

03072 6
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y POSGRADO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

APROVECHAMIENTO DE GARBANZO DE BAJA CALIDAD COMERCIAL MEDIANTE FERMENTACION EN EL ESTADO SOLIDO

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA :

JAQUELINA GONZALEZ CASTAÑEDA

MEXICO, D. F.

1992





UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

	Página
I. RESUMEN	viii
II. INTRODUCCION	1
A. Generalidades	1
B. Alimentos fermentados	9
III. OBJETIVOS	19
IV. MATERIALES Y METODOS	20
A. Materia prima	20
B. Preparación del sustrato	20
C. Inóculo	22
D. Procedimiento de fermentación	22
E. Análisis microbiológico	23
1. Diluciones microbianas	23
2. Determinación de bacterias mesofílicas aerobias	24
3. Determinación de bacterias coliformes	24
4. Aislamiento de <i>Salmonella</i>	25
5. Determinación de hongos y levaduras	25
F. Actividad de agua (Aw)	26
G. Composición proximal	26
1. Humedad	26
2. Proteína cruda	27
3. Grasa cruda	27
4. Fibra cruda	28
5. Cenizas	28

	Página
H. Análisis de homogenizados	28
I. pH y acidez titulable	30
J. Proteína verdadera	31
K. Solubilidad de proteína en diferentes soluciones de extracción	31
L. Carbohidratos solubles en etanol	32
M. Actividad de proteasas en pH ácido y alcalino	32
N. Actividad de peroxidases	35
O. Acidos grasos totales	36
P. Valor de peróxidos	36
Q. Taninos	37
R. Digestibilidad <i>in vitro</i>	37
S. Color	38
T. Estudios de microscopía electrónica de barrido	39
U. Análisis estadístico	39
V. RESULTADOS Y DISCUSION	40
A. Desarrollo de un procedimiento mediante fermentación sólida empleando garbanzo de baja calidad comercial como sustrato	40
1. Trituración, remojo, descascarillado y cocción	40
2. Densidad del inóculo	43
3. Recipientes para la fermentación	44
4. Condiciones para la fermentación	45
B. Desarrollo microbiológico a lo largo de la fermentación	46

	Página
1. Diluciones microbianas	46
2. Determinación de bacterias mesofílicas aerobias	48
3. Determinación de bacterias coliformes	51
4. Aislamiento de <i>Salmonella</i>	52
5. Determinación de hongos y levaduras	53
C. Actividad de agua (Aw)	54
D. Efecto de la fermentación sobre la composición y el valor nutritivo del garbanzo	56
1. Composición proximal	56
2. pH y acidez titulable	60
3. Proteína verdadera	62
4. Componentes solubles	64
5. Actividad de proteasas	69
6. Actividad de peroxidasas	71
7. Ácidos grasos totales	73
8. Valor de peróxido	73
9. Taninos	76
10. Digestibilidad <i>in vitro</i>	79
E. Efecto de la fermentación sobre el color del garbanzo	81
F. Estudios microscópicos del crecimiento del hongo sobre el sustrato	84
VI. CONCLUSIONES GENERALES	89

	Página
A. procedimiento mediante fermentación sólida que permite el aprovechamiento de garbanzo de baja calidad comercial	89
B. Efecto de la fermentación en el crecimiento microbiano	90
C. Efecto de la fermentación sobre la composición y el valor nutritivo del garbanzo	90
D. Efecto de la fermentación sobre el color del garbanzo	91
E. Estudios microscópicos del crecimiento del hongo sobre el sustrato	91
VII. APORTACIONES ORIGINALES DE ESTE TRABAJO AL CONOCIMIENTO CIENTIFICO	93
VIII. BIBLIOGRAFIA	94

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribución del garbanzo a nivel mundial	3
2	Principales estados productores de garbanzo en México	6
3	Proceso de obtención de dosa	13
4	Diagrama de flujo del proceso de fermentación	21
5	Método propuesto para la obtención de garbanzo fermentado	41
6	Crecimiento microbiano de bacterias mesófilas aerobias y hongos	50
7	Microfotografía electrónica de barrido (MEB) del crecimiento del hongo sobre el sustrato	85
8	Microfotografía electrónica de barrido (MEB) de cortes transversales de muestras de garbanzo fermentado	86
9	Microfotografía electrónica de barrido (MEB) de características estructurales de <i>Rhizopus oligosporus</i>	88

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1 Producción nacional anual de garbanzo en México	4
2 Variedades de garbanzo (<i>Cicer arietinum</i> L.) sembradas en México	7
3 Composición proximal de garbanzo	8
4 Calidad nutricional del garbanzo	10
5 Resumen de las diversas condiciones empleadas en la fermentación	47
6 Cambios microbiológicos durante la fermentación de garbanzo	49
7 Cambios en la actividad de agua durante el crecimiento microbiano en garbanzo fermentado	55
8 Cambios en la composición proximal de garbanzo fermentado	57
9 Cambios de pH y acidez titulable en garbanzo fermentado	61
10 Cambios en la proteína durante la fermentación	63
11 Cambios en la solubilidad de sólidos, proteína y carbohidratos durante la fermentación de garbanzo	65
12 Extracción de proteínas con diferentes soluciones y pH de garbanzo antes y después de la fermentación	67
13 Actividad de proteasas durante la fermentación de garbanzo	70
14 Comportamiento de peroxidasas durante la fermentación	72

Tabla		Página
15	Cambios en los ácidos grasos de garbanzo fermentado	74
16	Comportamiento del valor de peróxidos en garbanzo fermentado	75
17	Contenido de taninos en muestras de garbanzo fermentado	77
18	Digestibilidad <i>in vitro</i> de garbanzo fermentado	80
19	Cambios en el color Hunter durante la fermentación de garbanzo	82

I. RESUMEN

Con el fin de aplicar la fermentación en el estado sólido se desarrolló un procedimiento usando como sustrato garbanzo de baja calidad comercial, inoculando con *Rhizopus oligosporus* y fermentando en bolsas de plástico con perforaciones; esto produjo importantes cambios cualitativos y cuantitativos en el material original. Se observó un incremento en el crecimiento del hongo a partir de las 12 hs de incubación. La actividad de agua (Aw) fue prácticamente constante a lo largo de la fermentación. El crecimiento de bacterias mesófilas aerobias durante la fermentación tuvo ligeras fluctuaciones, no se detectó crecimiento de coliformes, ni de *Salmonella* o levaduras. En el producto final aumentaron: el contenido de proteína total, la proteína verdadera, la proteína soluble en agua y en otras soluciones extractantes, los sólidos solubles en agua, los carbohidratos solubles en etanol y la acidez titulable; y disminuyeron el contenido de fibra, cenizas y pH. La actividad de proteasas en pH ácido y alcalino aumentó sensiblemente durante la fermentación. El contenido de ácidos grasos también aumentó y se observó una disminución en el índice de peróxidos, actividad de peroxidasa y taninos. Esta disminución en el índice de peróxidos puede ser un indicador de la presencia de antioxidantes en el producto. El color del producto fermentado no se deterioró por efecto de la fermentación. Los estudios de microscopía electrónica de barrido durante la fermentación mostraron como el hongo penetró en el sustrato y cómo éste se modificó. A partir de estas investigaciones preliminares es posible sugerir el empleo de

garbanzo porquero de baja calidad comercial el cual es susceptible de ser transformado mediante fermentación en el estado sólido en un producto con características básicas adecuadas para ser empleado principalmente en la alimentación humana.

II. INTRODUCCION

A. Generalidades

Existen problemas para la producción de alimentos a nivel mundial; la baja disponibilidad de proteínas es un problema que se vive día con día. Actualmente los alimentos de origen vegetal se presentan como una opción debido a su disponibilidad, contenido de proteínas, carbohidratos, minerales y vitaminas; adicionalmente tienen poca grasa, sodio y no contienen colesterol. Las cantidades elevadas de fibra soluble en agua son particularmente efectivas para disminuir los niveles de colesterol en sangre (Uebersax y col., 1991). Una de las maneras que se sugiere para realizarlo es mediante la reducción en el consumo de grasas saturadas y el aumento de ejercicio (Morrow, 1991). Algunas ventajas de las proteínas vegetales son las siguientes: comparativamente los costos de la proteína vegetal son más bajos que los costos de las proteínas provenientes del ganado vacuno, bovino o del pescado; son relativamente fáciles de manejar, se pueden deshidratar y almacenar con facilidad; con ellas se elaboran desde platillos sencillos hasta comidas elaboradas.

Las leguminosas han sido consideradas como una importante fuente de proteínas a nivel mundial y como una alternativa para los países con problemas de nutrición; aproximadamente el 50 % de la proteína que se consume en los países en desarrollo proviene de las leguminosas (Mossé y Pernollet, 1983; Deshpande y Cheryan, 1984). Además contienen carbohidratos, fibra, ciertos minerales y vitaminas del complejo B.

Las leguminosas forman vaina, fijan grandes cantidades de nitrógeno atmosférico, pueden sintetizar aminoácidos y acumular cantidades muy elevadas de proteínas sin

necesidad de fertilizantes (Thompson y col., 1986). China e India son los mayores productores de leguminosas, su producción constituye el 50 % de la producción global (Uebersax y col., 1991).

A nivel mundial la producción de granos de leguminosas se encuentra en el orden siguiente: en primer lugar la soya, le sigue el cacahuete, el frijol, el chícharo y en quinto lugar el garbanzo. Esta última leguminosa es importante en países o regiones como China, India, El Mediterráneo, Etiopía, México, Argentina, Chile, Perú y algunos otros países europeos como se muestra en la Figura 1 (Chavan y col., 1986 ; Chen y Ho, 1989).

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) se encuentra clasificado en la familia Fabaceae. El género *Cicer* comprende 39 especies conocidas y distribuidas principalmente en Asia.

Es una planta anual, semiverdical con un tronco medio y solamente con pocas ramas o semiprologada con muchas ramas. Las semillas son de color crema, amarillas, café, negras o verdes, ligeramente aplastadas y lobuladas por un lado, deprimido en el ápice y superficie de tegumento ligeramente rugoso. Tiene un tamaño de 0.4 - 1.4 cm de diámetro por 0.4 - 1.0 cm de ancho (Andrade, 1981).

La producción nacional en 1989 se muestra en la Tabla 1. En México se siembran dos tipos de garbanzo: uno de semilla pequeña, de color anaranjado oscuro y otro de semilla más grande, de color amarillo claro.

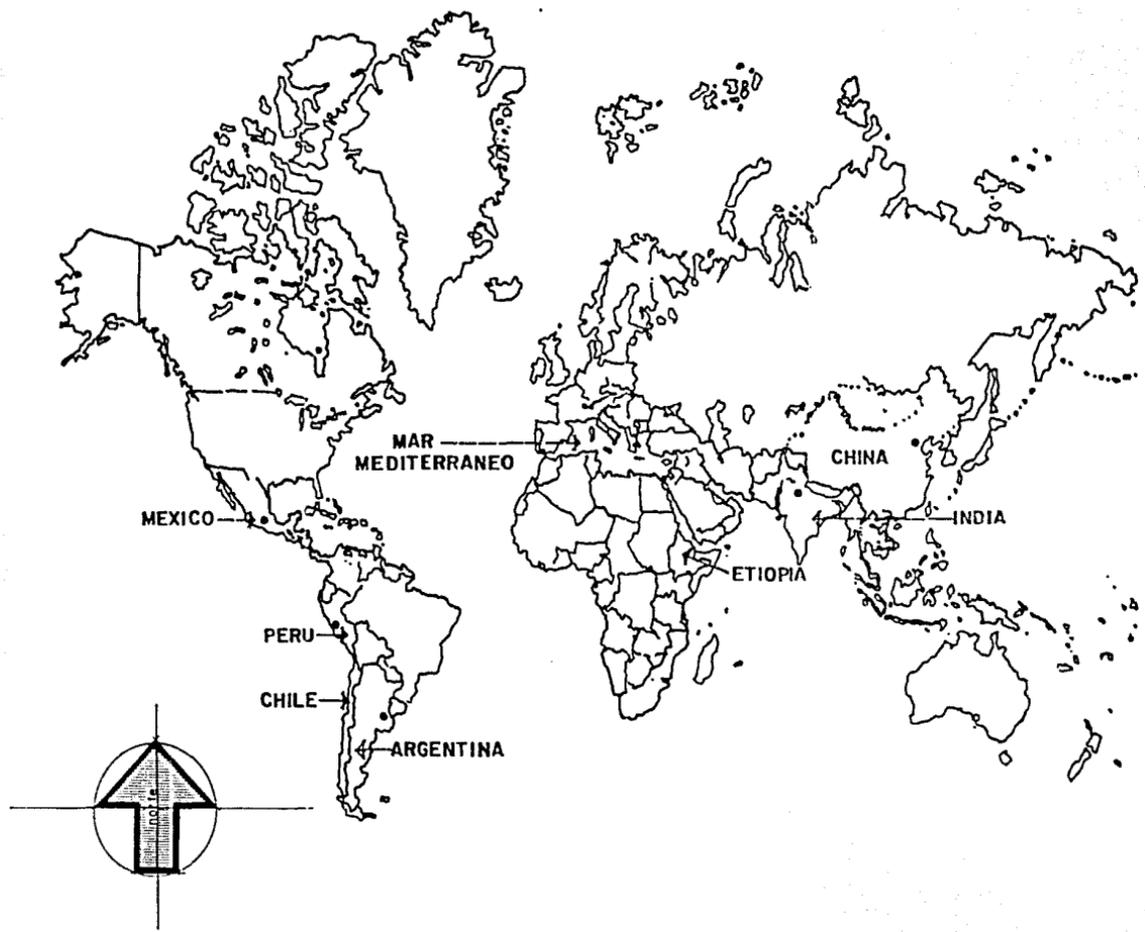


Figura 1. Distribución del garbanzo a nivel mundial.
Fuente : Chavan y col., (1986) y Chen y Ho (1989).

**Tabla 1. Producción nacional anual
de garbanzo en México**

Distribución	Ton X 10 ³
Consumo Humano	75
Consumo Animal	104
Exportación	45

Andrade, E. (1989).

La Figura 2 muestra los principales estados productores de garbanzo en México; en este país el grano pequeño se destina al consumo animal mientras que la semilla grande al consumo humano. La Tabla 2 muestra las principales variedades sembradas en el país; tanto las dirigidas al consumo humano como animal. Es pertinente hacer notar que durante la cosecha mecánica del garbanzo se generan volúmenes importantes de grano quebrado; material que tiene un valor comercial y estabilidad inferiores al grano integral.

Los cotiledones contienen cerca del 96 % de las proteínas, 94 % de la grasa, 81 % de las cenizas, 88 % de los carbohidratos, 94 % del fósforo y 70 % del hierro; la Tabla 3 muestra la composición proximal reportada para garbanzo.

La cáscara de la semilla contiene muchos de los carbohidratos no digeribles y una proporción relativamente alta de calcio. Los cotiledones son la mayor fuente de nutrientes para los consumidores. El contenido de proteína cruda del garbanzo en promedio es de 21.5 %; el cual está constituido principalmente por globulinas y en menor proporción por glutelinas y albúminas. Es una rica fuente de lisina, leucina, isoleucina y triptofano (Chavan y col., 1986; Fernández y Berry, 1988).

Aparte de la composición de aminoácidos y de la composición química general, una evaluación biológica es esencial dado que el análisis químico no siempre revela cuanta proteína es disponible y aprovechable.

Para este propósito se recomienda utilizar los siguientes métodos: relación de eficiencia proteica (PER), relación neta de proteína (NPR) y valor relativo de proteína (RPV), así como métodos de balance de nitrógeno como: valor biológico (BV).

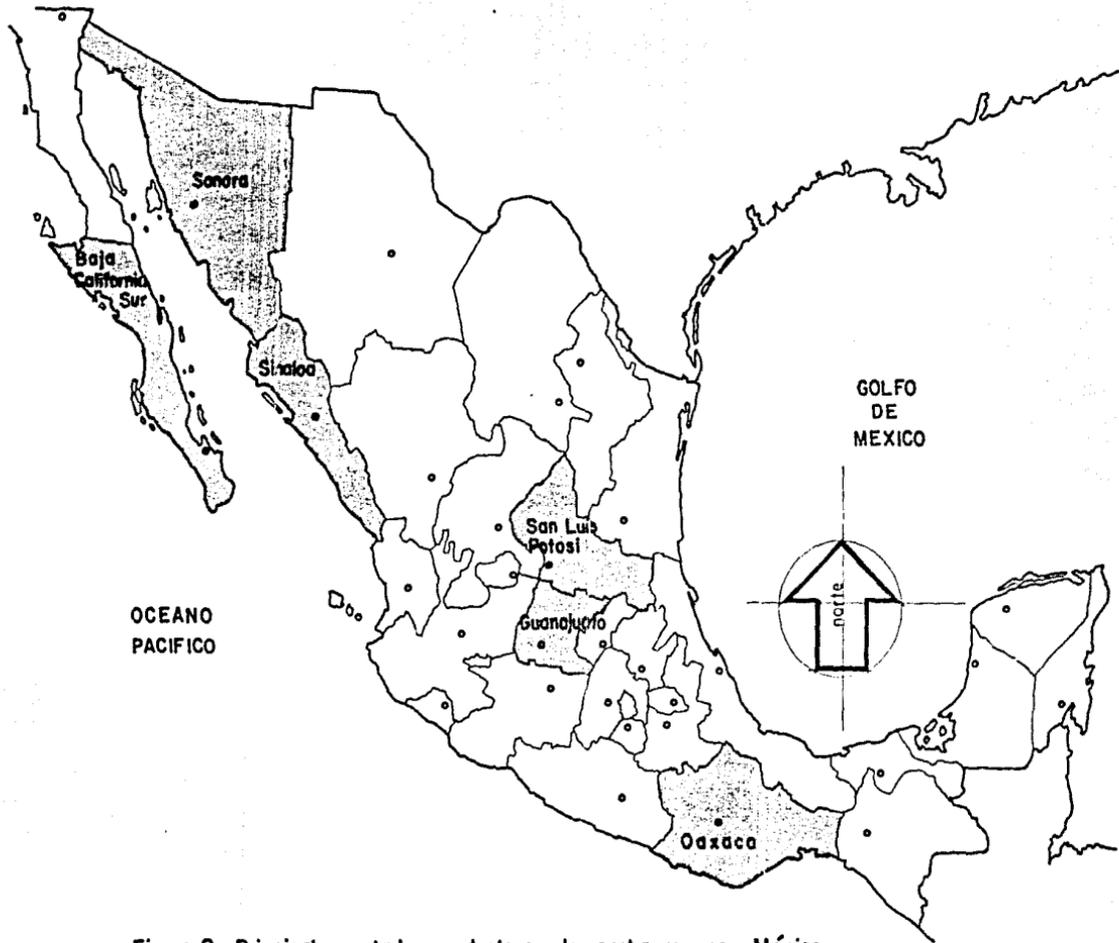


Figura 2. Principales estados productores de garbanzo en México.
Fuente : Andrade (1981, 1989).

