. Changes in selected chemical and antinutritional components during tempeh preparation using fresh and hardened common beans. *Journal of Food Science*, 54: 968-970
- Parellada J, Suárez G, Guinea M. 1998. Inhibition of zinc metallopeptidases by flavonoids and related phenolic compounds: structure-activity relationships. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 13: 347–359.
- Park KY, Jung KO, Rhee SH, Choi YH. 2003. Antimutagenic effects of doenjang (Korean fermented soypaste) and it's active compounds. *Mutation Research* 523, 43–53.

- Pedroche J, Yust MM, Girón-Calle J, Alaiz M, Millán F, Vioque J. 2002. Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 960–965.
- Pérez DD, Strobel P, Foncea R, Díez MS, Vasquez L, Uriquiaga I, Castillo O, Cuevas A, San Martín A, Leighton F. 2002. Wine, diet, antioxidant defenses, and oxidative damage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957:136–145.
- Perpetuo EA, Juliano L, Lebrun I. 2003. Biochemical and pharmacological aspects of two bradykinin-potentiating peptides from tryptic hydrolysis of casein. *Journal of Protein Chemistry*, 22: 601–606.
- Pihlanto A, Mäkinen S. 2013. Antihypertensive Properties of Plant Protein Derived Peptides. En *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*. Editor Blanca Hernandez-Ledesma and Chia-Chien Hsieh. P: 266
- Price N, Jackson V, Halestrap A. 1998. Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past. *Biochemical Journal*, 329:321–328.
- Prior RL, Wu X y Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302
- Pripp AH, Isaksson T, Stepaniak L, Sørhaug T, Ardö I. 2005. Quantitative structure activity relationship modelling of peptides and proteins as a tool food science. *Trends in Food Science & Technology*, 16:484–94.
- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50:586–621.
- Quintana-Najera J. 2014. Efecto de las variables del proceso de tostado sobre propiedades tecnológicas y capacidad antioxidante de garbanzo (*Cicer arietinum* L). Tesis de Licenciatura.
- Raikos V. 2010 .Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. A review. *Food Hydrocolloids*, 24: 259–265

- Raimbault M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Journal of Biotechnology*, 1: 174-188.
- Ramakrishnan VV, Ghaly AE, Brooks MS, Budge SM. 2013. Extraction of Proteins from Mackerel Fish Processing Waste Using Alcalase Enzyme. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, 3(2): 1-9.
- Randhir R y Shetty K. 2007. Mung beans processed by solid state bioconversion improves phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8: 197-204.
- Randhir R, Vatterm DA y Shetty K. 2004. Solid-state bioconversion of fava bean by *Rhizopus oligosporus* for enrichment of phenolic antioxidants and LDOPA. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5: 235-244.
- Randhir R, Vatterm DA y Shetty K. 2004. Solid-state bioconversion improves phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8: 197-204
- Ratnayake WS, Hoover R, Shahid F, Perera C y Jane J. 2001. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of starches from four field peas (*Pisum sativum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 74, 189-202.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M y Rice Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26:1231-1237
- Reddy NR y Pierson MD. 1994. Reduction in antinutritional and toxic components in plant foods by fermentation. *Food Research International Journal*, 27: 281-290.
- Ren W, Qian Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. 2003. Flavonoids: Promising anticancer agents. *Medicinal Res Rev* 23(4): 519-534.
- Reyes-Bastidas M, Reyes-Fernández EZ, López-Cervantes J, Milán-Carrillo j, Loarca-Piña GF y Reyes-Moreno C. 2010. Physicochemical, nutritional and antioxidant properties of tempeh flour from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Science and Technology International*, 16: 426-432.
- Reyes-Bastidas M. 2008. Capacidad antioxidante de tempes de garbanzo (*Cicer arietinum* L) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Sinaloa. Pp 146