Tabla 2. Variedades de garbanzo (Cicer arietinum L.) sembradas en México

Dirigido al consumo humano	Dirigido al consumo animal
Unión	Col grande
Culiacancito 860	Grande 12
Macarena	Carreta 145
Surutato 77	

Andrade, E. (1981, 1989).

Tabla 3. Composición proximal de garbanzo

Nutriente ^{a/}	Cáscara	Cotiledón	Embrión
Proporción	14.5	84.0	1.5
Proteína (NX 6.25)	3.0	25.0	37.0
Grasa %	0.2	5.0	13.0
Cenizas %	2.8	2.6	5.0
Fibra cruda %	48.0	1.2	-
Carbohidratos %	46.0	66.0	42.0
Hierro mg %	8.0	5.5	11.0
Calcio mg %	1000	70	110
Fósforo mg %	24	290	740

^{a/} base seca.

Chavan y col., 1986.

utilización neta de proteína (NPU) y digestibilidad verdadera (TD). Los valores reportados para el garbanzo con respecto a los métodos anteriores se encuentran en la Tabla 4.

B. Alimentos fermentados

La fermentación en estado sólido (FES) es un proceso mediante el cual ocurren cambios microbiológicos en las partículas del sustrato con la cantidad mínima de líquido libre para que ocurran las reacciones metabólicas de las células y exista la actividad de agua necesaria para que se desarrollen los microorganismos (Tendergy, 1985; Paredes-López y col., 1990).

Los volúmenes de trabajo (sólido-líquido) que se manejan en la FES en comparación con el cultivo sumergido son menores, los riesgos de contaminación son bajos y los efluentes son pocos (Cochet y col., 1988). Cuando se utilizan leguminosas como sustrato en FES se han observado cambios en la textura y características organolépticas como: sabor, aroma, color y apariencia. Se ha observado que mediante este proceso se eliminan algunos olores indeseables, se incrementa la digestibilidad, se manifiestan mejoras nutricionales y reducción en el tiempo de cocción, lo que hace atractivo su consumo.

La FES se aplica a varios sustratos para producción industrial de hongos, quesos, yogurt, ácido láctico, ácido cítrico, penicilina o alimentos fermentados a partir de leguminosas y cereales como: vinos y cervezas, vinagre, koji, idli, injera, miso, ogi, salsa de soya, soyu y tempe (Beuchat, 1978; Eubine, 1989; Fukushima, 1989;

Tabla 4. Calidad nutricional del garbanzo

Parámetro	Intervalo	Caseína
Coefficiente de digestibilidad	76-93	-
Digestibilidad aparente	86-88	98
Digestibilidad <u>in vitro</u>	48-53	90
Relación de eficiencia proteica	1.2-2.6	4.4 ^{a/}
Utilización neta de proteína	87-92	91 ^{a/}
Valor biológico	52-85	93 ^{a/}

^{a/} 10% de caseína.

Fuente: Chavan y col., 1986; Fernández y Berry, 1988; Ordorica, 1988; Jood y col., 1989; González, 1990.

Onyekwere y col., 1989). También la FES se emplea para eliminar metabolitos tóxicos en casava haciéndola disponible para su consumo, usando chicharo para el crecimiento y almacenamiento de bacterias lácticas adaptadas para la producción de salchichas en el Caribe y como fuente de aislamiento e identificación de microorganismos de interés industrial a partir de los sustratos como es el caso de *Lactobacillus hilgardii* productor de un polisacárido formador de un gel; presentando una alternativa como en el caso de alginatos o carragenina para la inmovilización de microorganismos (Fidoux, 1989; Thambirajah, 1989; Lucas y Donawa, 1991).

Las culturas asiáticas elaboran sus alimentos a base de soya y en menor proporción empleando otras leguminosas, cereales, oleaginosas y tubérculos; algunos ejemplos son: arroz, trigo, nuez y casava. Estos son fermentados por levaduras y hongos de los géneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Actinomyces*, *Amylomyces*, *Neurospora* y *Monascus*. Algunas bacterias involucradas también en la fermentación pertenecen a los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus* y *Pediococcus*.

Estos alimentos pueden ser consumidos inmediatamente después de la fermentación como en el caso del tempe, tofu, y oncom, utilizados como condimentos como es el caso del soyu y miso o pueden ser almacenados por largo tiempo y posteriormente adicionarse a otros alimentos para mejorar su sabor. Algunos condimentos obtenidos mediante la fermentación de pescado por hongos son el katsoubushi y el bagoong (Djien y Hesselstine, 1979; Chavan y Kadam, 1989; Odibo y Umeh, 1989; Soni y Sandhu, 1989; Thambirajah, 1989; Leistner, 1990; Mital y Garg, 1990; Ashenafi y Busse, 1991).

El nato es un alimento fermentado de origen japonés y es preparado a partir de soya e inoculado con *Bacillus subtilis*, en 1972 la producción japonesa fue de

aproximadamente 6×10^6 Kg. Para su elaboración los granos son remojados en agua, cocidos e inoculados con el cultivo de bacterias. El material es colocado en bolsas de plástico o papel e incubado a 40 - 43°C durante 14 - 18 hs. El producto es acompañado de arroz cocido y shoyu (Ko y Hesselline, 1979).

En Indonesia se denomina tempe a un conjunto de alimentos fermentados utilizando varias especies de *Rhizopus* para su fermentación. Estos alimentos pueden elaborarse a partir de soya, cacahuete, ciertos tipos de frijol o algunos otros sustratos como lupina, garbanzo, haba o mezclas de leguminosas y cereales (Wang y col., 1968; Ko y col., 1979; Steinkraus, 1983; Supramo y Markakis, 1987). El producto final tiene una textura compacta debido a que los granos han sido cubiertos y penetrados por el micelio blanco del hongo (Beuchat, 1976; Ko y Hesselline, 1979; Rasyid, 1986).

En India alimentos fermentados como idli y dosa se preparan a partir de arroz y frijol (*Phaseolus mungo*), y el dhokla y khaman con garbanzo (Ramakrishnan, 1977, Chavan y col., 1986; Uebersax y col., 1991). Este tipo de alimentos se preparan con los granos lavados, remojados y triturados, pudiendo combinarse con cereales y/o leguminosas, agregándoles sal después del remojo y otros ingredientes como chile, azúcar, bicarbonato de sodio y mantequilla.

Como ejemplo en la Figura 3 se muestra el proceso de obtención de dosa, los microorganismos involucrados en la fermentación son de tipo heterofermentativo como: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus fermenti*, *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Bacillus* sp., *Pediococcus acidilactici* y levaduras; el período de incubación es de una noche o menos. El alimento puede ser consumido directamente o como ingrediente en la preparación de galletas, frito con semillas.

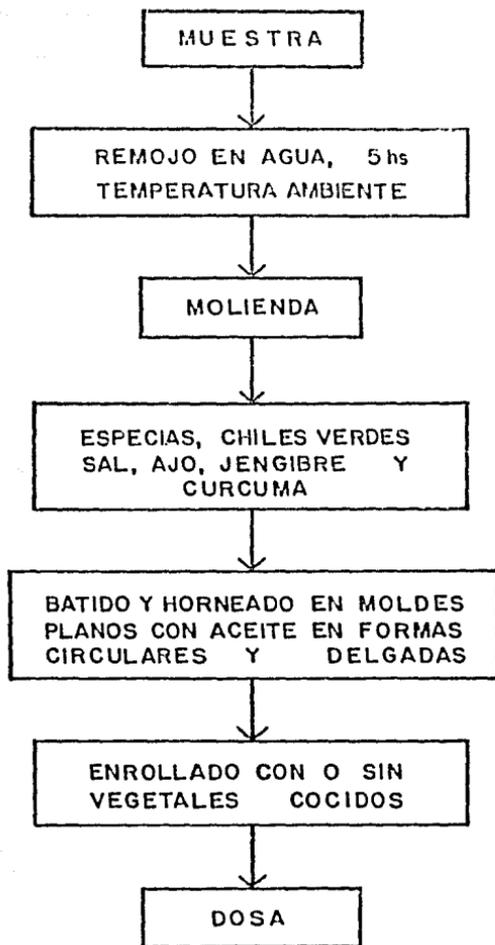


Figura 3. Proceso de obtención de dosa
Chavan y Col., (1986).

sopas u otros vegetales. Este producto tiene una gran aceptación en el sur de la India; debido a su acidez la presencia de organismos patógenos es limitada.

En China algunos productos fermentados tradicionales son el jiu (o shaojiu) - blanco, una bebida alcohólica destilada, jiu - amarillo, una bebida alcohólica amarilla preparada a partir de arroz, la salsa de soya, el vinagre, el qu - rojo que es un fermentado rojo preparado a partir de arroz empleando qu como iniciador de la fermentación y denominado koji en Japón y el douturu empleando frijol para la fermentación (Chen y Ho, 1989). El jiu en China significa bebida alcohólica incluyendo espíritus destilados y no destilados, vino y cerveza.

El jiu - dulce se produce por la extracción de sustancias solubles de granos germinados seguida de una fermentación natural de los extractos obtenidos. El qu es elaborado a partir de cereales germinados, sin qu no se puede preparar jiu; en el norte de China se prepara frío y en el sur caliente. El qu-grande es hecho a partir de cebada o trigo y frijol y el qu-pequeño a partir de arroz o arroz pulido adicionado de hierbas de olor. *Aspergillus* es el microorganismo que se encuentra en mayor proporción en el qu - grande mientras que *Mucor* y *Rhizopus* en el qu-pequeño. Se requiere de mayor cantidad de sustrato para preparar el qu - grande que el qu - pequeño. Se ha reportado que algunas hierbas medicinales como la cáscara de naranja seca y el licor de raíz inducen el crecimiento de levaduras favoreciendo la producción de alcohol. Algunas otras sustancias como la raíz de China inhiben el crecimiento de levaduras y disminuyen la producción alcohólica; en el caso de *Rhizopus* las hierbas medicinales favorecen su crecimiento e inactivan e inhiben el crecimiento de otros microorganismos que puedan existir.

En Nigeria el ugba es ampliamente consumido por gentes de todas las clases sociales y es producido por la fermentación de una oleaginosa (*Fenacolellus macrophyllaj*). Diversos grupos de bacterias de los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Leuconostoc* participan en la fermentación, siendo *Bacillus* el microorganismo predominante y el que más cambios produce en el sustrato. Actualmente es producido a escala casera mediante los métodos tradicionales. El método varía de un productor a otro, resultando una producción de características heterogéneas pero muy similares.

Para su preparación las semillas son hervidas hasta que se puedan quitar las cáscaras, se enfrían y lavan los cotiledones para posteriormente cortarlos, se vuelven a hervir los cotiledones, se enfrían y remojan en agua por un periodo de 10 - 12 hs. se dejan drenando en una canasta con hojas de plátano (*Musa sapientum* L.), se hacen porciones de 40-50 g las cuales se colocan en hojas de "ororompo" (*Mallotus oppositifolius* Mull) y se incuban a temperatura ambiente (28°C) durante 72 hs (Njoku y Okemadu, 1989).

En Etiopía recientemente se han hecho estudios para preparar tempe a partir de algunas leguminosas consumidas en la región como frijol, chicharo y garbanzo siguiendo la metodología empleada por Steinkraus y col. (1965) con algunas modificaciones. Los productos obtenidos mostraron cambios nutricionales y sensoriales lo cual implica que puede ser susceptible de ser consumido en estas regiones (Asherafi y Busse, 1991).

En Los Andes ecuatorianos se elabora un producto fermentado a base de arroz el cual se denomina sierra o arroz seco. Durante la fermentación los granos adquieren un

color que va del amarillo al café, permaneciendo aún después de la molienda. El producto tiene un sabor característico después de la cocción. Para su elaboración el arroz tiene que estar precocido o predigerido ya que la temperatura de fermentación alcanza valores de 70°C. El producto fermentado muestra una alta solubilidad en su contenido de nitrógeno y el producto requiere menos tiempo de cocción que la materia prima: esto es importante ya que en Los Andes el agua hierve por debajo de los 100°C.

La fermentación de cereales no afecta la textura, decrece la digestibilidad aparente y se incrementan los contenidos de riboflavina (Chavan y Kadam, 1989).

En algunas regiones de México se consumen alimentos fermentados a partir de maíz, por ejemplo: agua agria, atole agrio, pozol y tesquino. El colonche se obtiene por fermentación de jugo de tunas de varias especies de nopales, es una bebida dulce y de bajo contenido de alcohol. El pozol es una masa fermentada, presenta una flora microbiana muy compleja; se han descrito varias especies de mohos y levaduras por ejemplo: *Geotrichum candidum*, *Trichosporum cutaneum*, *Candida*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum*, *Monilia sitophila*, *Mucor rouxianus*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus stolonifer*, *Trichoderma viridae*, *Penicillium*, *Sacharomyces cerevisiae*. Entre las bacterias aisladas se encuentran *Bacillus cereus*, *Agrobacterium azotophilum*, *Pseudomonas mexicana* varias especies de *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* (Herrera y Ulloa., 1970; Ulloa, 1974; Ulloa-Sosa y Herrera, 1980).

Los productos fermentados juegan un papel muy importante en platillos típicos populares en todo el mundo. Por ejemplo ingredientes como la salsa de soya, el vino

de cocina, el vinagre, el zao elaborado a partir de cereales, entre otros, contribuyen grandemente a darle el sabor especial a la comida China. El doufuru, con un sabor similar al queso en los países occidentales, es empleado como condimento en los caldos, el qu - rojo es utilizado ampliamente como un colorante natural para los alimentos. Sin embargo cabe hacer notar que los productos fermentados han sido elaborados por métodos tradicionales en los que varios microorganismos han sido seleccionados y utilizados naturalmente (Chen y Ho, 1989).

Se puede concluir que la fermentación microbiana de leguminosas y mezclas de leguminosas con cereales mejora relativamente el valor nutritivo, la disponibilidad de proteínas, aminoácidos, carbohidratos, vitaminas del grupo B y minerales. También mejora el valor biológico, la digestibilidad verdadera y la utilización neta de proteína. La fermentación disminuye o elimina algunos factores antinutricionales como fitatos, inhibidores de proteasas, factores de flatulencia y lectinas. Sin embargo se requieren estudios para mejorar las condiciones de fermentación con respecto a la molienda, relación de agua:sólido, tiempo y temperatura, para que de manera natural se obtenga un beneficio máximo en los cambios nutricionales y un mínimo de pérdida a partir de la materia prima.

La microflora involucrada de manera natural por lo general es muy compleja. Esta incluye bacterias, levaduras y hongos. En la práctica se emplean mezclas de cultivos durante la fermentación observándose que en condiciones ácidas algunas actividades proteolíticas se favorecen. Las bacterias ácido lácticas tienen un bajo costo, son eficientes energéticamente, conservan y mejoran nutricionalmente los alimentos. Debido al pH ácido el crecimiento de microorganismos patógenos se ve limitado. Es posible aplicar la biotecnología para purificar los cultivos, optimar el tiempo de

fermentación; pudiéndose producir algunos colorantes, saborizantes o aromatizantes que estén disponibles a nivel comercial y con características homogéneas.

Actualmente alimentos fermentados como el tempe se están adicionando a otros alimentos procesados para mejorar las características sensoriales o alargar el período de conservación. Vallejo-Córdoba y col. (1986) emplearon hidrolizados proteicos de soya para disminuir la actividad de agua en productos cárnicos pudiendo reemplazar parcialmente el cloruro de sodio en alimentos de humedad intermedia sin alterar sus características sensoriales. Kuo y col. (1989) reportaron que al adicionar tempe a jamones se incrementó el valor nutricional, se retardó la oxidación y aumentó el período de anaquel en el producto. También los alimentos fermentados podrían ser utilizados en la elaboración de alimentos para consumo animal.

III. OBJETIVOS

A. Objetivos generales

1. Desarrollar un procedimiento mediante fermentación sólida empleando garbanzo de baja calidad comercial como sustrato. Este producto estaría dirigido primordialmente a la alimentación humana.
2. Estudiar el efecto de la fermentación generada por el hongo *Rhizopus oligosporus* sobre las características microbiológicas, fisicoquímicas, antioxidantes, nutricionales y microscópicas que ocurren en el sustrato empleado.

B. Objetivos específicos

1. Establecer las condiciones bajo las cuales se pueda obtener un producto con características homogéneas y reproducibles mediante fermentación sólida utilizando como sustrato garbanzo de baja calidad comercial.
2. Determinar los cambios microbiológicos y sanitarios a lo largo de la fermentación.
3. Evaluar los cambios en algunos compuestos químicos del garbanzo de baja calidad comercial debidos al proceso de fermentación así como la producción de antioxidantes.

IV. MATERIALES Y METODOS

La Figura 4 muestra el proceso general de fermentación.

A. Materia prima

Se utilizó garbanzo porquero (consumo animal) variedad Carreta-145 obtenido del Campo Experimental Bajío (INIFAP Celaya, Gto.). Esta es una variedad cuyo período vegetativo es corto y de alto rendimiento. Una vez que se eliminó el material contaminante del grano (como hojas, tallo, piedras) se almacenó a 4°C en recipientes cerrados herméticamente hasta su uso. Para las determinaciones analíticas las muestras de garbanzo sin fermentar se molieron en un molino ciclón (UD Cyclone Sample Mill, UD Corp, Boulder, CO) y se pasaron a través de una malla de 0.5 mm.

B. Preparación del sustrato

Los granos fueron triturados en un molino casero Moulinex (Vistar, S.A., Toluca, Edo. de México.) durante 30 seg. Las partículas obtenidas por el triturado de tamaño mayor, menor o igual a 3 mm se introdujeron en agua acidificada en una relación de 1:3 (peso muestra seca:volumen de agua acidificada) a un pH de 3.1 durante 16 hs y temperatura de 25°C; el pH se ajustó con ácido acético glacial. Una vez transcurridas las 16 hs la muestra se drenó, se eliminaron las cáscaras mediante fricción manual y posteriormente por flotación en agua.

Los granos descascarillados se introdujeron en agua desionizada en una relación de 1:3 (peso muestra húmeda : volumen agua). Se cocieron a $90 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 15, 20,

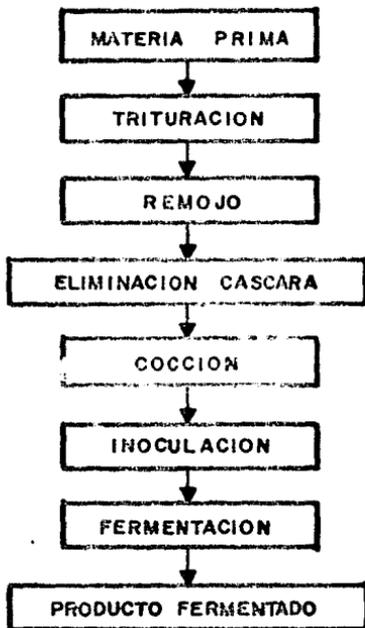


FIGURA 4 DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO DE FERMENTACION.

30, 45 y 60 min. posteriormente se eliminó el agua mediante el drenado de los granos y se colocaron en recipientes rectangulares de plástico para que se entriaran. La muestra en estas condiciones se denominó sustrato; en este momento se procedió a la inoculación.

C. Inóculo

La cepa de *Rhizopus oligosporus* H-311 fue proporcionada por el Departamento de Biotecnología del CIEA-IPN, México procedente de la colección de la misma institución y propagada en agar inclinado de papa glucosa (Merck, México) en tubos de ensayo a 31°C durante 5-7 días hasta obtener la esporulación del hongo. Los cultivos se almacenaron en refrigeración de 1-4°C y se sembraron cada mes para su conservación.

D. Procedimiento de fermentación

El cultivo de un tubo con agar inclinado se suspendió en agua desionizada estéril (aproximadamente 10 ml) para obtener las esporas del hongo ajustándolas a una concentración de 1×10^6 esporas/ml de suspensión; este método ha sido descrito para la fermentación de frijol común por Paredes-López y col. (1987).

Para la fermentación se adicionaron 2.5, 3.5, 5.0, 7.5 y 10 ml de suspensión de esporas por cada 200 g de sustrato, se mezcló con una espátula de acero inoxidable haciendo surcos verticales, tratando de que la distribución de las esporas fuera

homogénea. Una vez hecha la mezcla sustrato-inóculo se colocó en bolsas de plástico de 15 x 25 cm y 45 x 55 cm perforadas con una aguja de coser, la distancia entre cada perforación fue de 1 cm (Martinelli y Hesseltine, 1964).

La muestra se colocó en porciones de 30, 45, 60, 100, 120 y 1,600 g introduciéndose las bolsas en una incubadora FELISA (Fabricantes de Equipos para Laboratorio e Industria, S.A., México) a 25, 28, 35 y 40°C por 0-72 hs. Las muestras fueron retiradas a las 0, 24, 48 y 72 hs.

Una parte de la muestra fue liofilizada, molida y se pasó a través de una malla de 0.5 mm, se guardó en recipientes cerrados herméticamente y se almacenó a 4°C hasta su uso. Otra parte de la muestra se mezcló con agua desionizada para hacer homogenizados para algunas determinaciones como se indica más adelante. Una tercera parte se destinó al análisis microbiológico. Las muestras se tomaron de tres corridas de fermentación y los análisis se hicieron por triplicado incluyendo los controles (crudo, remojado y remojado-descascarillado-cocido). Los resultados reportados son los promedios obtenidos.

E. Análisis microbiológico

1. Diluciones microbianas

Se realizaron siguiendo el método 46.005 del AOAC (1984) y siguieron las indicaciones recomendadas por la SECOFI (1977d) para la preparación y dilución de muestras de alimentos para análisis microbiológicos. Se preparó una solución concentrada de

regulador de fosfatos, se disolvieron 34 g de KH_2PO_4 en 500 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 7.2 con NaOH 1 N (aproximadamente 175 ml) y se atoró a 1 litro con agua destilada.

Para la solución de trabajo se tomaron 1.25 ml de la solución concentrada y se diluyó a 1 litro con agua destilada hervida y fría. Se esterilizó durante 15 min a 121°C . Posteriormente con esta solución se hicieron las diluciones de las muestras.

2. Determinación de bacterias mesofílicas aerobias

Esta determinación se realizó siguiendo la metodología empleada por Shieh y Beuchat (1982) y el método 46.005 del AOAC (1984) con algunas modificaciones; el medio de cultivo fue agar para métodos estándar a pH de 7.0 ± 0.1 (Bioxon, Cuatillán Izcalli, Edo. de México). Se siguió la técnica de vaciado en placa; una vez inoculadas las cajas con la dilución, se incubaron a $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$ en una incubadora FELISA y el crecimiento de colonias se leyó a las 24-48 hs de incubación en un contador de colonias marca Quebec. Los resultados se reportaron como unidades formadoras de colonia/g de muestra (ufc/g de muestra).

3. Determinación de bacterias coliformes

Se siguió la metodología reportada en el AOAC (1984) método 46.009 y por Fernández-Escartín(1981). Los medios de cultivo utilizados fueron agar bilis rojo violeta a pH de 7.4 ± 0.1 (Bioxon) y en agar eosina azul de metileno a pH de 7.1 ± 0.1

(Bioxon) . Para la inoculación se siguió la técnica de vaciado en placa. Las cajas inoculadas se incubaron a $35 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ en una incubadora FELISA y el crecimiento microbiano de colonias típicas en cada medio se examinó a las 24 hs de incubación. Los resultados se reportaron como unidades formadoras de colonia/g de muestra (ufc/g de muestra).

4. Aislamiento de Salmonella.

Se siguieron los métodos 46.115 y 46.118 del AOAC (1984) y por Fernández-Escartín (1981). Se enriqueció la muestra con caldo selenito y cistina a pH de 6.9 (Merck, Naucalpan de Juárez, Edo. de México.) y caldo tetrationato verde brillante a pH de 6.9 (Merck); se introdujeron las muestras en los tubos respectivos y se incubaron a $35 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ durante 24 hs en una incubadora FELISA. Una vez que la muestra se enriqueció se procedió a la inoculación de los medios de cultivo selectivos (el agar sulfito de bismuto y agar verde brillante) a partir de cada uno de los caldos de enriquecimiento siguiendo la técnica de vaciado en placa. Las cajas se incubaron a $37 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ y el crecimiento de colonias típicas se leyó a las 24-48 hs. Los resultados se reportaron como unidades formadoras de colonia/g de muestra (ufc/g de muestra).

5. Determinación de hongos y levaduras

Para esta determinación se siguieron los métodos 46.006 y 46.011 del AOAC (1984) con ligeras variaciones. Se usó agar de papa y glucosa, a pH de 5.6 como medio de cultivo; la inoculación del medio se hizo mediante la técnica de vaciado de placa. Las

cajas inoculadas se incubaron a $28 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ y se contaron las colonias después de 3-5 días de incubación; el recuento de levaduras se hizo incubando las placas a 35°C y haciendo las lecturas después de 24-48 hs. Los resultados se reportaron como unidades formadoras de colonia/g de muestra (ufc/g de muestra).

F. Actividad de agua (Aw)

Se determinó en un aparato Rotronic Hygroscopic DT (Rotronic, Instr. Co., Huntington, N.Y.) siguiendo las recomendaciones del fabricante y del AOAC (1984) método 32.004. El equipo se calibró con una solución saturada de KCl ($A_w = 0.84$) a una temperatura de $25 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$; para esta determinación se emplearon 2 g de muestra de cada una de las fases así como de las muestras fermentadas a las 0, 24, 48 y 72 hs; después de que las muestras se liofilizaron también se les midió la actividad de agua. El tiempo en el que las muestras alcanzaron el equilibrio fue de 30 min aproximadamente. Los resultados se reportaron como actividad de agua.

G. Composición proximal

1. Humedad

La determinación se realizó siguiendo las indicaciones del AACC (1983) método 44.15. Una estufa con recirculación de aire (Aparatos de Laboratorio BG, México, D.F.) se ajustó a 130°C , se introdujeron las muestras durante 1 h y los cálculos se hicieron por diferencia de peso antes y después de introducir la muestra en la estufa.

2. Proteína cruda

Se determinó siguiendo el método Kjeldahl reportado en el AACC (1983) método 46.12. En nuestro caso se empleó el equipo Kjellec (Modelos 1007 y 1002, Tecator, Högarhäs, Suecia). La muestra se colocó en los tubos de digestión, se agregó ácido sulfúrico concentrado (Merck) y como catalizador se empleó mezcla reactiva de selenio (Merck). Se calentó a 600°C hasta que la muestra alcanzó color azul-verde y aspecto transparente. Una vez que la muestra se digirió se llevó a la unidad de destilación y el destilado se recibió en una solución de ácido bórico al 4% utilizando como indicador verde de metilo-rojo de bromocresol. El destilado se tituló con una solución de HCl valorada. Los cálculos para obtener la proteína cruda se hicieron multiplicando el contenido de nitrógeno total de la muestra por el factor 6.25.

3. Grasa cruda

El método seguido fue el reportado por el AACC (1983) método 30.25. Se utilizó el equipo Soxtec (Modelo 1043, Tecator). El disolvente para la extracción fue éter de petróleo con un punto de ebullición de 30-60°C. Se emplearon 2 g de muestra y la extracción se efectuó durante 60 min. El porcentaje de grasa contenido en la muestra se calculó por diferencia del peso antes y después de la extracción.

4. Fibra cruda

El método seguido fue el reportado por el AACC (1983) método 32.10. Se utilizaron 0.5 g de muestra, se colocaron a ebullición con ácido sulfúrico al 1.25% durante 30 min, se drenó el ácido, la muestra se enjuagó tres veces con agua desionizada a ebullición, se agregó hidróxido de potasio al 1.25% caliente y se dejó a ebullición durante 30 min. Después se drenó el hidróxido, se enjuagó tres veces con agua desionizada hirviendo, se drenó el agua, se le agregó acetona al residuo y éste se colocó en una estufa a 130°C durante 1 h; se obtuvo su peso y posteriormente el residuo se colocó en una mufla a 600°C hasta que se observó un color blanco o gris en el residuo. La diferencia del peso obtenido en la muestra a 130°C y la muestra a 600°C correspondió al contenido de fibra cruda.

5. Cenizas.

Se siguieron las indicaciones del AACC (1983) método 32.10. La cantidad de muestra empleada fue de 2 g, se llevó a incineración a 600°C hasta que ésta presentó una coloración blanquizca o grisácea. Por diferencia de peso de la muestra antes y después de la incineración se obtuvo el contenido de cenizas.

H. Análisis de homogenizados

Se homogenizaron 20 g de muestra fresca con 80 ml de agua desionizada en una licuadora de dos velocidades (Osterizer, Tlanepantla, Edo. de México.), aplicando la

velocidad máxima durante un tiempo de 2 min siguiendo la metodología reportada por Steinkraus y col. (1960). A las muestras homogenizadas se les determinó directamente el pH con un potenciómetro (Cornin, México, D.F.). El homogenizado se calentó a 80°C con agitación para eliminar la actividad enzimática. El consumo de materia seca durante la fermentación se determinó haciendo lo siguiente: Primero se determinó la humedad a partir de pesos conocidos de los homogenizados de garbanzo inoculado en el tiempo cero de fermentación colocándolos a una temperatura de 70°C hasta peso constante. El consumo de materia seca se calculó por la diferencia en el peso de la muestra inoculada y fermentada en el tiempo cero con respecto al peso de las muestras fermentadas a las de 24, 48 y 72 hs de fermentación.

La proteína cruda se determinó por el método de microKjeldahl a partir de pesos exactos de homogenizados siguiendo el método del AACC (1983).

A los homogenizados centrifugados se les determinó en el sobrenadante sólidos solubles en agua, proteína soluble en agua, siguiendo la metodología de Steinkraus y col. (1960). La proteína verdadera se determinó por diferencia entre nitrógeno no proteico y proteico determinado por el método de Kjeldahl siguiendo la metodología de Nacz y col. (1986).

Se pesaron 0.5 g de muestra con un contenido de nitrógeno conocido, se agregaron 20 ml de solución de ácido tricloroacético (ATC) al 10% (p/v) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se centrifugó y el sobrenadante se llevó a 50 ml usando agua destilada y se tomó una alícuota para la determinación de nitrógeno no proteico.

Para la determinación de carbohidratos solubles en etanol se pesaron 0.25 g de muestra, se agregó 1 ml de etanol caliente y se extrajo con agitación a baño María durante 5 min. Se esperó a que sedimentara la muestra y al residuo se le hizo otra extracción. Se juntaron ambos sobrenadantes, se aforó a 5 ml con etanol y se cuantificó utilizando el método de ácido sulfúrico-fenol de Dubois y col. (1956) utilizando glucosa como estándar.

I. pH y acidex titulable

El pH se determinó pesando 10 g de muestra liofilizada y mezclándolos con 40 ml de agua desionizada en una licuadora de dos velocidades (Osterizer), aplicando la velocidad máxima durante un tiempo de 2 min y midiéndolo con un potenciómetro (Cornin).

Para determinar la acidez titulable se siguió el método 02-31 del AACC (1983) y el método 16.023 del AOAC (1984). Se pesaron 2 g de muestra, se adicionaron 100 ml de agua libre de CO₂, se agregaron 0.5 ml de fenoltaleína al 1 % (p / v) y se tituló con una solución valorada de NaOH 0.1 N hasta que persistió el color rosa. Los resultados se reportaron como por ciento de ácido láctico basándose en la siguiente relación:

$$1 \text{ ml de NaOH } 0.1 \text{ N} = 0.0090 \text{ g de ácido láctico}$$

J. Proteína verdadera

Se tomaron 0.5 g de muestra liofilizada y molida que se pasó a través de una malla de 0.5 mm. se agitó con 20 ml de ATC al 10% (p/v) durante 1 h a temperatura ambiente. Se centrifugó a 28,000 x g y 10°C durante 30 min y se lavó tres veces el precipitado con ATC. Se recuperaron los sobrenadantes, se aforaron a 50 ml con agua desionizada y se utilizaron 3 ml de esta dilución para la determinación de proteína por el método de microKjeldahl (Naezck y col., 1986). El destilado se tituló utilizando ácido sulfúrico al 0.001 N.

K. Solubilidad de proteínas en diferentes soluciones de extracción

Se emplearon diferentes soluciones para la extracción de proteína de las muestras a diferente pH siguiendo las técnicas empleadas por Sathe y Salunkhe (1981), Sathe y col. (1984), y Snow y Brokes (1989). Las soluciones empleadas fueron las siguientes: agua alcalinizada a un pH de 10.15; Na₂CO₃ al 0.5% (p/v) + Tris-HCl 0.01 M a pH de 5.3 y 10.15, Na₂CO₃ al 0.5% (p/v) a pH 10.15, regulador de boratos 0.1 M a un pH de 8.3, NaCl al 10% (p/v) + Tris-HCl 0.01 M a pH de 3.13 y 7.3 y Tris-HCl 0.01 M a pH de 5.3 y 7.3. A 1 g de muestra se le adicionaron 10 ul de fluoruro de fenil metil sulfonil (PMSF, Sigma Chemical Co. , St. Louis, MO) 0.2 M y 10 ml de la solución de extracción. Posteriormente se ajustó el pH, se extrajo durante 2 hs a una temperatura de 30°C, con agitación circular a 225 rpm en una cámara con agitación y temperatura controlada (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, N.J.). Transcurrido el tiempo de extracción la muestra se centrifugó a 15,000 X g durante 20 min a 4°C y al

sobrenadante se le determinó nitrógeno total en una alícuota por el método de microKjeldhal.

Al resto del sobrenadante se le agregaron 4 ml de ATC al 10 % para precipitar la proteína, se centrifugó con las condiciones anteriores, se tomó una alícuota del sobrenadante y se le determinó nitrógeno total por el método de microKjeldahl (AACC, 1983).

L. Carbohidratos solubles en etanol

Para la determinación de carbohidratos en harinas se usaron 0.25 g de muestra y se extrajeron con solución acuosa de etanol al 80% en caliente (Hassid y Neufled, 1964). A los extractos se les cuantificó carbohidratos totales según el método de Dubois y col. (1956). En este método los carbohidratos se hacen reaccionar con fenol al 5 % en presencia de ácido sulfúrico concentrado para dar compuestos coloridos que absorben a 490 nm. La absorbancia se determinó en un espectrofotómetro SP6-550 UV/VIS (Pye Unicam Ltd, Cambridge, Inglaterra). Como curva estándar se utilizó glucosa en una concentración de 0 a 75 µl/ml.