- Reyes-Moreno C, Cuevas-Rodríguez EO, Milán-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
- Reyes-Moreno C, Romero-Urias C, Milán-Carrillo J y Gómez-Garza RM. 2000a. Composición química y calidad nutritiva de garbanzo (*Cicer arietinum* L) después de la fermentación en estado sólido. *Food Science and Technology International*, 6(3): 251-258
- Reyes-Moreno C, Romero-Urias C, Milán-Carrillo J, Valdéz-Torres B y Zárate-Márquez E. 2000b. Optimization of the solid state fermentation process to obtain tempeh from hardened chickpeas (*Cicer arietinum* L) *Plant Foods for Human Nutrition*, 55(3): 219-228.
- Richter C, Park J-W & Ames BN. 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Nat Acad Sci USA*; 85: 6465–6467.
- Rochín-Medina JJ, Gutiérrez-Dorado R, Sánchez-Magaña LM, Milán-Carrillo J, Cuevas-Rodríguez EO, Mora-Rochín S, Valdez-Ortiz A, Reyes-Moreno C. 2015. Enhancement of nutritional properties, and antioxidant and antihypertensive potential of black common bean seeds by optimizing the solid state bioconversion process. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 66(5): 498-504.
- Robbins RJ y Bean SR. 2004. Development of a quantitative highperformance liquid chromatography-photodiode array detection measurement system for phenolic acids. *Journal of Chromatography A*, 1038: 97–105
- Robbins RJ. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2866–2887
- Roberfroid MB. 2000. A European Consensus of Scientific Concepts of Functional Foods. *Nutrition Volume 16, Numbers 7/8*. 16:689-691
- Robert PR, Zaloga GP. 1994. Dietary bioactive peptides. *New horizons*, 2: 237-43.
- Roberts PR, Burney JD, Black KW, Zaloga GP. 1999. Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion* 1999;60:332–7

- Rocha-Guzmán NE, Herzog A, González-Laredo RF, Ibarra-Pérez FJ, Zambrano-Galván G y 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
- Roos N, Mahe S, Benamouzig R, Sick H, Rautureau J, Tome D. 1995. ¹⁵N-labeled immunoglobulins from bovine colostrum are partially resistant to digestion in human intestine. *Journal of Nutrition*, 125: 1238–1244.
- Roubos van den Hil PJ, Schols HA, Rob Nout MJ, Zwietering MH y Gruppen H. 2010. First characterization of bioactive components in soybean tempe that protect human and animal intestinal cells against enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (13): 7649-7656
- Rui X, Barbana C. 2012. Electrophoretic profiles and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of nine varieties of *Phaseolus vulgaris* protein hydrolysates. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 2(8):1–6.
- Ruiz-Ruiz J, Dávila-Ortíz D, Chel-Guerrero L y Betancur-Ancona D. 2013a. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antioxidant peptide fractions from hard-to-cook vean enzymatic hidrolysates. *Journal of Food Biochemistry*, 37:26-35
- Ruiz-Ruiz JC, Segura-Campos MR, Betancur Ancona DA y Chel-Guerrero LA. 2013. Encapsulation of *Phaseolus lunatus* protein hydrolysate with angiotensin-converting enzyme inhibitory activity. *ISRN Biotechnology*, 2013(2): 1-6.
- Ruiz-Terán F y Owens JD. 1996. Chemical and enzyme changes during the fermentation of bacteria-free soy bean tempe. *Journal of Science and Food Agricultural*, 71: 523-530.
- Sabu A, Sarita S, Pandey A, Bogar B, Szakacs G y Soccol. 2002. Solid-State Fermentation for Production of Phytase by *Rhizopus oligosporus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 102–103. 251-260.
- SAGARPA-SIAP, 2013. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pecuario y Alimentación. Cierre de la Producción Agrícola por Estado. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>. Consultado en Marzo de 2015

- Saito H, Takase M, Tamura Y, Shimamura S, Tomita M. 1994. Physicochemical and antibacterial properties of lactoferrin and its hydrolysate produced by heat treatment at acidic pH. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 357: 219–226.
- Salar RK, Certik M y Brezova V. 2012. Modulation of phenolic content and antioxidant activity of maize by solid state fermentation with *Thamnidium elegans* CCF 1456. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17:109-116.
- Sánchez-Magaña LM, Cuevas-Rodríguez EO, Gutiérrez-Dorado R, Ayala-Rodríguez AE, Valdez-Ortiz A, Milán-Carrillo J, Reyes-Moreno C. 2014. Solid-state Bioconversion of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by *Rhizopus oligosporus* to improve total phenolic content, antioxidant activity and hypoglycemic functionality. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 65(5):558-564
- Sánchez-Magaña LM. 2014. Alimentos funcionales con potencial antidiabético, antihipertensivo y antioxidante a partir de garbanzo (*Cicer arietinum* L), frijol (*Phaseolus vulgaris* L) y maíz (*Zea mays* L) bioprocesados. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Sinaloa. Pp 225.
- Sarmadi H, Ismail A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31: 1949–1956.
- Sarrette M, Nout MJR, Gervais P y Rombouts FM, 1992. Effect of water activity on production and activity of *Rhizopus oligosporus* polysaccharidases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37: 420-425.
- Sartor L, Pezzato E, Dell'Aica I, Caniato R, Biggin S, Garbisa SI. 2002. Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochemical Pharmacology*, 64: 229–237.
- Satake M, Enjoh M, Nakamura Y, Takano T, Kawamura Y, Arai S, Shimizu M. 2002. Transepithelial transport of the bioactive tripeptide, Val-Pro-Pro, in human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 66: 378–84.
- Satterlee LD, Marchall HF y Tension JM. 1979. Measuring protein quality. *J Am Oil Chem Soc.* 56-109.
- Sawa T, Nakao M, Akaike T, Ono K, Maeda H. 1999. Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: Implications for the

- anti-tumor-promoter effect of vegetables. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47: 397–402.
- Saxena R, Venkaiah K, Anitha P, Venu L, Raghunath M. 2007. Antioxidant activity of commonly consumed plant foods of India: contribution of their phenolic content. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*; 58(4): 250-260
- Schofield P, Mbugua DM y Pell AN. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 21–40
- Segura-Campos M, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona DA. 2010. Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. *Revista Chilena de Nutrición*, 37(3)
- Segura-Campos MR, Chel-Guerrero LA, Betancur-Ancona DA. 2011. Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from a cowpea (*Vigna unguiculata*) enzymatic hydrolysate. *Process Biochemistry*, 46(4):864–72.
- Selway JWT. 1986. Antiviral activity of flavones and flavans. En: Cody V, Middleton E, Harborne JB (eds). *Plant flavonoids in biology and medicine: Biochemical, pharmacological and structure activity relationships*. New York: Alan R Liss, Inc. Pp: 521-536.
- Shahidi F. 2009. Nutraceuticals and functional foods: whole versus processed foods. *Trends in Food Science & Technology* 20. P: 376-387
- Sharma RD. 1980. Effect of hydroxy acids on hypocholesterolemia in rats. *Atherosclerosis* 37, 463-468.
- Sharma RD. 1984. Hypocholesterolemic effect of hydroxy acid components of Bengal gram. *Nutrition Reports International* 29, 1315-1322.
- Sharma S, Yadav N, Singh A y Kumar R. 2013. Nutritional and antinutritional profile of newly developed chickpea (*Cicer arietinum* L) varieties. *International Food Research Journal*, 20(2):805-810
- Sharmila T, Sreeramulu G y Nand K. 1998. Purification and characterization of α -glucosidase from *Clostridium papyrosolvens*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 27, 175 –179.
- Shurtleff W y Aoyagi A. 1979. *The book of tempeh*: Ten Speed Press. Berkeley, CA, USA, 580 p.

- Shurtleff W y Aoyagi A. 2001. The book of tempeh, a super soy from Indonesia. New York: Harper and Row (Colophon Books).
- Sidhu GS y Oakenful DG (1986) A mechanism for the hypocholesterolemic activity of saponins. *Br J Nutr* 55, 643-649.
- Siess MH, Le Bon AM, Canivenec-Lavier MC, Amoit MJ, Sabatier S, Aubert SY, Suschetet M. 1996. Flavonoid of honey and propolis: Characterisation and effects on hepatic drug-metabolizing enzymes and benzo[a]pyrene-DNA binding in rats. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40: 2297–2301.
- Simpson HC, Lousley RS, Greekie M, Hockaday TDR, Carter RD, Mann JI. 1981. A high carbohydrate leguminous fibre diet improves all aspects of diabetes contro. *Lancet* 1: 1–4.
- Singh F, Diwakar B. 1995. Chickpea Botany and Production Practices. Skill Development Series no. 16. ICRISAT: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. P. 57.
- Singh J y Basu PS. 2012. Non-Nutritive Bioactive Compounds in Pulses and Their Impact on Human Health: An Overview. *Food and Nutrition Sciences*, 3: 1664-1672.
- Singh KB. 1997. Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field Crops Research* 53 (1997) 161-170.
- Singh U y Jamburathan R. 1982. Distribution of Seed protein fractions and Amino Acid in Different Anatomical Parts of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and Pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). *Plant Food Hum Nutr* (32):347-54.
- Singh, U. 1984. Dietary fiber and its constituents in desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Nutrition Reports International* 29, 419–426.
- Singleton VL, Orthofer R y Lamuele-Raventós RM.1999. Analysis of total Phenols and other oxidation substrates and antioxidant by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in enzymology*, 299: 152-165
- Sipola M, Finckenberg P, Korpela R, Vapaatalo H, Nurminen ML. 2002. Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *Journal of Dairy Research*, 69: 103–111.