M. Actividad de proteasas en pH ácido y alcalino

Para la determinación de actividad de proteasas a un pH ácido y alcalino se siguió la metodología reportada por Anson (1981). La actividad proteolítica a pH ácido se

determinó midiendo el incremento de la absorbancia a 280 nm provocado por la liberación de péptidos solubles en ATC. Se incubaron alícuotas de 100 µl de extracto con 1.3 ml de la solución de trabajo de hemoglobina (2% p/p) en 300 µl de regulador de citratos 0.2 M a un pH de 2.5 a temperatura de 30°C durante 2 hs. La reacción se paró añadiendo 2.5 ml de ATC 0.34 N. Las muestras fueron colocadas en un baño de hielo molido por lo menos 10 min para facilitar la sedimentación del precipitado. Los precipitados se centrifugaron a 15,000 X g durante 5 min y la absorbancia de los sobrenadantes libres de partículas fue leída a 280 nm. Se hizo una corrección restando a la solución problema el blanco el cual fue preparado adicionando a los tubos los reactivos que a continuación se mencionan y en ese mismo orden: solución reguladora de citratos, ATC y la alícuota de la muestra. Al final del tiempo de incubación se adicionó la solución de hemoglobina. La actividad proteolítica a pH ácido se expresó en unidades de actividad hemoglobinolítica. Una unidad de actividad se consideró como el aumento de 0.01 unidades de absorbancia a 280 nm por min.

El cálculo de unidades totales de actividad se hizo empleando la siguiente ecuación:

$$U^{Hb} = (A_{UA}/t) (1 \text{ unidad}/0.01 \text{ UA} \times \text{minuto}^{-1}) (1/M) (V_T)$$

donde:

U^{Hb} = Unidades totales de actividad

$$\Delta A_{1A} = \text{incremento en unidades de absorbancia calculado al restar} \\ A_{\text{problema}} - A_{\text{blanco}}$$

t = tiempo de incubación

V = volumen de la alícuota

V_T = volumen total del extracto

La actividad proteolítica a un pH básico se determinó utilizando como sustrato caseína a pH 7.6. Este método al igual que el descrito consisten en medir el incremento de absorbancia a 280 nm causada por péptidos solubles en ATC y liberados durante la proteólisis. Para la determinación de actividad caseinolítica se incubaron alícuotas de 100 μ l de extracto con 1 ml de la solución al 2 % (p/v) de caseína en 900 μ l de una solución reguladora de Tris - HCl 0.2 M a pH de 7.6 a una temperatura de 30°C durante 2 hs; el volumen total de trabajo fue de 1 ml. La reacción se paró agregando 3 ml de ATC al 5 %. Las muestras se dejaron reposar en hielo molido durante 60 min; posteriormente las muestras se centrifugaron a 15,000 X g durante 5 min. La absorbancia de los sobrenadantes se leyó a 280 nm. Los blancos fueron preparados de manera similar a los mencionados, con pequeñas variaciones ya que la caseína fue adicionada al finalizar el tiempo de incubación. Una cantidad de actividad caseinolítica fue equivalente al aumentó de 0.01 unidades de absorbancia a 280 nm por min; las unidades totales se calcularon empleando la ecuación anterior.

N. Actividad de peroxidasas

La determinación de peroxidasas se hizo siguiendo la metodología reportada por Fülter (1974) con algunas modificaciones (Herneda y Klein, 1990). La actividad de peroxidasa puede ser determinada por el decremento de H_2O_2 (como donador de hidrógeno), durante la formación de compuestos oxidados como producto de deshidrogenación del guayacol (GDPH), cuando se usa guayacol como sustrato a una absorbancia de 470 nm.

La mezcla sustrato contenía 10 ml de guayacol al 1 %, 10 ml de peróxido de hidrógeno al 0.3 % y 100 ml de regulador de fosfato de sodio 0.05 M a pH de 6.5. La cubeta de reacción contenía 2.87 ml de la mezcla sustrato y 0.13 ml del extracto crudo de las muestras en un volumen total de 3 ml. El control contenía 0.13 ml de etanol en lugar del extracto de la muestra. Una unidad de actividad es definida como el cambio en absorbancia a 470 nm de 0.001 por min. El cálculo de unidades totales de actividad se hizo aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Unidades totales (U/l)} = 500 / \Delta t$$

donde:

500 = constante de las condiciones de reacción

Δt = tiempo de incubación

O. Acidos grasos totales

Se mezclaron 3 g de las muestras licuadas y molidas a una malla de 0.5 mm con 1 ml de ácido heptadecanoico (Sigma) al 2 % en éter etílico (Merck) añadido como estándar interno. La grasa se extrajo con 50 ml de una mezcla de cloroformo - metanol (2:1 v/v). Se evaporó la mezcla de disolventes después de la extracción calentando a 60°C y agitación magnética. Se efectuó la hidrólisis de los triglicéridos con 3 ml de KOH 0.25 N en metanol bajo condiciones de reflujo y calor. La saponificación siguiente se efectuó con 3 ml de trifluoruro de boro al 14 % (p/v) en metanol (Sigma). Se añadieron 8 ml de una solución saturada de NaCl para precipitar las impurezas en el extracto y se suspendieron los ácidos grasos derivados en 2 ml de isooctano (Bannon y col., 1982 a,b, 1985).

P. Valor de peróxidos

El valor de peróxidos se determinó siguiendo el método 2.144 descrito en el AOAC (1984) y utilizado por Hwang y Regenstein (1988). Se pesaron 5 g de muestra licuada y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Se adicionaron 30 ml de una solución de ácido acético - cloroformo (3 : 2 v/v). Se adicionaron 0.5 ml de una solución saturada de yoduro de potasio. Se dejó reaccionar durante 1 min con ligeras agitaciones. Posteriormente se adicionaron 30 ml de agua y se tituló lentamente con una solución valorada de tiosulfato de sodio 0.1 N agitando vigorosamente el matraz, hasta que el color amarillo casi desapareció. En ese momento se adicionaron 0.5 ml de una solución de almidón al 1 % (p/v) y se continuó la titulación agitando vigorosamente para liberar todo el yodo contenido en el cloroformo hasta que

desapareció el color azul. Se corrigió la lectura preparando un blanco de reactivos el cual gastó 0.1 ml o menos de fosfato de sodio 0.1 N en la titulación.

Q. Taninos

A partir de 200 mg de muestra liofilizada y molida recientemente se hizo la extracción de taninos agregando 10 ml de HCl al 1 % en metanol. Se agitó durante 20 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 20,000X g. La cuantificación se hizo mediante una reacción colorimétrica con vainillina, leyendo la absorbancia a 500 nm a 30°C. Se expresaron los datos como equivalente de catequina (Price y col., 1978).

R. Digestibilidad *in vitro*

Se preparó la solución enzimática con tripsina tipo IX al 0.16 %, quimotripsina tipo II al 0.31 % y peptidasa al 0.13 % (Sigma); el pH se ajustó a 8.0 y se mantuvo en hielo. Se molió la muestra, se pasó a través de una malla de 0.5 mm y se determinó la cantidad de proteína verdadera según el método mencionado con anterioridad. Se suspendió la muestra conteniendo 312.5 mg de proteína en 50 ml de agua y se ajustó el pH a 8.0. Se añadieron 5 ml de solución enzimática y se leyó el cambio de pH de la muestra después de 10 min de digestión a 37°C; esto es una medida de la liberación de aminoácidos. Se calculó la digestibilidad mediante la ecuación:

$$Y = 210.464 - 18.103 X$$

donde:

Y = digestibilidad en porcentaje

X = pH después de 10 min

Esta ecuación describe la relación entre la digestibilidad *in vitro* y la digestibilidad *in vivo* determinado en ratas (Hsu y col., 1977).

S. Color

El color se determinó utilizando el equipo Hunter Lab (Modelo D25L, Hunter Associates, Reston, VA) empleando como estándar el mosaico de color blanco (L= 91.21, a= -0.1; b= -1.7). Se colocó una cantidad de muestra suficiente para cubrir bien la superficie de una caja petri y se hizo la lectura cuatro veces girando la caja 90° entre cada lectura para compensar las irregularidades en la muestra. Se calcularon la diferencia de cromalidad y color total por diferencias entre el estándar y la muestra mediante la ecuación:

$$\Delta C = ((a_e - a_m)^2 + (b_e - b_m)^2)^{1/2}$$

$$\Delta E = ((L_e - L_m)^2 + (a_e - a_m)^2 + (b_e - b_m)^2)^{1/2}$$

donde:

DC= diferencia de cromaticidad

DE = diferencia de color total

L = luminosidad

a = valor en la escala del verde al rojo

b = valor en la escala del azul al amarillo

e y m = estándar y muestra, respectivamente.

T. Estudios de microscopía electrónica de barrido

Las muestras fueron fijadas en un regulador de fosfatos (0.1 M, pH de 7.4) y glutaraldehído al 3% por 5 hs a 4°C. Las muestras fijadas fueron lavadas durante la noche en sucrosa 0.25 M solubilizada en regulador de fosfatos 0.1 M. La postfixación fue hecha con tetróxido de osmio al 2% en regulador de fosfatos 0.1 M a 4°C y lavados durante la noche. Después de la deshidratación en series ascendentes de etanol, las muestras fueron secadas al punto crítico con CO₂ líquido, montadas en recipientes de aluminio y cubiertas con 40-60 nm de carbón y posteriormente con 60 nm de oro. Las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido JEOL 35CX (JEOL Ltd., Japon) a una aceleración de voltaje de 10 Kv.

U. Análisis estadístico

Todas las determinaciones incluyendo los análisis microbiológicos fueron resultado de tres fermentaciones y cada una de ellas por triplicado. Los datos fueron analizados para la significancia estadística mediante la diferencia mínima significativa (DMS) y prueba de Tukey utilizando un nivel de significancia del 95% .

V. RESULTADOS Y DISCUSION

A. Desarrollo de un procedimiento mediante fermentación sólida empleando garbanzo de baja calidad comercial como sustrato.

En la Figura 5 se muestra el método propuesto para la obtención de garbanzo fermentado, el cual consta de seis etapas principales: trituration, remojo, eliminación de cáscara, cocción, inoculación y fermentación. En cada una de ellas se estudiaron las condiciones óptimas así como los cambios que ocurrieron en el sustrato por efecto de la fermentación.

1. Trituración, remojo, descascarillado y cocción.

La trituración con un molino casero fue suficiente para partir el grano; cuando la muestra se trituró a un tamaño de partícula menor de 3 mm el crecimiento bacteriano se incrementó y el crecimiento del hongo se inhibió. El producto obtenido despedía un olor amoniacal desagradable. Se obtuvieron resultados similares al anterior cuando la muestra no se tamizaba y se dejaban partículas menores e iguales a 3 mm.

Cuando el tamaño de partícula fue mayor de 3 mm se observó un desprendimiento de agua durante la fermentación y proliferaron las bacterias putrefactivas inhibiéndose el crecimiento del hongo. Se obtuvo un producto con color, olor y aspecto desagradable.

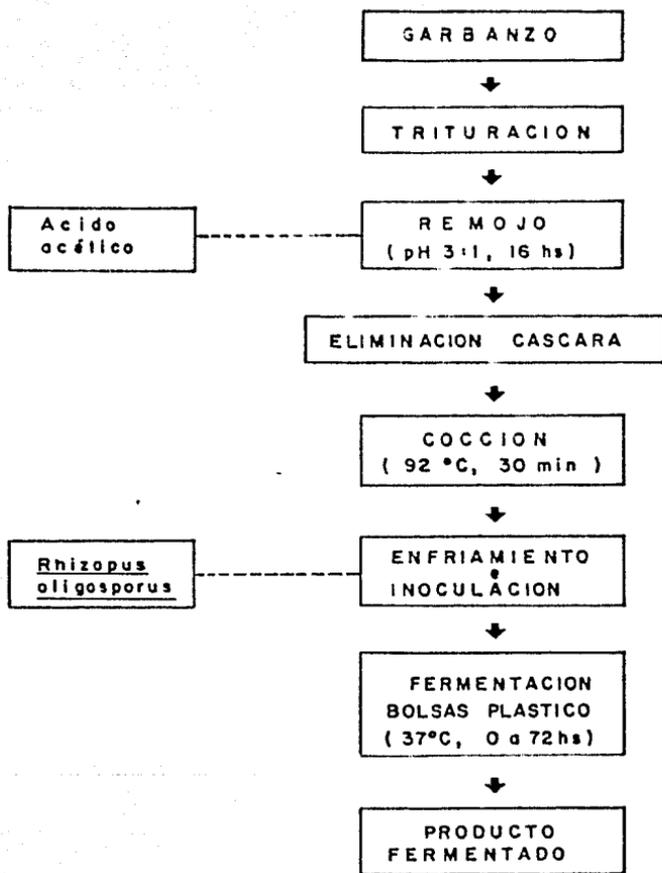


Figura 5. Método propuesto para la obtención de garbanzo fermentado.

Cuando la muestra se trituró y tamizó con una malla de 3 mm para eliminar las partículas menores el crecimiento del hongo sobre el sustrato se favoreció, se limitó el crecimiento bacteriano y se obtuvo un producto de color, olor y aspecto agradable. Se observó que el tamaño de partícula es importante para que el hongo crezca sobre el sustrato dado que requiere de una aereación adecuada que suministre suficiente cantidad de oxígeno para su crecimiento; esto coincide con lo reportado por Wang y col. (1975), Robinson y col. (1977), Sinskey (1978), Odibo y Umeh (1989), Andrews (1990) y Mitchell y col. (1991).

El remojo del sustrato en medio ácido favoreció el desarrollo del hongo y limitó el crecimiento bacteriano. Algunos autores como Blakeman y col. (1988), Nwankwo y col. (1989), Soni y Sandhu (1989), Mital y Steinkraus (1990), y Ashenafi y Busse (1991) han reportado resultados similares.

La eliminación de la cáscara se hizo de forma manual por fricción de cada cotiledón y posteriormente por flotación en agua desionizada; esta metodología ha sido reportada por Paredes-López y col. (1987) y Mital y Steinkraus (1990).

Cuando el tiempo de cocción fue de 15 y 20 min la textura del cotiledón fue dura y la eliminación de la cáscara se dificultó. El crecimiento del hongo se vió muy limitado mientras que el de las bacterias fue muy abundante y el producto obtenido tenía un olor desagradable. Cuando el tiempo de cocción fue de 45 y 60 min la textura del cotiledón fue blanda y al eliminar la cáscara se eliminaba parte del cotiledón; hubo una mayor absorción de agua por los cotiledones y durante la fermentación el hongo no creció en tanto que las bacterias crecieron abundantemente produciendo un olor a putrefacción.

La cocción durante 30 min permitió que al frotar los cotiledones se eliminara de una manera relativamente sencilla la cáscara sin que se eliminara parte del cotiledón. El hongo creció adecuadamente, el crecimiento de bacterias fue limitado y el producto presentó un olor agradable. La ebullición quizá permitió que por un lado se eliminaran o modificaran algunos inhibidores del crecimiento del hongo y por el otro se redujeran los microorganismos contaminantes que pueden interferir con la fermentación.

2. Densidad del inóculo

Se decidió utilizar la densidad de inóculo empleada por Wang y col. (1975a) y por Paredes-López y col. (1987) siendo de 1×10^6 esporas/ml. Para poder inocular el sustrato fue necesario drenar la muestra durante 20 min y después se probaron diferentes volúmenes de suspensión, observándose que con 7.5 y 10 ml de inóculo por cada 200 g de sustrato la humedad se incrementó favoreciendo el crecimiento bacteriano y la producción de amoníaco. En esas condiciones se obtuvo un producto con características poco deseables. La producción de amoníaco aumentó el pH y cuando la concentración es suficiente para llevar al sustrato a un pH de 7.0 es muy probable que el hongo se inactive (Ashenafi y Busse, 1991).

Cuando se adicionaron volúmenes de 2.5 y 3.5 ml de inóculo la humedad del medio limitó el crecimiento del hongo favoreciendo reacciones degradativas en el sustrato tal vez debidas a reacciones enzimáticas o por favorecer el crecimiento de bacterias indeseables; el producto obtenido presentó olor a putrefacción y por consiguiente tanto el color como la apariencia fueron desagradables.

Cuando se adicionaron 5 ml de la suspensión el crecimiento del hongo sobre el sustrato fue adecuado y el producto obtenido presentó características aceptables.

3. Recipientes para la fermentación

Se utilizaron bolsas de plástico perforadas en las cuales se colocaron diferentes cantidades de sustrato. Cuando en las bolsas de 15 por 25 cm se colocaron 30 ó 45 g de sustrato inoculado no se obtuvo un crecimiento homogéneo del hongo pues en unas zonas se favoreció el crecimiento del hongo y en otras el de las bacterias. La distribución del aire también fue heterogénea pues en algunas porciones hubo esporulación y en otras no. El producto obtenido mostró aspecto heterogéneo en color, olor, textura y apariencia.

Cuando la cantidad de sustrato inoculado fue de 100 y 120 g, usando el mismo tipo de bolsas, no se permitió el intercambio de aire adecuado en el sustrato lo cual se manifestó por un crecimiento bacteriano abundante, olor a putrefacción, ablandamiento en la textura, obteniéndose finalmente un producto con características poco deseables.

Cuando se colocaron 60 g de sustrato inoculado se observó un crecimiento adecuado del hongo sobre el sustrato. A las 72 hs de fermentación se presentó abundante micelio blanco o grisáceo debido a la esporulación y que entrelazó los colitrones proporcionando una textura compacta. De esto se dedujo que es muy importante el

grosor del sustrato (aproximadamente 1 cm) para que permita un intercambio de oxígeno y temperatura adecuados para la fermentación.

En las bolsas de 45 X 55 cm se utilizaron 1 600 g de sustrato inoculado, en este caso no se hicieron experimentos adicionales pues con las condiciones establecidas para el tamaño de bolsa más pequeño se observó que independientemente de la cantidad de sustrato inoculado si el grosor del sustrato era de 1 cm aproximadamente, se obtenía un producto homogéneo y con características reproducibles adecuadas para este estudio.