- Soler CA. 2009. Estudio de la capacidad antioxidante y la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva. Primeras etapas en el desarrollo de un aceite de oliva funcional. Tesis de Doctorado. Universidad de Lleida, Lleida, España. Pp 57-59.
- Soni GL, George M, Singh R. 1982. Role of common Indian pulses as hypocholesterolemic agents. *The Indian Journal of Nutrition and Dietetics*, 19: 184–190.
- Sreerama YN, Sashikala VB, Pratape VM. 2012. Phenolic compounds in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their antioxidant and enzyme inhibitory properties associated with hyperglycemia and hypertension. *Food Chemistry* 133. P: 156–162
- Stadtman ER. 1992., Protein oxidation and aging, *Science*; 257: 1220–1224.
- Stadtman ER. 1990. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins —biochemical-mechanism and biological consequences, *Free Radical Biology and Medicine*, 9: 315–325.
- Stadtman ER. 2004. Role of oxidant species in aging, *Current Medicinal Chemistry*, 11: 1105–1112.
- Steinkraus KH, Hand DB, Van Buren JP y Hackler LR.1961. Pilot plant studies on tempe. *Proceedings of Conference on Soybean Products for Protein in Human Foods*, USDA. Pp. 75-84
- Steinkraus KH, Van Buren JP, Hackler LR y Hand DB. 1965. A pilot-plant process for the production of dehydrated tempeh. *Food Technology*, 1:68-73.
- Steinkraus KH. 2002. Fermentation in world food processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 1st ed. Star Publishin Company, Belmont, California, EUA. 230 p.
- Steinkraus KH.1995. Indonesian tempeh and related fermentations. En: Steinkraus KH. *Handbook of indigenous fermented foods*. 2nd Eds. Vol 9. New York: Marcel Dekker. EUA. Pp 1-94
- Stephens JW, Khanolkar MP, Bain SC. 2009. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 202: 321–329.

- Stevens G, Dias RH, Thomas KJA, Rivera JA, Carvalho N, et al. Characterizing the epidemiological transition in Mexico: National and subnational burden of diseases, injuries, and risk factors. *PLoS Med* 2008;5(6): e125.
- Stillings BR y Hackler IR. 2007. Amino acid studies on the effect of fermentation time and heat-processing of tempeh. *Journal of Food Science*, 30:1043-1048, 1965
- Sugano N, Yamada Y, Yoshida K, Hashimoto Y, Matsuo T, Kimoto M. 1988. The hypocholesterolemic action of the undigested fraction of soybean protein in rats. *Atherosclerosis*, 72: 115-122.
- Sumantha A, Deepa P, Sandhya C, Szacaks G, Soccol CR, Pandey A. 2006. Rice Bran as a Substrate for Proteolytic Enzyme Production. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49 (5): 843-851.
- Sutardi A y Buckle KA. 1985. Reduction in phytic acid levels in soybeans during tempeh production, storage and frying. *Journal of Food Science*, 50:260-263
- Suzuki A, Yamamoto N, Jokura H, Yamamoto M, Fujii A, Tokimitsu I y Saito I. 2006. Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 6: 1075–1082.
- Svensson M, Hakansson A, Mossberg AK, Linse S, Svanborg C. 2000. Conversion of alpha-lactalbumin to a protein inducing apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97: 4221–4226.
- Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB. 2008. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7 (3): 1089-1099.
- Tavan, E., Maziere, S., Narbonne, J.F., Cassand, P., 1997. Effects of vitamins A and E on methylazoxymethanol-induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* strain TA 100. *Mutation Research* 377, 231–237.
- Taylor PWJ, Ford R. 2007. *Genome Mapping and Molecular and Molecular Breeding in Plants Vol. 3: Pulses, Sugar and Tuber Crops*. Chittaranjan Kole Editor. P. 109-118.
- Tharanathan RN, Mahadevamma S. 2003. Grain legumes—a boon to human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 14: 507–518.
- Tharanathan RN, Mahadevamma S. 2003. Grain legumes – a boon to human nutrition. *Trends in Food and Science Technology*, 14, 507–518.

- Thomas L, Larroche C, Pandey A. 2013. Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 81: 146– 161
- Thomas PRS, Nash GB, Dormandly JA. 1988. White cells accumulation in dependent legs of patients with venous hypertension: A possible mechanism for trophic changes in the skin. *British Medical Journal*, 296: 1673-1695.
- Thompson LU. 1993. Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. *Food Res Intl* 26, 131-149.
- Tomita M, Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K. 1991. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *Journal of Dairy Science* 74: 4137– 4142.
- Torres-Fuentes C, Alaiz M, Vioque J. 2011. Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 129: 485-490.
- Torruco-Uco JG, Chel-Guerrero LA, Martínez-Ayala A, Dávila-Ortíz G y Betancur-Ancona DA. 2009. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* sedes. *Food Science and Technology*, 42(10):1597-1604.
- Tovar J, Björck IM y Asp NG. 1992. Incomplete digestión of legume starches in rats: a study of precooked flours containing retrograded and physically inaccessible starch fractions, *Journal of Nutriron*, 122:1500-1507.
- Tsujita T, Matsuura Y, Okuda H. 1996. Studies on the inhibition of pancreatic and carboxylester lipases by protamine. *Journal of Lipid Research* 37: 1481–1487
- Tu BP y Weissman JS. 2004. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol* 2004; 164: 341–346.
- Udenigwe CC, Aluko RE. 2012. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science* 77(1):R11–24.
- Usmani NF y Noorani R. 1986. Studies on soybean tempeh. Optimization of factors affecting fermentation in commercial production of tempeh with respect to pilot plant studies. *Journal of Scientific Research*, 29 (2): 145-147.

- Valko M, Rhodes CJ, Moncola J, Izakovic M, Mazura M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cáncer. *Chemico-Biological Interactions* 160: 1–40
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1–40.
- Van der Maesen LJG. 1972. *Cicer L.*, A Monograph of the Genus with Special Reference to Chickpea (*Cicer arietinum L.*), its Ecology and Cultivation. Maded. Landbouw. Wageningen, pp. 72-10.
- Vázquez-Flores AA, Álvarez-Parrilla E, López-Díaz JA, Wall-Medrano A y De la Rosa LA. 2012. Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia Chihuahua*, 6(2)
- Venero-Gutiérrez JR. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar* 31(2):126-133
- Venkata C y Ram S. 2007. The evolving definition of systemic hypertension. *The Americal Journal of Cardiology*. 99 (8): 1168-1170
- Vermeirssen V, Van Camp J, Verstraete W. 2004. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92: 357–66.
- Vermeirssen V, van der Bent A, Van Camp J, van Amerongen A, Verstraete W. 2004. A quantitative in silico analysis calculates angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in pea and whey protein digests, *Biochimie* 86:231–239.
- Vetrani C, Costabile G, Di Marino L, Rivellese AA. 2013. Nutrition and oxidative stress: a systematic review of human studies. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64 (3): 312–326.
- Vioque J, Pedroche J, Yust MM, Lqari H, Megias C, Giron J, Alaiz M y Millan F. 2006. Péptidos bioactivos en proteínas vegetales de reserva. *Brazilian Journal of Food Technology III JIPCA*, 99-102
- Wagenknecht AC, Mattick LR, Lewin LM, Hand DB y Steinkraus KH. 1961. Changes in soybean lipids during tempeh fermentation. *Food Science*, 26:373.