4. Condiciones de la fermentación

Las temperaturas empleadas para las fermentaciones fueron de 25, 28, 35, 38 y 40°C. La temperatura es un factor que afecta directamente el crecimiento de los microorganismos; cuando se emplearon temperaturas de 25 y 28°C se observó que el crecimiento del hongo se inhibió y el sustrato inoculado adquirió un olor a putrefacción.

Cuando se incubó a 40°C se observó una mayor condensación de agua en el interior de la bolsa favoreciéndose el crecimiento bacteriano. El producto presentó características de apariencia, color y olor poco deseables. Martinelli y Hesseltine (1964) reportaron que al elevarse la temperatura y evaporarse el agua se permite el crecimiento de bacterias termofílicas cuyas esporas resisten el tratamiento de cocción limitando el crecimiento del hongo. Cuando la fermentación se realizó a 35 y 38°C (Paredes-López y col., 1987), el hongo creció sobre el sustrato, los colledones se

fueron compactando y presentando un color blanco a las 24 y 48 hs de fermentación mientras que a las 72 hs se observó una coloración grisácea debido a la esporulación del hongo. El producto obtenido presentó características de apariencia, color y olor adecuados. Ashenali y Busse (1991) reportaron que la temperatura de fermentación se incrementa en el sustrato hasta que se inicia el crecimiento micelial.

La humedad relativa correspondió a la mantenida dentro de la bolsa de plástico perforada pues no se empleó un sistema de control de humedad adicional, dado que bajo estas condiciones el producto obtenido tuvo las características deseadas. La Tabla 5 resume las condiciones empleadas en la fermentación.

B. Desarrollo microbiológico a lo largo de la fermentación

Las determinaciones microbiológicas se hicieron a partir de muestras fermentadas bajo las condiciones de la Figura 4.

1. Diluciones microbianas

El regulador de fosfatos empleado como solución diluyente sirvió para que los microorganismos no se estresaran al cambiar de sustrato, evitando de esta manera que se colapsaran o estallaran debido a la presión osmótica del medio y de esta manera obtener resultados confiables.

Tabla 5. Resumen de las diversas condiciones empleadas en la fermentación

Condición	Valor
Tamaño de partícula	3mm, >3 mm, < 3 mm
Remojo en medio ácido	pH = 3.1
Tiempo de remojo	16 hs
Tiempo de cocción	15, 20, 30, 45 y 60 min
Densidad del inóculo	1×10^6 esporas/ml de suspensión
Inóculo (ml) por cada 200g de sustrato	2.5, 3.5, 5.0, 7.5 y 10 ml
Recipientes	Bolsas de plástico 15 X 25cm y 45 X 55 cm, con perforaciones de aproximadamente 1 cm entre cada una de estas perforaciones
Porciones de sustrato	30, 40, 60, 100, 120 y 1,600 g
Temperatura	25, 28, 35 y 40°C
Tiempo	0, 24, 48 y 72 hs

Las diluciones microbianas permitieron hacer las determinaciones microbiológicas con una confiabilidad adecuada, pues se leyeron aquellas cajas donde el crecimiento bacteriano se encontró entre 30 y 300 unidades formadoras de colonia (ufc); para la determinación de hongos se leyeron aquellas cajas donde el crecimiento de ufc no fue mayor de 5 (Shieh y Beuchat, 1982; Jideani y Okeke, 1991).

2. Determinación de bacterias mesofílicas aerobias

Los resultados del crecimiento de las bacterias mesofílicas aerobias se encuentran en la Tabla 6. El crecimiento de estas bacterias no presentó cambios de 0 a 12 hs de fermentación, pero a las 24 hs se observó un aumento en la población alcanzando valores de 270×10^2 ufc/g de muestra (cuyo logaritmo decimal equivale a 4.43); posteriormente no hubo fluctuaciones, alcanzando valores de 120×10^2 ufc/g de muestra (el valor del logaritmo decimal equivale a 4.1). Los valores se representan gráficamente en la Figura 6. Es pertinente señalar que muchas materias primas contienen cientos de miles de bacterias mesofílicas aerobias/g de muestra y son considerados de buena calidad, por ejemplo en Estados Unidos de Norteamérica la leche como materia prima es aceptable si contiene 65×10^3 ufc/g de muestra, mientras que en Europa se acepta 1×10^6 ufc/g de muestra. Es decir que cuentas de bacterias mesofílicas aerobias de 10^6 - 10^7 ufc/g de muestra pueden no representar un problema sanitario dado que son productos que se van a procesar (SECOFI, 1977a; Jelen, 1985; Samson y col. 1987; Bulgarelli y Beuchat, 1990). En México la Dirección General de Normas establece que los alimentos fermentados tipo yoghurt o leche búlgara deberán contener 2×10^6 col/g de bacterias lácticas vivas como mínimo (SECOFI, 1977f). En este caso se comparó con un alimento fermentado tipo yoghurt o leche búlgara por no

Tabla 6. Cambios microbiológicos durante la fermentación de garbanzo^{1/}

Muestra	BMA ^{2/}	Coliformes	Salmonella	Hongos	Levaduras
0 HF ^{3/}	70	ND ^{4/}	ND	2	ND
12 HF	70	ND	ND	2	ND
24 HF	270	ND	ND	4	ND
36 HF	130	ND	ND	10	ND
48 HF	220	ND	ND	40	ND
60 HF	170	ND	ND	40	ND
72 HF	120	ND	ND	100	ND

^{1/} Expresado como unidades formadoras de colonia (UFC) X 10²/g de muestra húmeda, son el promedio de tres fermentaciones por duplicado.

^{2/} BMA = Bacterias mesofílicas aerobias.

^{3/} HF = Horas de fermentación.

^{4/} ND = No detectable.

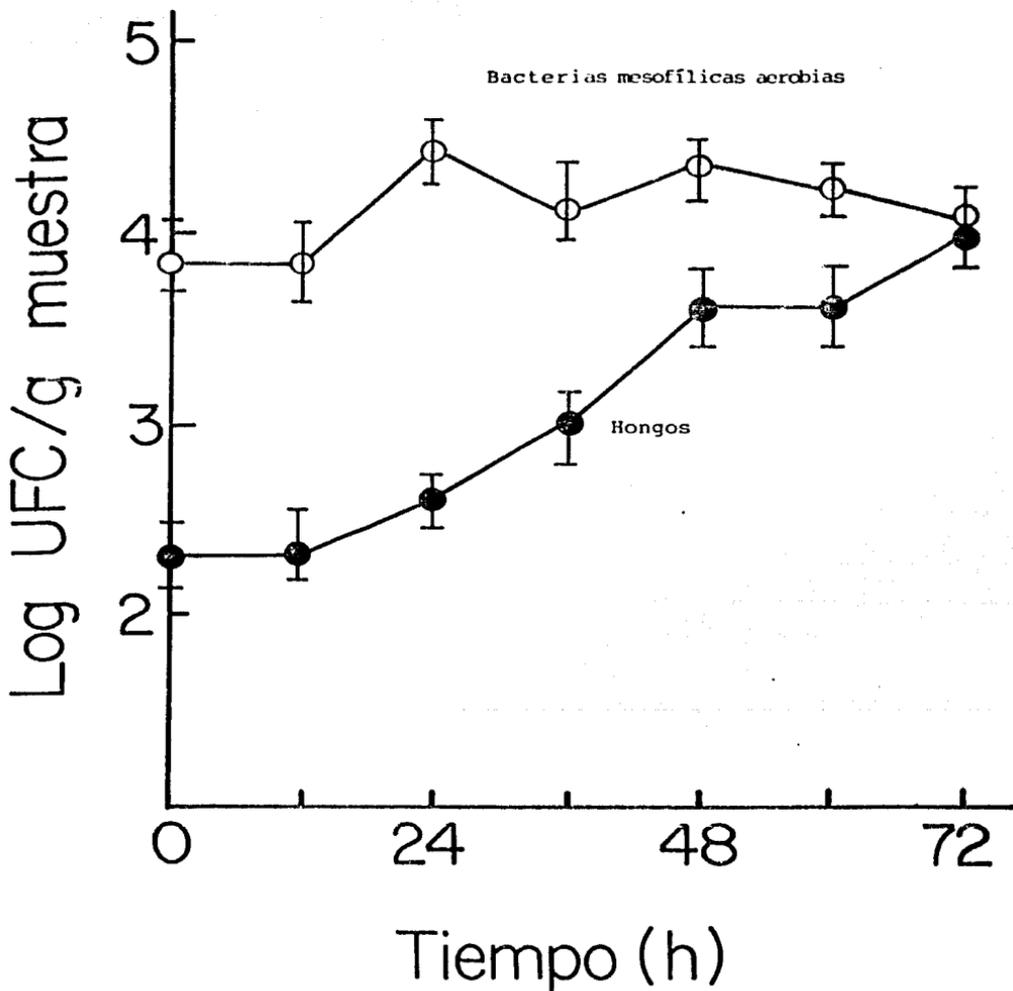


Figura 6. Crecimiento microbiano de bacterias mesofílicas aerobias y hongos.

haber dentro de la Dirección General de Normas un producto similar al estudiado, aclarando que la cuenta de bacterias mesofílicas aerobias pueden o no coincidir con la cuenta de bacterias lácticas. Sin embargo, estos datos pueden dar un punto de comparación.

3. Determinación de bacterias coliformes

La interpretación del hallazgo y abundancia de los organismos coliformes no tiene un carácter universal. En tanto que en el agua, en términos generales, se considera que su presencia revela una exposición reciente a la contaminación fecal, su significado no es el mismo en el caso de la leche, sustrato en el cual son capaces de desarrollarse muy activamente. En los alimentos la presencia y el recuento de los microorganismos coliformes son utilizados también como indicadores de prácticas sanitarias objetables en el manejo o fabricación de un alimento; así, expresan la calidad microbiológica de un producto y revelan la eficiencia de un proceso descontaminante o germicida (Desrosier, 1977; SECOFI, 1977b; Jelen, 1985; Bulgarelli y Beuchat, 1990).

La demostración y el recuento de organismos coliformes pueden realizarse mediante el empleo de medios sólidos que los favorecen selectivamente y los diferencian de los microorganismos con los que suelen encontrarse asociados en los alimentos. En general, se puede afirmar que son muy abundantes y siempre presentes en la materia fecal del hombre, animales superiores, suelo y vegetales.

SECOFI (1977f) especifica que en alimentos tipo yoghurt o leche búlgara la cantidad de organismos coliformes como máximo deberán ser 10 col/g. La Tabla 6 muestra la

ausencia de microorganismos coliformes en 10 g de muestra húmeda en cuyo caso se puede decir que el manejo de la muestra fue adecuado.

4. Aislamiento de *Salmonella*

Es pertinente señalar aquí que se decidió determinar la posible presencia de *Salmonella* de los materiales en estudio en virtud de la importancia sanitaria de esta bacteria y de que su sola presencia sugeriría prácticas sanitarias inadecuadas.

El aislamiento de *Salmonella* requiere el empleo de técnicas que difieren según sea la composición del alimento, el tratamiento al que ha estado sujeto durante su procesamiento y la carga microbiana del producto final, ya que la contaminación de estos microorganismos va acompañada del ingreso de otras enterobacterias que pueden llegar a inhibirlas. Estas son las razones por las que no es posible recomendar exclusivamente un medio de cultivo para el aislamiento de este tipo de microorganismos. La literatura registra una gran diversidad de medios de cultivo, técnicas de pre-enriquecimiento y enriquecimiento. Además se sugieren diversos volúmenes de muestra para realizar el análisis. El crecimiento de *Salmonella* en una gran variedad de alimentos ha sido motivo de muchos estudios, sobre todo en aquellos que más se asocian a casos de gastroenteritis o que potencialmente pueden serlo. Crecen en toda la superficie de los alimentos sin signos de alteración aún cuando las cifras alcanzadas lleguen a ser más de 10×10^6 ufc/g de muestra (SECOFI, 1977e; Fernández-Escartín, 1981; Tanaka y col. 1985; Samson y col. 1987). La Tabla 6 muestra que durante las fermentaciones de este estudio el crecimiento de *Salmonella* fue

menor al límite de sensibilidad de la técnica, lo cual indica que es un producto de calidad sanitaria adecuada para su consumo.

5. Determinación de hongos y levaduras

El método empleado muestra solamente resultados cualitativos pues el desarrollo de colonias estará directamente relacionado con el fraccionamiento del micelio. Sin embargo puede dar una idea de la densidad de dicha población.

En la Tabla 6 se observa que la población inicial de hongos de 2×10^2 ufc/g de muestra (equivalente al logaritmo decimal de 2.3) permaneció constante hasta las 12 hs de fermentación y posteriormente se observó un incremento en la población a las 24 hs; a las 72 hs la población de hongos alcanzó valores de 100×10^2 (con una valor equivalente a 4 en logaritmo decimal). Los valores reportados aquí (Figura 6) son menores a los observados por Shieh y col. (1982) en la preparación de miso en donde utilizaron como inóculo kojis preparados.

El período máximo de fermentación fue de 72 hs, dado que en previos análisis sensoriales los jueces manifestaron que con este tiempo de fermentación el producto tenía mejores características sensoriales, por ejemplo: color, sabor, olor y aceptabilidad. Bulgarelli y Beuchat (1990) y Paredes-López y col. (1990) reportaron un comportamiento similar al obtenido en este estudio.

No se detectaron mediante esta técnica desarrollo de levaduras durante la fermentación. *R. oligosporus* no presenta la forma levaduriforme durante su desarrollo

y posiblemente no hubo contaminación por otro hongo que presentara este tipo de crecimiento.

C. Actividad de agua (Aw)

La actividad de agua (Aw) de la muestra triturada fue de 0.430 mientras que la Aw de las muestras fermentada, remojada y remojada-descascarillada-cocida fue de 0.925 (Tabla 7). Esto se debió a que la muestra triturada estaba deshidratada en tanto que las muestras remojada y remojada-descascarillada-cocida fueron sumergidas en agua acidificada durante 16 hs. lo cual indujo el grado de hidratación de los colíedones. Esta Aw en la muestra triturada limitó el crecimiento de microorganismos lo cual favoreció la conservación de la materia prima. Valores de Aw de 0.925 en la muestra remojada y remojada-descascarillada-cocida favorecieron la implantación de los microorganismos, lo cual fue benéfico para la fermentación.

La Aw durante la fermentación de 0-72 hs fue de 0.922 a 0.924 (Tabla 7). Uno de los factores importantes para el crecimiento de los microorganismos es el agua; la respuesta individual de bacterias, levaduras y hongos a los cambios en la Aw es variable y en general se puede decir que no hay crecimiento microbiano a Aw menor de 0.600 (Fernández-Escartín, 1981; Jelen, 1985; Paredos-López y col.,1991). Sin embargo, se ha reportado que hongos xerofílicos pueden deteriorar alimentos con Aw de 0.650 (Desrosier, 1977). Corry (1978) y Scorza y col. (1981) reportaron que la mayoría de los hongos crecen a Aw cercanas a 0.930 y Glenn y Rogers (1989) señalaron que en la elaboración de tempe con *R. oligosporus*, el hongo no germinó a

Tabla 7. Cambios en la actividad de agua durante el crecimiento microbiano en garbanzo fermentado^{1/}

Muestra	Aw ^{2/}	
	Fermentada	Liofilizada
Triturada	0.430 ^a	0.430 ^a
Remojada	0.925 ^b	0.431 ^a
RDC ^{3/}	0.925 ^b	0.432 ^a
24 HF ^{4/}	0.922 ^b	0.431 ^a
48 HF	0.922 ^b	0.429 ^a
72 HF	0.925 ^b	0.430 ^a
DMS (0.05) ^{5/}	0.007	0.009

^{1/} Promedio de tres fermentaciones por triplicado, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

^{2/} Aw = Actividad de agua.

^{3/} RDC = Remojada, descascarillada y cocida.

^{4/} HF = Horas de fermentación

^{5/} DMS = Diferencia mínima significativa.

Aw menores a 0.910. Lo mencionado corresponde con los resultados obtenidos en la fermentación. La Aw de las muestras liofilizadas fue aproximadamente 0.430 (Tabla 7).

Otros factores limitantes del crecimiento de microorganismos son el pH y la presencia de compuestos orgánicos en combinación con la Aw. Webster y col. (1985) observaron que la Aw, la naturaleza de los solutos, el pH y la presencia de citrato o benzoato de sodio tuvieron un efecto inhibitorio o limitante en el crecimiento de una mezcla de microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Streptococcus fecalis*, *Lactobacillus casei* y *Clostridium perfringens*. Ellos proponen que mezclas de compuestos orgánicos como citrato-benzoato reducen la actividad de agua en los alimentos pudiendo ser una alternativa como método de conservación.

D. Efecto de la fermentación sobre la composición y el valor nutritivo del garbanzo

1. Composición proximal

En la Tabla 8 se muestran los cambios que ocurrieron durante la fermentación de garbanzo. El contenido de humedad de la muestra liofilizada fue de 7.8% mientras que las muestras remojada, y remojada-descascarillada-cocida alcanzaron valores de 58% y 58.4% respectivamente. Este incremento en el porcentaje de humedad se debió a que durante el remojo en medio ácido los colledones absorbieron agua. Chavan y col.

Tabla 8. Cambios en la composición proximal de garbanzo fermentado^{1/}

Muestra	Contenido de humedad (%)	% en base seca					
		Proteína ^{2/}	Grasa	Cenizas	Fibra cruda	Carbohidratos ^{3/}	CMS ^{4/}
Triturada	7.8 ^a	16.0 ^a	9.1 ^a	3.0 ^a	6.2 ^a	65.7	-
Remojada	58.0 ^b	17.5 ^b	9.1 ^a	1.8 ^b	4.1 ^b	68.5	
RDC ^{5/}	58.4 ^b	17.5 ^{ab}	9.5 ^a	1.8 ^b	3.9 ^{bc}	68.3	
24HF ^{6/}	59.1 ^{bc}	19.1 ^{bc}	11.0 ^c	1.7 ^b	3.5 ^c	65.7	10.0 ^a
48HF	59.9 ^c	19.5 ^{bc}	11.0 ^c	1.8 ^b	3.5 ^c	65.2	11.2 ^b
72HF	60.8 ^d	21.3 ^c	11.0 ^c	1.9 ^b	3.6 ^c	63.2	11.9 ^b
72HF BSC ^{7/}	-	19.0 ^{bc}	9.8 ^b	0.8 ^c	3.2 ^d	-	-
DMS (0.05) ^{8/}	0.7	1.4	0.4	0.2 ^b	0.2		

^{1/} Promedio de tres fermentaciones por triplicado, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p < 0.05$

^{2/} Proteína = % Nitrógeno total X 6.25

^{3/} Calculados por diferencia.

^{4/} CMS = Consumo de materia seca.

^{5/} RDC = Remojada, descascarillada y cocida a $90^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$, por 30 minutos.

^{6/} HF = Horas de fermentación.

^{7/} BSC = Base seca corregida.

^{8/} DMS = Diferencia mínima significativa.

(1986) reportaron que con el remojo se disminuye el tiempo de cocción y se incrementa la dispersión de sólidos. Nnalina y col. (1990) reportaron que a través del remojo en las leguminosas, se induce la germinación produciéndose una síntesis de enzimas hidrolíticas que reducen los niveles de oligosacáridos inductores de la flatulencia, así como la modificación de la funcionalidad de las proteínas y del almidón. En este estudio el remojo disminuyó el tiempo de cocción. La humedad varió ligeramente durante la fermentación ya que las bolsas de plástico al estar perforadas permiten el intercambio de gases pero la evaporación del agua es mínima. En la muestra fermentada durante 24 hs se alcanzaron valores de humedad de 59.1% mientras que en las de 48 y 72 hs se alcanzaron valores de 59.9% y 60.8% respectivamente.

Durante la fermentación los microorganismos tienen una gran actividad metabólica y algunos de los productos liberados son: agua, desprendimiento de CO₂, producción de algunos compuestos orgánicos como ácido láctico, ácido succínico, compuestos volátiles derivados de la piridina, enzimas proteolíticas y antioxidantes como isoflavonas (Shieh y col., 1982; Mital y Garg, 1990). Tanto los ácidos orgánicos como los compuestos volátiles entre otras características le confieren un sabor y olor agradables.

El contenido de proteína total (Tabla 8) se incrementó significativamente durante el remojo y el remojo, descascarillado y cocido siendo de 17.5% para ambos. Este aumento se debe a que durante el remojo existe el fenómeno de lixiviación y mediante el cual algunos compuestos solubles son liberados al medio (Steinkraus y col. 1960). El proceso de fermentación incrementó significativamente el contenido de proteína; este incremento puede ser el resultado del consumo de carbohidratos y producción de

CO₂ por el hongo, ya que éste no es capaz de incorporar nitrógeno a través de la fijación (Djien y Hesseltine, 1979; Blakeman y col. 1988; Paredes-López y Harry, 1988) alcanzándose valores de 21.3% a las 72 hrs.

No se observaron cambios significativos en el contenido de grasa durante el remojo, y remojo-descascarillado-cocido de las muestras con respecto a la triturada. Cuando las muestras se fermentaron se incrementó el contenido alcanzando valores de 11.0 % siendo significativamente diferentes a la muestra original; resultados similares fueron encontrados por Shieh y col. (1982); Blakeman y col. (1988); Khetarpaul y Chauhan (1989).

El contenido de cenizas disminuyó tanto en las muestras remojada, remojada-descascarillada-cocida, como en las muestras fermentadas siendo los valores obtenidos para todos los casos diferentes significativamente en relación a la muestra triturada. Tal vez las limitaciones en la sensibilidad del método impidió que se pudieran cuantificar con precisión el incremento en el contenido de cenizas durante la fermentación. Minerales como fósforo, calcio, magnesio, hierro, cobre, zinc, sodio y potasio se encuentran en concentraciones similares tanto en la cáscara como en el cotiledón a excepción del calcio que se encuentra en una mayor concentración en la cáscara que en el cotiledón (Sankar y Singh, 1981 y Jambunathan y Singh, 1981). Al eliminarse la cáscara se están eliminando estos componentes; resultados similares han sido reportados por Paredes-López y Harry (1988) y Chavan y Kadam (1989).

La fibra cruda contenida en la muestra triturada disminuyó significativamente durante las etapas de remojo, remojo-descascarillado-cocido y durante la fermentación. La concentración inicial de 6.2% disminuyó a 3.9% en el remojo-descascarillado-cocido y

y en las muestras fermentadas 24, 48 y 72 hs hasta 3.5%. La cáscara está constituida principalmente por celulosa y hemicelulosa y en menor proporción por lignina y sustancias pécticas; a estos compuestos se les denomina fibra cruda y constituyen los carbohidratos no digeribles (Singh y col., 1980; Singh, 1984; Chavan y col., 1986). Por lo tanto al eliminar la cáscara se disminuyó el contenido de fibra. Durante la fermentación el desarrollo del hongo no mostro una diferencia significativa directamente relacionada con la fibra cruda tal vez debido a las limitaciones metodológicas.

El consumo de materia seca debida a la fermentación fue del 10% a las 24 hs, de 11.2% y 11.9% a las 48 y 72 h, respectivamente. El hongo requiere de nutrientes para su crecimiento los cuales son proporcionados por el sustrato y convertidos en compuestos volátiles lo que se refleja en una disminución de la materia inicial. Van der Riet y col. (1987) obtuvieron pérdidas del 10% en un período de 72 hs de fermentación; Blackeman y col. (1988) obtuvieron hasta un 30% de pérdida de materia seca. Chavan y Kadam (1989) reportaron que la pérdida de materia seca durante la fermentación depende de la relación sólidos:agua y de la naturaleza de los microorganismos.

2. pH y acidez titulable

La Tabla 9 muestra que el pH inicial de la muestra fue de 5.6 y el de las muestras remojada, y remojada-descascarillada-cocida de 5.9. Debido al remojo ácido era de esperarse que las muestras fueran más ácidas que la muestra original; para explicar lo anterior cabe recordar que después del remojo la muestra es lavada con agua

y en las muestras fermentadas 24, 48 y 72 hs hasta 3.5%. La cáscara está constituida principalmente por celulosa y hemicelulosa y en menor proporción por lignina y sustancias pécticas; a estos compuestos se les denomina fibra cruda y constituyen los carbohidratos no digeribles (Singh y col., 1980; Singh, 1984; Chavan y col., 1986). Por lo tanto al eliminar la cáscara se disminuyó el contenido de fibra. Durante la fermentación el desarrollo del hongo no mostro una diferencia significativa directamente relacionada con la fibra cruda tal vez debido a las limitaciones metodológicas.

El consumo de materia seca debida a la fermentación fue del 10% a las 24 hs. de 11.2% y 11.9% a las 48 y 72 h. respectivamente. El hongo requiere de nutrientes para su crecimiento los cuales son proporcionados por el sustrato y convertidos en compuestos volátiles lo que se refleja en una disminución de la materia inicial. Van der Riet y col. (1987) obtuvieron pérdidas del 10% en un período de 72 hs de fermentación; Blackeman y col. (1988) obtuvieron hasta un 30% de pérdida de materia seca. Chavan y Kadam (1989) reportaron que la pérdida de materia seca durante la fermentación depende de la relación sólidos:agua y de la naturaleza de los microorganismos.

2. pH y acidez titulable

La Tabla 9 muestra que el pH inicial de la muestra fue de 5.6 y el de las muestras remojada, y remojada-descascarillada-cocida de 5.9. Debido al remojo ácido era de esperarse que las muestras fueran más ácidas que la muestra original; para explicar lo anterior cabe recordar que después del remojo la muestra es lavada con agua

Tabla 9. Cambios de pH y acidez titulable en garbanzo fermentado^{1/}

Muestras	pH	% Acidez titulable (como ácido láctico)
Triturada	5.6 ^c	0.07 ^c
Remojada	5.9 ^a	0.03 ^b
RDC ^{2/}	5.9 ^d	0.02 ^a
24HF ^{3/}	3.1 ^a	0.44 ^e
48HF	3.4 ^b	0.42 ^d
72HF	3.4 ^b	0.44 ^e

^{1/} Promedio de tres fermentaciones por triplicado, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

^{2/} RDC = Remojada, descascarillada y cocida a $90^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ por 30 min.

^{3/} HF = Horas de fermentación.

desionizada lo cual va eliminando el ácido de la muestra. El pH a las 24 hs de fermentación fue de 3.1 y a las 48 y 72 hs de 3.4 decrementos que fueron significativos.

La acidez titulable de las muestras triturada, remojada y remojada-descascarillada-cocida fue menor que la de las muestras fermentadas, también fueron significativas estas diferencias. Tanto la disminución de pH como el aumento en la acidez titulable pueden ser explicados como un resultado de la hidrólisis de carbohidratos principalmente, la presencia de ácidos orgánicos, ácidos grasos libres, aminoácidos y péptidos conteniendo extremos carboxílicos los cuales contribuyen a incrementar la concentración de los iones hidrógeno. Los resultados anteriores coinciden con los reportados por Hesselline y Wang, (1967) y Shieh y col. (1982).

3. Proteína verdadera

La Tabla 10 muestra los cambios de proteína verdadera durante la fermentación. Se encontró un 15.3% en la muestra triturada y un 16.3% para la muestra remojada, y remojada-descascarillada-cocida; esta diferencia no fue significativa. Para la muestra fermentada por 24 hs se encontró un valor de 18.5% mientras que para la fermentada a 72 hs un valor de 21.0% teniendo diferencias significativas con respecto a la muestra remojada-descascarillada-cocida. El incremento en la proteína verdadera durante la fermentación se debió probablemente a la actividad metabólica del hongo como la producción de CO₂, compuestos volátiles e hidrólisis del almidón entre otros.

Tabla 10. Cambios en la proteína durante la fermentación^{1/}

Muestra	Proteína total g/100g	Proteína verdadera de muestra seca
Triturada	16.0 ^a	15.3 ^a
Remojada	17.5 ^b	16.3 ^a
RDC ^{2/}	17.5 ^b	16.3 ^a
24HF ^{3/}	19.1 ^c	18.5 ^b
48HF	19.5 ^c	18.8 ^b
72HF	21.3 ^d	21.0 ^c
DMS (0.05)	1.3	1.3

^{1/} Promedio de tres fermentaciones por triplicado, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

^{2/} RDC = Remojada, descascarillada y cocida a 90°C + 2°, por 30 min.

^{3/} HF = Horas de fermentación.

^{4/} DMS = Diferencia mínima significativa.

4. Componentes solubles

Los cambios en la solubilidad de algunos componentes de las muestras durante la fermentación se encuentran en la Tabla 11. Los sólidos solubles en agua en la muestra triturada fueron de 19.2%, para la muestra remojada de 16.8% y para la muestra remojada-descascarillada-cocida de 13.2%, siendo significativas estas diferencias. Steinkraus y col. (1960) y Djien y Hesselline (1979) reportaron que en las leguminosas existen compuestos que evitan que se efectúe una buena fermentación; compuestos que pueden ser disminuidos o eliminados durante los procesos de remojo y cocción debido al fenómeno de lixiviación que se presenta. Durante la fermentación se incrementó la solubilidad alcanzando concentraciones de 62.0% a las 72 hs de fermentación siendo significativa esta diferencia con respecto a la muestra original. La hidrólisis de moléculas grandes en compuestos más pequeños durante la fermentación causa el incremento de los sólidos solubles en agua. Resultados similares fueron encontrados por Soni y Sandhu (1989).

La proteína soluble en agua de las muestras remojada y remojada- descascarillada-cocida fue de 2.7% siendo este valor significativamente diferente con respecto a la muestra triturada. A las 24 hs de fermentación se encontró un valor de 6.1% y a las 48 y 72 hs un 9.7% y 13.1% respectivamente, siendo estos valores diferentes significativamente con respecto a la muestra remojada-descascarillada-cocida. Esto significa que la solubilidad de la proteína se incrementó 2.3, 3.6 y 4.9 veces por efecto de la fermentación durante las 24, 48 y 72 hs respectivamente. *R. oligosporus* produce proteasas que digieren las proteínas durante la fermentación manifestándose como una acumulación de péptidos y aminoácidos libres (Beuchal, 1978). Resultados

Tabla 11. Cambios en la solubilidad de sólidos, proteína y carbohidratos durante la fermentación de garbanzo^{1/}

Muestra	Sólidos solubles	Proteína soluble	Carbohidratos solubles
	en agua	en agua	en etanol
		g/100 g muestra seca	
Triturada	19.2 ^c	1.3 ^a	13.8 ^a
Remojada	16.8 ^b	2.7 ^a	-
RDC ^{2/}	13.2 ^a	2.7 ^a	-
24HF ^{3/}	47.6 ^d	6.1 ^u	16.5 ^b
48HF	57.5 ^e	9.7 ^c	17.2 ^b
72HF	62.0 ^f	13.1 ^d	18.4 ^{bc}
DMS (0.05) ^{4/}	0.2	1.7	1.5

^{1/} Promedio de tres fermentaciones por triplicado, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

^{2/} RDC = Remojada, descascarillada y cocida a $90^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 30 min. ^

^{3/} HF = Horas de fermentación.

^{4/} DMS = Diferencia mínima significativa.

similares a los obtenidos fueron reportados por Njoku y Okemadu (1989) y Paredes-López y Harry (1988).

El análisis de carbohidratos solubles en etanol presentó un 13.8% en la muestra triturada, 16.5%, 17.2% y 18.4% para las muestras fermentada a 24, 48 y 72 hs respectivamente; siendo significativamente diferentes. Los carbohidratos particularmente el almidón y los azúcares solubles son los principales sustratos para la fermentación. Una degradación en el almidón debido a las amilasas producidas por *R. oligosporus* incrementa la solubilidad de los carbohidratos durante la fermentación. Resultados similares fueron encontrados por Garg y Doelle (1989) y Njoku y Okemadu (1989).

En la proteína verdadera también se observó un incremento significativo por efecto de la fermentación, lo que de alguna manera corresponde con los incrementos observados en el contenido de proteína total. La Tabla 12 muestra las diferentes soluciones a diferentes pH utilizadas para la extracción de proteínas durante las diferentes etapas de la fermentación.

Las proteínas del garbanzo al igual que las de otras leguminosas están formadas por globulinas principalmente (56%) seguidas de glutelinas (18%) y albúminas (12%) con muy pequeñas cantidades de prolaminas (Chavan y col., 1986). La muestra triturada mostró una mayor solubilidad de proteína a pH alcalino (10.15) encontrándose valores de 93%, a pH ligeramente alcalino (8.3 y 7.3) la solubilidad disminuyó y a pH ácidos la solubilidad fue mínima alcanzando eficiencias del 20 al 40%. Lo anterior corresponde con lo reportado por Salhe y Salunkhe (1981) y Mohamed y col. (1989) pues ellos observaron que a pH ácido la solubilidad de la proteína era mínima y conforme se

Tabla 12. Extracción de proteínas con diferentes soluciones y pH de garbanzo antes y después de la fermentación^{1/}.
(g Proteína/100g proteína verdadera)

Solución	pH	Muestras			
		Triturada	RDC ^{2/}	24HF ^{3/}	48HF
Agua alcalinizada	10.15	8	17	33	52
Na ₂ CO ₃ + Tris - HCl	10.15	93	58	36	39
Na ₂ CO ₃	10.15	82	62	42	32
Regulador de boratos	8.30	69	46	38	-
NaCl + Tris - HCl	7.30	75	52	26	-
Tris - HCl	7.30	70	58	27	16
Tris - HCl	5.30	33	8	6	10
Na ₂ CO ₃ + Tris - HCl	5.30	40	14	10	16
NaCl + Tris - HCl	3.13	20	8	6	5

^{1/} Promedio de tres fermentaciones por triplicado.

^{2/} Remojada, descascarillada y cocida a 90°C ± 2°, por 30 min.

^{3/} HF = Horas de fermentación.

neutralizaba o alcalinizaba el pH la solubilidad se incrementaba. La muestra triturada mostró poca solubilidad cuando las proteínas se extrajeron con agua alcalinizada, sin embargo cuando la extracción se realizó con soluciones acuosas de Na_2CO_3 +Tris-HCl, Na_2CO_3 , regulador de boratos, NaCl+Tris-HCl y Tris-HCl a pH alcalino o casi neutro (10.15 a 7.3 respectivamente) la eficiencia en la extracción mejoró significativamente.

El garbanzo contiene en mayor proporción globulinas las cuales son más solubles en presencia de sales (Chavan y col., 1986).

Salhe y Salunkhe (1981), Snow y Brooks (1989) y Salhe y col. (1984) recomiendan el uso de las sales empleadas en este estudio para la extracción de proteínas en varias leguminosas y cereales. En la muestra triturada se observó la mayor eficiencia de extracción de la proteína en presencia de Na_2CO_3 +Tris-HCl a pH 10.15; una menor eficiencia cuando se emplearon regulador de boratos a pH 8.3 y Tris-HCl a pH de 7.3; la mínima eficiencia de extracción se observó con NaCl+Tris-HCl a pH de 3.13.