- Wagner H, Elbl G, Lotter H, Guinea M. 1991. Evaluation of natural products as inhibitors of angiotensin I-converting enzyme (ACE). *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, 1, 15–18.
- Wang HL, Swain EW y Hesselstine CW. 1975. Mass production of *Rhizopus oligosporus* spores and their application in tempeh fermentation. *Journal of Food Science*, 40: 168:170.
- Wang HL, Swain EW y Hesselstine CW. 1980. Phytase of molds used in oriental food fermentation. *Journal of Food Science*, 45:1266
- Wang WM, Klopfenstein CF. 1993, Effect of Twin-screw Extrusion on the Nutritional Quality of Wheat, Barley and Oats. *Cereal Chemistry*, 70: 712-715.
- Wang XM, Wu SS, Xu DG, Xie DG, Guo H. 2011. Inhibitor and substrate binding by angiotensin-converting enzyme: Quantum mechanical/molecular mechanical molecular dynamics studies. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51: 1074–1082.
- Watanabe N, Fujimoto K y Aoki H. 2007. Activities of the water-soluble fraction in tempeh-like fermented soybean (GABA-tempeh). *International Journal of Food Science and Nutrition*, 58:577-587
- Weber M. 2007. What is high blood pressure? Capítulo 1. High blood pressure and health policy. Ruder Finn, Inc. Pp. 11-24
- Wei DL, Kirimura K, Usami S y Lin TH. 1996. Purification and characterization of an extracellular b-glucosidase from the wood-grown fungus *Xylaria regalis*. *Current Microbiology*, 33, 297 –301.
- Wei L, Clauser E, Alhencgelas F y Corvol P. 1992. The 2 homologous domains of human angiotensin-I-converting enzyme interact differently with competitive inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 267(19), 13398-13405.
- Wiesel I, Rehm JH y Bisping B. 1997, Improvement of tempe fermentation by application of mixed cultures consisting of *Rhizopus* sp and bacterial strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47:218-225
- Wildman REC. 2007. Nutraceuticals factors in specific foods. En: *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*” 2nd ed. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL, EUA, pp 7.

- Williamson G. 2004. Common features in the pathways of absorption and metabolism of flavonoids. En: *Phytochemicals: Mechanisms of Action*. MS Meskin, WR Bidlack, AJ Davies, DS Lewis Y RK Randolph (ed). Pp. 21–33. New York, NY: CRC Press
- Winarmo FG y Reddy NR. 1986. Tempe. En: Reddy NR, Pierson MD y Salunkhe DK Editores. *Legume-based fermented foods*. CRC Press, Boca Raton, FL, EUA. Pp 95-117.
- Wong JH, Ip DCW Ng TB, Chan YS, Fang F, Pan WL. 2012. A defensinlike peptide from *Phaseolus vulgaris* cv. 'King Pole Bean'. *Food Chemistry*, 135: 408–414.
- Wongputtisin P, Khanongnuch C, Pongpiachan P, Lumyong S. 2007. Antioxidant activity improvement of soybean meal by microbial fermentation. *Research Journal of Microbiology*, 2: 577–583.
- Wood JA y Grusak MA. 2007. Nutritional value of chickpea. En chickpea breeding and management. P: 101-142 SS Yadav, R Redden, W Chen y B Sharma, editors. Wallingford, UK: CAB International
- Woodward J. 1982. Fungal and other b-D-glucosidase—their properties and applications. *Enzyme Microbiology Technology*, 4, 73–79.
- Wu J, Aluko RE, Nakai S. 2006a. Structural requirements of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: quantitative structure-activity relationship modeling of peptides containing 4–10 amino acids residues, *QSAR & Combinational Science*, 25: 873–880.
- Wu J, Aluko RE, Nakai S. 2006b. Structural requiremenets of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides: quantitative structure-activity relationship study of di- and tripeptides. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54: 732–738.
- Wu XL, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE y Prior RL. 2004. Lipophilic and hydrophylic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4026-4037.
- Xu BJ, Chang SKC. 2007. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science* 72(2): S159-S166.