La muestra remojada-descascarillada-cocida al igual que la muestra triturada mostró muy baja solubilidad en agua alcalinizada a pH de 10.15. Con Na_2CO_3 a pH de 10.15 se obtuvo la máxima eficiencia de extracción. Con Na_2CO_3 +Tris-HCl a 10.15 y Tris-HCl a pH 7.3 se obtuvo 58% de eficiencia de extracción; la extracción más baja se obtuvo con NaCl+Tris-HCl a pH de 3.13. Las mejores condiciones de extracción para la muestra remojada-descascarillada-cocida fue utilizando Na_2CO_3 a pH de 10.15. Para la muestra fermentada 24 hs se encontró una mayor solubilidad a pH de 10.15 con una solución de Na_2CO_3 ; a pH menores (3.13 y 5.3) la eficiencia en la extracción disminuyó. Las condiciones de extracción óptimas corresponden con las de la muestra

remojada-descascarillada-cocida. La muestra fermentada 48 hs mostró una máxima extracción de 52% con agua alcalinizada a pH 10.15. A pH cercano a la neutralidad (7.3) o francamente ácidos (3.13 y 5.3) la eficiencia fue mínima de 5%. En general se pudo observar que la máxima eficiencia de extracción se logró a pH de 10.15. Sin embargo, no se observó una tendencia para todas las muestras debido a la presencia de una sal en particular. Kumar y Venkataraman, (1980) reportaron que a pH muy ácido o muy alcalino (2 y 10) se facilitaba la extracción de proteínas en garbanzo. En este estudio el comportamiento fue diferente pues la muestra triturada presentó una alta extracción con respecto a las muestras fermentadas. Es evidente que durante los procesos de remojo, cocido y fermentado las proteínas sufren cambios en sus propiedades de solubilización.

5. Actividad de proteasas

La Tabla 13 muestra los resultados de la actividad proteolítica durante la fermentación. A un pH ácido se encontró que las muestras se comportaban de la siguiente manera: en la muestra triturada con 2.7 unidades totales de actividad, en la remojada y en la remojada-descascarillada-cocida con 1.0 unidades totales de actividad, presentaron diferencia significativa; mientras que en la fermentación a las 24, 48 y 72 hs con 4.2, 4.8 y 6.7 unidades totales de actividad respectivamente, fueron significativamente diferentes con respecto a las anteriores. A un pH básico se encontró que las muestras se comportaban de la siguiente manera: en la muestra triturada con 10.2 unidades totales de actividad, en la remojada y en la remojada-descascarillada-cocida 3.0 y 2.5 unidades totales de actividad respectivamente, presentando diferencia significativa con respecto a la triturada; mientras que en la fermentación a las 24, 48 y

Tabla 13. Actividad de proteasas durante la fermentación de garbanzo^{1/}

Muestras	Unidades totales de actividad	
	pH Acido (2.5)	pH Alcalino (8.0)
Triturada	2.7 ^b	10.2 ^b
Remojada	1.0 ^a	3.0 ^a
RDC ^{2/}	1.0 ^a	2.5 ^a
24HF ^{3/}	4.2 ^c	8.4 ^b
48HF	4.8 ^d	17.7 ^c
72HF	6.7 ^e	22.4 ^d

^{1/} Promedio de tres fermentaciones por triplicado, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

^{2/} Remojada, descascarillada y cocida a 90°C ± 2°C por 30 min.

^{3/} HF = Horas de fermentación.

72 hs presentaron 8.4, 17.7 y 22.4 unidades totales de actividad respectivamente, siendo significativamente diferentes con respecto a la remojada-descascarillada-cocida. La actividad de proteasas se incrementó durante la fermentación observándose mayor actividad a pH alcalino que a pH ácido. Actualmente se tiene poca información acerca de las enzimas degradativas e hidrolíticas responsables del mejoramiento nutricional en los alimentos fermentados. Los resultados coinciden con lo reportado por Njoku y Okemadu (1989).

6. Actividad de peroxidasas

La Tabla 14 muestra el comportamiento de peroxidasas durante la fermentación. A la muestra triturada correspondió un 100% de actividad relativa, la muestra remojada y remojada-descascarillada y cocida conservaron un 0.57% de actividad relativa siendo significativamente diferentes con respecto a la triturada; esto puede ser un indicador de la termolabilidad de las peroxidasas presentes en el sustrato. Hemeda y Klein (1990) reportaron la actividad original de peroxidasas en tres extractos crudos de vegetales lo que coincide con la actividad encontrada en la muestra triturada. En las muestras fermentadas 24, 48 y 72 hs se encontraron valores de actividad relativa de 9.77, 15.52 y 21.26 respectivamente, lo que indicó la posible síntesis de peroxidasas por el hongo. Pütter (1974) reportó la presencia de peroxidasas en tejidos animales, plantas superiores (rábano, piña, papas, leguminosas, maíz y plantas de tabaco), levaduras, hongos y bacterias.

Tabla 14. Comportamiento de peroxididasas durante la fermentación^{1/}

Muestra	Actividad relativa %
Triturada	100 ^e
Remojada	0.57 ^a
RDC ^{2/}	0.57 ^a
24HF ^{3/}	9.77 ^b
48HF	15.52 ^c
72HF	21.26 ^d

^{1/} Promedio de tres fermentaciones por triplicado, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

^{2/} RDC = Remojada, descascarillada y cocida a $90^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 30 min.

^{3/} HF = Horas de fermentación.

7. Acidos grasos totales

El perfil de los principales ácidos grasos del garbanzo variedad Carrel-145 fue estudiado bajo las siguientes condiciones: muestra triturada, remojada-descascarillada-cocida, y fermentada por 24, 48 y 72 hs. Como se observa en la Tabla 15, para la muestra triturada los ácidos linoleico y oleico son los principales ácidos grasos insaturados, mientras que el palmítico es el principal ácido graso saturado. Los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico mostraron tres fases muy características durante la fermentación. En la muestra fermentada a 24 hs se presentó la primera fase que correspondió al crecimiento microbiano presentando lipólisis y por lo tanto una disminución en los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico con respecto a la muestra remojada-descascarillada-cocida; resultando un producto con características aceptables. A las 48 hs de fermentación se presentó la segunda fase (de transición) en donde se observó un crecimiento en los ácidos grasos mencionados anteriormente con respecto a la muestra fermentada 24 hs coincidiendo con un crecimiento microbiano y conservando las características organolépticas al producto. Finalmente a las 72 hs de fermentación se presentó una tercera etapa observándose nuevamente la disminución en la concentración de los ácidos a que se está haciendo referencia. Este comportamiento fue similar al reportado por Sudarmadji y Markakis (1978).

8. Valor de peróxido

Para conocer el grado de rancidez de las diferentes muestras de garbanzo, se realizó la determinación de valor de peróxido y cuyos resultados se presentan en la Tabla 16. La muestra triturada mostró un valor de 1.0 meq/Kg de muestra seca y un valor de 20.0

Tabla 15. Cambios en los ácidos grasos de garbanzo fermentado^{1/}

Acido graso	M U E S T R A S					DMS ^{4/} (0.05)
	Triturada	RDC ^{2/}	24HF ^{3/}	48HF	72HF	
	mg/100g de muestra seca					
Palmítico C ₁₆	52.5 ^b	63.3 ^c	27.2 ^a	123.5 ^e	90.4 ^d	4.2
Esteárico C ₁₈	5.8 ^a	10.3 ^b	7.4 ^a	23.4 ^d	13.6 ^c	1.3
Oleico C _{18:1}	110.2 ^b	127.2 ^c	28.0 ^a	287.8 ^e	193.3 ^d	8.6
Linoleico C _{18:2}	232.7 ^c	215.8 ^b	120.9 ^a	773.5 ^e	570.6 ^d	49.3
Linolénico C _{18:3}	13.0 ^{bc}	4.8 ^a	11.7 ^b	12.4 ^{bc}	15.2 ^c	1.8
Araquídico C ₂₀	Trazas	Trazas	Trazas	Trazas	Trazas	-
Behénico C ₂₂	1.0 ^a	1.7 ^a	1.3 ^a	5.1 ^b	4.2 ^b	1.1

^{1/} Promedio de tres fermentaciones por triplicado, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

^{2/} RDC = Remojada, descascarillada y cocida a $90^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 30 min.

^{3/} HF = Horas de fermentación.

^{4/} DMS = Diferencia mínima significativa.

Tabla 16. Comportamiento del valor de peróxidos en garbanzo fermentado^{1/}

Muestra	valor de peróxido (meq/Kg muestra seca)
Triturada	81.0 ^e
RDC ^{2/}	20.0 ^d
24HF ^{3/}	18.0 ^c
48HF	7.8 ^b
72HF	1.0 ^a
DMS (0.05)	3.3

^{1/} Promedio de tres fermentaciones por triplicado, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

^{2/} RDC = Remojada, descascarillada y cocida a $90^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$, por 30 min.

^{3/} DMS = Diferencia mínima significativa.

meq/Kg de muestra seca para la muestra remojada-descascarillada-cocida; las muestras fermentadas 24, 48 y 72 hs mostraron valores de 18.0, 7.8 y 1.0 meq/Kg de muestra seca, respectivamente. Estos valores reflejan las características organolépticas de las muestras. Para la muestra triturada no se percibió sensorialmente un olor a rancidez. La muestra remojada-descascarillada-cocida presentó un alto grado de rancidez; posiblemente por la transformación de los ácidos grasos insaturados a compuestos más sencillos como metil-oxo-nanoato y propanal entre otros; debido a la aplicación de temperatura, sin embargo, a medida que fue avanzando la fermentación, el grado de rancidez fue disminuyendo, coincidiendo con lo reportado por Frankel (1991). Esto sugiere que *Rhizopus oligosporus* podría producir un antioxidante que retarda la interacción; sin embargo se requiere de mayores investigaciones acerca de la actividad antioxidante de productos fermentados. Cabe mencionar que los tocoferoles son antioxidantes naturales efectivos en muchos alimentos y han sido probados en jamón, mantequilla, tocino y manteca de cerdo, entre otros (Kanner y col., 1986).

9. Taninos

En la Tabla 17 se observa que la muestra triturada tuvo una mayor concentración de taninos que el resto de las muestras, siendo de 400 mg/100 g de muestra seca. Las muestras remojada, remojada-descascarillada-cocida así como las fermentadas mostraron un valor de 20 mg/100 g de muestra seca. Las leguminosas normalmente contienen taninos los cuales interaccionan con las proteínas formando complejos y disminuyendo la digestibilidad y su solubilidad. También se ha reportado que los

Tabla 17. Contenido de taninos en muestras
de garbanzo fermentado^{1/}

Muestra	mg/100g de muestra seca
Triturada	400 ^b
Remojada	20 ^a
RDC ^{2/}	20 ^a
24HF ^{3/}	20 ^a
48HF	20 ^a
72HF	20 ^a
DMS (0.05)	12

^{1/} Promedio de tres fermentaciones por triplicado, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

^{2/} RDC = Remojada, descascarillada y cocida a $90^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$, por 30 min.

^{3/} HF = Horas de fermentación.

^{4/} DMS = Diferencia mínima significativa.

taninos disminuyen la disponibilidad de vitaminas y minerales (Reddy y col., 1985; Prasad, 1990). La semilla completa contiene de 78 a 272 mg, mientras que los cotiledones contienen de 16 a 38 mg/100 g de muestra seca (Chavan y col., 1986). La mayor cantidad de taninos se encuentran localizados en la cáscara. Las diferencias en el color de la cáscara parece estar relacionada con la variación en el contenido de polifenoles. Procesos como: remojo, descascarillado, cocido y germinado reducen considerablemente la cantidad de taninos; el aparente decremento en polifenoles puede deberse al fenómeno de lixiviación y solubilidad de éstos, ya que a temperaturas elevadas la solubilidad es mayor (Reddy y col., 1985). Barroga y col. (1985) reportaron que durante el remojo en agua, ésta puede proveer un medio ambiente favorable para que las interacciones proteína-tanino se incrementen promoviendo la formación de complejos insolubles. Prasad (1990) observó que con solventes orgánicos la extracción de polifenoles era muy pobre y que con mezclas de solventes orgánicos con agua se mejoraba. Posiblemente el debilitamiento de los puentes de hidrógeno así como el incremento en la alcalinidad del medio y la ionización de los compuestos polifenólicos facilitaban este fenómeno. Los resultados obtenidos en este estudio corresponden con la disminución observada durante el remojo y remojo descascarillado y cocido. Kheterpaul y Chauhan (1991) encontraron que la fermentación natural de mijo perlado a 30°C no redujo el contenido de polifenoles. Resultados similares fueron obtenidos en este estudio ya que durante la fermentación no hubo disminución en el contenido de taninos; el decremento de estos compuestos se presentó, como se indicó antes, en la parte del procedimiento previa la fermentación. Probablemente la formación de complejos insolubles y una baja reactividad de los taninos impidan al hongo actuar sobre ellos.

10. Digestibilidad *in vitro*

Existe mucha variación en los valores de digestibilidad reportados lo que quizá sugiere, entre otros aspectos, una diversidad genética en cuanto a la calidad de la proteína existente en el garbanzo (Chavan y col. 1986). Los resultados encontrados en este estudio se encuentran reportados en la Tabla 18. La digestibilidad de todas las muestras fue significativamente diferente. La muestra triturada mostró un 73% de digestibilidad. Jood y col. (1989) reportaron digestibilidades *in vitro* de 48 a 53% para diferentes variedades de garbanzo. Laurena y col. (1991) reportaron digestibilidades *in vitro* de 70.18 a 78.57% para algunas leguminosas de Filipinas, las cuales son muy semejantes a las obtenidas en este estudio.

En general la proteína de las leguminosas es difícil de digerir y causa desórdenes estomacales cuando se consumen; se desconoce si los efectos son debidos a una rápida descarga de las proteínas en el intestino o a una resistencia a la hidrólisis proteica por las enzimas gastrointestinales. Otros factores implicados en la baja digestibilidad de las proteínas son la presencia de factores antinutricionales como polifenoles e inhibidores de proteasas. En las muestras remojada y remojada-descazarillada-cocida se encontraron valores de digestibilidad de 82 y 85% respectivamente. Esto sugiere que tanto el remojo como la cocción eliminan algunos factores antinutricionales pudiendo influir en la digestibilidad de las proteínas de leguminosas (Jood y col., 1989; Khelarpaul y Chauhan, 1990; Laurena y col., 1991). Durante la fermentación se obtuvieron valores de digestibilidad de 74 a 71% entre las 24 y 72 hs. Estos valores posiblemente se explican debido a que el hongo tuvo una gran actividad proteolítica durante la fermentación, por lo tanto las proteínas ya alcanzaron los niveles máximos de degradación no observándose un incremento muy

Tabla 18. Digestibilidad "in vitro" de garbanzo fermentado^{1/}.

Muestras	% Digestibilidad
Triturada	73 ^c
Remojada	82 ^e
RDC ^{2/}	85 ^f
24HF ^{3/}	74 ^d
48HF	72 ^b
72HF	71 ^a

^{1/} Promedio de tres fermentaciones por triplicado, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

^{2/} Remojada, descascarillada y cocida a $90^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$, por 30 min.

^{3/} HF = Horas de fermentación.

marcado con respecto a la triturada. Fernández y Berry (1988) encontraron una disminución en la digestibilidad *in vitro* de garbanzo conforme transcurrió el tiempo de germinación, sin embargo los valores de retención de eficiencia proteica y la utilización neta de proteína se incrementaron. Prasad (1990) encontró diferencias cuando agregaba una enzima o una mezcla de dos enzimas en los valores de digestibilidad *in vitro* para la misma muestra de girasol. En cualquier caso, sería deseable efectuar pruebas *in vivo* para conocer mejor las razones del comportamiento observado.

E. Efecto de la fermentación sobre el color del garbanzo

Durante la fermentación se observaron cambios de color Hunter en las muestras, lo anterior se presenta numéricamente en la Tabla 19. La muestra triturada no mostró diferencia significativa con respecto al resto de las demás en el valor Hunter "L" (luminosidad), es decir tuvieron tendencia al blanco y al valor del estándar de 91.2. El valor Hunter "a" de la triturada fue diferente significativamente con respecto a las otras. Lo anterior se debe a que la muestra triturada presentó pigmentos en la cáscara que oscilaban del anaranjado al café dando como resultado un oscurecimiento en ella, y también presentó una ligera tendencia al color verde.

En el remojo y remojo-descascarillado-cocido se eliminó la cáscara por lo que ambas muestras fueron diferentes significativamente con respecto a la triturada. Estas muestras presentaron una tendencia mayor respecto a la anterior al color verde. La muestra fermentada 24 hs mostró diferencia significativa con respecto a las tres

Tabla 19. Cambios en el color Hunter durante la fermentación de garbanzo^{1/}

Muestra	L ^{2/}	a ^{2/}	b ^{2/}	ΔC ^{2/}	ΔE ^{2/}
Triturada	77.8 ^a	-0.55 ^{ab}	22.2 ^d	23.9 ^f	27.4 ^f
Remojada	80.0 ^a	-1.26 ^c	12.8 ^a	14.5 ^a	18.3 ^a
RDC ^{3/}	80.2 ^a	-1.3 ^c	13.3 ^{ab}	15.0 ^b	18.6 ^b
24HF ^{4/}	78.8 ^a	-1.02 ^{bc}	16.8 ^c	18.5 ^d	22.3 ^d
48HF	78.7 ^a	-0.53 ^a	16.5 ^{bc}	18.2 ^c	22.1 ^c
72HF	75.4 ^a	-0.50 ^a	19.7 ^{cd}	21.4 ^e	26.6 ^e
DMS (0.05) ^{5/}	5.0	0.1	0.2	0.1	0.1

^{1/} Promedio de tres fermentaciones por triplicado, los valores con la misma letra no son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

$$\frac{2/}{L} = 91.21; a = 0.1; b = -1.7; \Delta C = \sqrt{[(ae-am)^2 + (be-bm)^2]}; \Delta E = (Le-Lm)^2 + (ae-am)^2 + (be-bm)^2 \frac{1}{2}$$

^{3/} RDC = Remojada, descascarillada y cocida a 90°C ± 2° por 30 min.

^{4/} HF = Horas de fermentación.