- Xu BJ, Chang SKC. 2008. Total phenolics, phenolic acids, isoflavones, and anthocyanins and antioxidant properties of yellow and black soybeans as affected by thermal processing. *J. Agric. Food Chem*, 56: 7165–7175.
- 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 (2): S167-S177.
- Yamamoto N, Maeno M, Takano T. 1999. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4, *Journal of Dairy Science*, 82: 1388–93.
- Yamamoto N. 1997. Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Biopolymers* 43: 129–134.
- Yao Y, Sang W, Zhou M, Ren G. 2010. Antioxidant and α -glucosidase inhibition of colored grains in China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 770-774.
- Yust MM, Pedroche J, Giron-Calle J, Alaiz M, Millan F y Vioque, J. 2003. Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Journal of Food Chemistry*, 81, 363–369.
- Zhang H, Yokoyama WH, Zhang H. 2012. Concentration-dependent displacement of cholesterol in micelles by hydrophobic rice bran protein hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(7): 1395-1401.
- Zhang T, Li Y, Miao M, Jiang B. 2011. Purification and characterisation of a new antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietium* L.) protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 128: 28-33.
- Zhao Y, Wang J, Balleve O, Luo H, Zhang W. 2011. Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids. *Hypertens. Res.* 4, 370–374.
- Zhao Z, Egashira Y, Sanada H. 2004. Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver. *Journal of Nutrition*, 134: 3083–3088.
- Zia-UI-Haq M, Iqbal S, Ahmad S, Branger MI, Wiczowski W y Amarowicz R. 2008. Antioxidant potential of desi chickpea varieties commonly consumed in Pakistan, *Journal of Lipids* (14): 326-342.

- Zia-UI-Haq M, Iqbal S, Shakkel A, Imran M, Niaz A y Changer MI. 2007. Nutritional and compositional study of Desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars grown in Punjab, Pakistan. *Food Chemistry*, 105:1357-1363.
- Zimmerman RS. 1997. Hormonal and humeral considerations in hypertension disease. *Medicine Clinics of North America*. 81: 1213-1229.
- Zioudrou C, Streaty RA, Klee WA. 1979. Opioid peptides derived from food proteins – exorphins. *Journal of Biological Chemistry*, 254: 2446-2449.
- Zulet MA y Martínez JA (1995) Corrective role of chickpea intake on a dietary-induced model of hypercholesterolemia. *Plant Foods and Human Nutrition*, 48: 269-277.

ABREVIATURAS

ΔE	Diferencia total de color
%	Porcentaje
α	Alfa
AAE	Aminoácidos esenciales
AAPH	2-2'-Azobis-aminopropano
AAox	Actividad antioxidante
Abs	Absorbancia
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AEE	Actividad y estabilidad de emulsion
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analistas
AR	Almidón resistente
AS	Almidón soluble
AUC	Pérdida de fluorescencia
β	Beta
Bs	Base seca
C	Carbono
CAA	Capacidad de absorción de aceite
CAAE	Contenido de aminoácidos esenciales
CFT	Compuestos fenólicos totales
Cl ⁻	Cloro
Cm	Centímetro(s)
Col	Colaboradores
C-PER	Relación de eficiencia proteica calculada
DCF	Diclorofluorescina
DCFH	Diclorofluoresceina
EAG	Equivalentes de ácido gálico
ECA	Enzima convertidora de angiotensina I
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

ET	Equivalentes de trolox
FAO	Organización de Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FES	Fermentación en estado sólido
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
G	Gramo(s)
GRAS	Reconocido generalmente como seguro (generally recognized as safe)
H	Hora(s)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido Clorhídrico
HGB	Harina de garbanzo bioprocesado
HGBO	Harina de garbanzo bioprocesado optimizada
HHL	Hipuril-histidil-leucina
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HTA	Hipertensión arterial
IC ₅₀	Concentración para inhibir el 50% de actividad
IAA	Índice de absorción de agua
IFEE	Índice de formación y estabilidad de espuma
ISA	Índice de solubilidad en agua
Mg	Miligramo(s)
Min	Minuto(s)
μ	Micro
M	Molar
Mm	Milímetro(s)
μg	Microgramo(s)
μM	Micromolar
mM	Milimolar
μL	Microlitros
mL	Mililitro(s)
MSR	Metodología de superficie de respuesta

NaOH	Hidróxido de sodio
NO•	Óxido nítrico
NPR	Relación neta de proteína
°C	Grado(s) centígrado(s)
O•	Oxígeno singulete
O ₂ •	Superóxido
OH•	Radical hidroxilo
ONOO•	Peroxinitrilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
PDCAAS	Digestibilidad proteínica corregida por el perfil de aminoácidos
PER	Relación de eficiencia proteínica
<i>R</i>	<i>Rhizopus</i>
R•	Radical alquilo
RH	Rendimiento de hidrolizado
RO•	Radical alcoxilo
ROO•	Radical peroxilo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Rpm	Revoluciones por minuto
S	Segundo(s)
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
TBARS	Método del ácido tiobarbitúrico
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente de trolox
WHO	Organización Mundial de la Salud
Zn ²⁺	Zinc