^{5/} DMS = Diferencia mínima significativa.

muestras anteriores y con respecto a las fermentadas 48 y 72 hs. La tendencia para ellas fue un ligero desplazamiento hacia el color rojo. El valor Hunter "b" de la muestra triturada fue diferente con respecto a las demás: presentó una fuerte tendencia hacia el color amarillo. La muestra remojada y remojada-descascarillada-cocida al eliminarles la cáscara presentaron valores con tendencia hacia el azul siendo diferentes significativamente con respecto a las muestras fermentadas. Durante la fermentación las muestras presentaron diferencias significativas entre sí pero con una tendencia mayor hacia el color amarillo. La diferencia de cromaticidad (ΔC) presentó diferencias significativas entre las muestras: la muestra triturada presentó la diferencia mayor, seguida de la fermentada 72 hs. Tanto la muestra triturada como fermentada presentaron coloraciones oscuras debido a la presencia de cáscara o inicio de esporulación del hongo por lo que la diferencia en el color fue mayor. Las muestras remojada y remojada-descascarillada-cocida presentaron valores menores en la diferencia de color que las muestras fermentadas 24 y 48 hs; durante la fermentación el crecimiento del hongo se manifestó por la presencia de color blanco sobre la superficie de los cotiledones lo que incrementó la diferencia en el color con respecto a las muestras remojada y remojada-descascarillada-cocida pues éstas presentaron una mayor tendencia hacia el color amarillo. En general se pudo observar que las muestras presentaron colores con tendencia hacia el amarillo. El cambio de cromaticidad es importante ya que el consumidor, en el primer contacto con los alimentos, juzga primeramente por su apariencia y después por su textura y sabor. El valor ΔE refleja la relación entre los valores de luminosidad y color; las muestras mostraron diferencias significativas entre sí con valores ligeramente superiores al ΔC pero con tendencia muy similar, lo que indica que el cambio en el color total de la muestra triturada y fermentada a las 72 hs fue mayor que el que presentaron las muestras fermentadas 24 y 48 hs. Las muestras remojada y remojada-descascarillada-cocida mostraron los

valores más bajos que el resto de las muestras pudiéndose observar que la luminosidad tuvo un ligero efecto en el valor ΔE . Las muestras fermentadas presentaron colores ligeramente más claros que la muestra original sin que se afectaran las características de aceptabilidad del consumidor puesto que la mayoría de los alimentos, tanto en forma natural como procesada, tiene un color característico y bien definido por el cual el consumidor los identifica y acepta.

F. Estudios microscópicos del crecimiento del hongo sobre el sustrato

En la Figura 7 se presenta el crecimiento del hongo sobre el sustrato en la superficie de la muestra fermentada por 24 hs y el entrecruzamiento de las hifas con los cotiledones, lo que le da a la muestra un aspecto compacto y blanquecino.

Como ha reportado Jurus y Sundberg (1976), la penetración del hongo es de la superficie hacia el centro del cotiledón explicando parcialmente los cambios físicoquímicos que ocurren durante la fermentación. En la Figura 8 se observan cortes transversales en diferentes etapas de la fermentación. En la Figura 8a se tiene la muestra triturada en la cual sus estructuras aparecen integras observándose la parte almidonosa rodeada de proteínas. En la Figura 8b se muestra un corte transversal de una muestra remojada-descascarillada-cocida, pudiéndose observar un cambio en la textura de la muestra y una organización diferente. En la Figura 8c se trata de un corte transversal de una muestra fermentada por 48 hs; aquí se pudo observar el crecimiento del hongo entre los cotiledones así como su penetración en el sustrato formando una masa compacta de textura agradable y color blanco. En la Figura 8d se muestra el



Figura 7. Microfotografía electrónica de barrido (MEB) del crecimiento del hongo sobre el sustrato

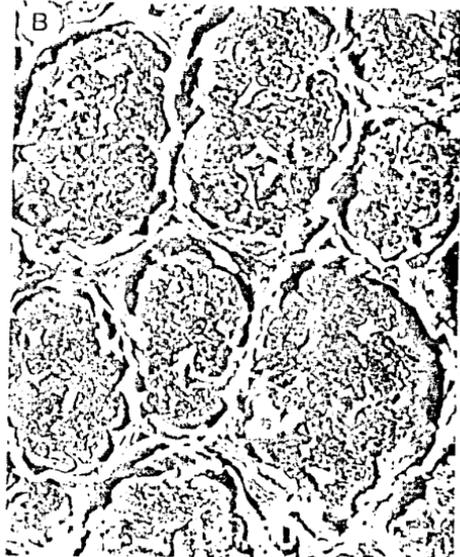


Figura 8. Microfotografía electrónica de barrido (MEB) de cortes transversales de muestras de garbanzo fermentado.

crecimiento del hongo sobre la superficie de los colledones y el crecimiento de las hitas intracelularmente.

En la Figura 9 se aprecia el crecimiento del hongo sobre el sustrato observándose algunas de las estructuras microscópicas características como son las hitas y el cuerpo reproductor con esporas. Esta estructura correspondió con la estructura observada en el inóculo comprobándose que la fermentación se realizó con hongo *Rhizopus oligosporus*.

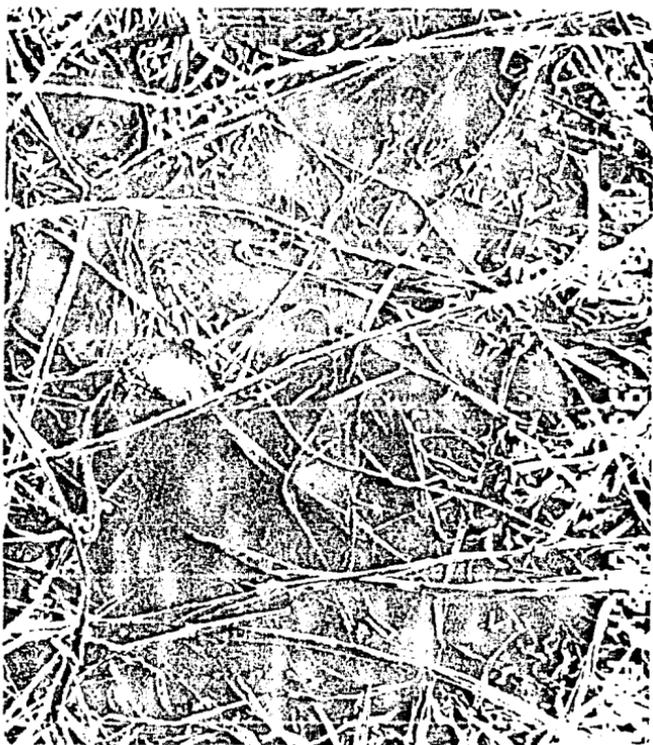


Figura 9. Microfotografía electrónica de barrido (MEB) de características estructurales de Rhizopus oligosporus.

VI. CONCLUSIONES GENERALES

A. Procedimiento mediante fermentación sólida que permite el aprovechamiento de garbanzo de baja calidad comercial.

La muestra triturada se remojó durante 16 hs en un medio ácido, la eliminación de la cáscara se hizo friccionando los granos manualmente y separando las cáscaras por flotación en agua. El descascarillado eliminó la coloración oscura e irregular de la muestra original obteniendo un sustrato más claro y accesible al ataque del hongo. Los productos fermentados 24 y 48 hs presentaron coloraciones más claras con respecto a la muestra original.

El pH del agua de remojo debe de ser lo suficientemente ácido (3.1) para evitar la contaminación bacteriana y permitir el crecimiento del hongo a partir de un sustrato ligeramente ácido.

La cocción a $90 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 30 min permitió un crecimiento adecuado del hongo lo cual produjo cambios importantes en la composición y solubilidad del sustrato.

La densidad del inóculo fue de 1×10^6 esporas/ml de suspensión y se adicionaron 5 ml de esta suspensión por cada 200 g de sustrato. El volumen de inóculo así como el grosor de aproximadamente 1 cm del sustrato permitió el crecimiento adecuado del hongo y limitó el crecimiento bacteriano lo cual favoreció la obtención de un producto fermentado con características homogéneas y reproducibles para este estudio.

Las bolsas de plástico con perforaciones resultaron adecuadas para preparar diferentes cantidades de producto con características deseables, además se trata de un material de bajo costo y disponible en el mercado.

Después de probar con diferentes temperaturas y tiempos para que se llevara a cabo la fermentación, se encontró que la temperatura de crecimiento más conveniente, fue de 37°C y con un período de fermentación de 48 hs.

Este sustrato resulta ser un medio de cultivo de bajo costo relativo al cual no hay que adicionarle ningún otro factor de crecimiento.

B. Efecto de la fermentación en el crecimiento microbiano

Las condiciones asépticas en las cuales se preparó el sustrato y la inoculación permitieron el crecimiento adecuado del hongo y limitaron el desarrollo bacteriano. El producto obtenido no presentó crecimiento bacteriano con riesgos sanitarios dado que fue un producto con cuenta de bacterias mesofílicas bajas y no se detectaron bacterias coliformes ni *Salmonella* de donde se deduce una buena calidad sanitaria.

C. Efecto de la fermentación sobre la composición y el valor nutritivo del garbanzo

La fermentación produjo un aumento en las concentraciones de proteína total, proteína verdadera y grasa, mientras que redujo las concentraciones de carbohidratos, ceniza y

fibra cruda. La solubilidad de proteína en agua y agua alcalinizada, solubilidad de carbohidratos en etanol y acidez titulable aumentaron significativamente durante la fermentación.

El hongo durante su crecimiento consumió ácidos grasos no saturados. Sin embargo, a las 48 hs de fermentación se incrementaron los niveles de ácidos grasos como el behénico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico y en cantidades menores el linolénico.

El remojado-descascarillado-cocido disminuyó los niveles de taninos lo que implica un mejoramiento del valor nutricional. La digestibilidad de la proteína *in vitro* aumentó en las primeras etapas del proceso de fermentación; sin embargo, durante la fermentación se mantuvieron los niveles originales.

D. Efecto de la fermentación sobre el color del garbanzo

Se observó que durante el remojo y remojo-descascarillado-cocido el color de la muestra se hizo un poco más claro; a lo largo de la fermentación los valores de DC y DE disminuyeron ligeramente pero el color se mantuvo con características deseables.

E. Estudios microscópicos del crecimiento del hongo sobre el sustrato

Se observó que el garbanzo es un sustrato adecuado para el crecimiento y esporulación del hongo dado que las estructuras microscópicas del hongo inoculado corresponden con la estructura observada sobre el sustrato.

A partir de estas investigaciones preliminares es posible sugerir el empleo de garbanzo porquero de baja calidad comercial el cual es susceptible de ser transformado mediante fermentación en el estado sólido en un producto con características básicas adecuadas para ser empleado principalmente en la alimentación humana. Sin embargo, debe enfatizarse que estas investigaciones preliminares deben ser continuadas a objeto de conocer con mayor detalle los aspectos que no fueron cubiertos en este trabajo.

VII. APORTACIONES ORIGINALES DE ESTE TRABAJO AL CONOCIMIENTO CIENTIFICO

- Se elaboró un producto fermentado a partir de garbanzo de baja calidad comercial.
- Se desarrolló un método sencillo para la eliminación del color obscuro de la cáscara.
- Se evaluó el efecto de la fermentación por *Blizopus oligosporus* sobre la proteína, sólidos totales, grasa y taninos.
- Se observaron aumentos en la concentración de proteína y grasa en el garbanzo debido al consumo de carbohidratos por el hongo así como por la eliminación de la cáscara.
- Se investigaron los cambios en carbohidratos solubles en etanol, actividad acuosa, valor de peróxidos, actividad de proteasas y solubilidad de proteínas: factores que no habían sido evaluados anteriormente en este tipo de fermentación.

jgo

Bibliografía

- AACC. 1983. Approved Methods. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.
- Andrade, E. 1981. Guía para cultivar garbanzo blanco de exportación de riego en el centro y sur de centro y sur de Guanajuato. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Folleto para productores. 1:2-15.
- Andrade, E. 1989. Carreta-145 variedad de garbanzo porquero de riego para el centro y sur de Guanajuato. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Folleto técnico. 7:3-11.
- Andrade, E. 1983. Guía para cultivar garbanzo porquero de riego en Guanajuato. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Folleto para productores. 24:2-13.
- Andrews, G. 1990. Large-scale bioprocessing of solids. Biotechnology Progress. 6:225-230.
- Anson. 1981. Trypsin. En: Methods of enzymatic analysis. H. U. Bergmeyer (Ed). p.1013-1021. Verlag Chemie International, Deerfield Beach, Florida.
- AOAC. 1984. Official Methods of Analysis. 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Ashenafi, M. y Busse, M. 1991. Production of tempeh from various indigenous ethiopian beans. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 7:72-79.
- Bannon, C.D., Breen, G.J., Craske, J.D., Hai, N.T., Harper, N.L. y O'Rourke, K.L. 1982a. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. III. Literature review and investigations into development of rapid procedures for

the methoxide-catalysed methanolysis of fats and oils. *Journal of Chromatography*. 247:71-89.

Bannon, C. D., Craske, J. D., Hai, N. T., Harper, N. L. y O'Rourke, K. L. 1982b. Analysis of fatty acid methylesters with high accuracy and reliability. II. Methylation of fats and oils with boron trifluoride methanol. *Journal of Chromatography*. 247:83-89.

Bannon, C. D., Craske, J. D. y Hillier, A. E. 1985. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. IV. Fats with fatty acids containing four or more carbon atoms. *Journal of the American Oil Chemist's Society*. 62:1501-1507.

Barroga, Ch. F., Laurena, A. C. y Mendoza, E. M. T. 1985. Polyphenols in mung bean (*Vigna radiata* L.): Determination and removal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 33:1006-1009.

Beuchat, L. R. 1976. Fungal fermentation of peanut press cake. *Economic Botany*. 30:227-234.

Beuchat, L. R. 1978. Traditional fermented food products. En *Food and beverage micology*, L. R. Beuchat (Ed). p.224-253. AVI Publishing Co. Inc., Westport, CT.

Blakeman, J. P., Mc. Cracken, A. R. y Seaby, D. A. 1988. Changes brought about in solid substrates after fermentations of mixtures of cereals and pulses with *Rhizopus oryzae*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 45:109-118.

Bulgarelli, M. A. y Beuchat, L. R. 1990. Functional properties of cowpea paste as influenced by indigenous microflora. *Journal of Food Science*. 55:146-150.

- Chavan, J. K. y Kadam, S. S. 1989. Nutritional improvement of cereals by fermentation. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 28:349-400.
- Chavan, J. K., Kadam, S. S., y Salunkhe, D. K. 1988. Biochemistry and technology of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 25:107-158.
- Chen, T. y Ho, Ch. 1989. Past, present and future of chinese fermented food products. Food Reviews International. 5:177-208.
- Cochet, N., Nonus, M. y Lebeault, J. M. 1988. Solid-State fermentation of sugar-beet. Biotechnology Letters. 10:491-496.
- Corry, J. E. L. 1978. Relationships of water activity to fungal growth. En: Food and beverage mycology. L. R. Beuchat (Ed). p. 45-82. AVI Publishing Co. Inc., Westport, CT.
- Deshpande, S. S. y Cheryan, M. 1984. Preparation and antinutritional characteristics of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrates. Plant Food for Human Nutrition. 34:185-196.
- Desrosier, N. W. 1977. Elements of Food Technology. En: Food Chemical Technology. N. W. Desrosier (Ed). p.23-87. AVI Publishing Co. Inc., Westport, CT.
- Djien, K. S. y Hesseltine, C.W. 1979. Tempeh and related foods. Economic Microbiology-Microbial Biomass. A. H. Rose (Ed). p. 115-140. Academic Press. Inc., Londres.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Robers, P. A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. 28:350-354.

- Eubine, H. 1989. Industrialization of Japanese miso fermentation. En: Industrialization of Indigenous Fermented Foods. K. H. Steinkraus (Ed). p. 89-126. Marcel Decker, Inc., New York, N. Y.
- Fernández-Escartín, E. 1981. Microbiología Sanitaria. Agua y Alimentos. E. Fernández-Escartín (Ed). Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco.
- Fernández, M. L. y Berry, J. W. 1988. Nutritional evaluation of chickpea flours and germinated chickpea flours. Plant Foods for Human Nutrition. 38:127-134.
- Frankel, E. N. 1991. Review. Recent advances in lipid oxidation. Journal of the Science of Food and Agriculture. 54:495-511.
- Fukushima, D. 1989. Industrialization of fermented soy sauce production centering around Japanese shoyu. Industrialization of Indigenous Fermented Foods. K. H. Steinkraus (Ed). p. 1-88. Marcel Decker, Inc., New York, N.Y.
- Garg, S. K. y Doelle, H. W. 1989. Optimization of cassava starch conversion to glucose by *Rhizopus oligosporus*. MIRCEN Journal. 5:297-305.
- Glenn, D. R. y Rogers, P. L. 1989. Industrialization of indigenous fermented food processes : Biotechnological aspects. En : Industrialization of Indigenous Fermented Foods. K. H. Steinkraus (Ed). p. 411-429. Marcel Decker, Inc., New York, N. Y.
- González, L. M. E. 1990. Caracterización fisicoquímica e implicaciones nutricias de las lectinas de frijol tepari y sus híbridos. Tesis de Doctorado en Biotecnología de Plantas, CIEA del IPN, Unidad Irapuato, Irapuato, Gto.

- Hassid, W. Z. y Neufled, E. S. 1964. Whole starches and modified starches. En: Methods in Carbohydrate Chemistry. R. L. Whistler (Ed). p. 39. Academic Press, Inc., New York, N. Y.
- Hemeda, H. M. y Klein, B. P. 1990. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. Journal of Food Science. 55:184-188, 192.
- Herrera, T. y Ulloa, M. 1970. Aspectos generales sobre la microbiologia del pozol. Revista Latinoamericana de Microbiologia. 12:103-108.
- Hesseltine, C.W. y Wang, H. L. 1967. Traditional fermented foods. Biotechnology and Bioengineering. 9:275-288.
- Hsu, H. W., Vavak, D. L., Satterlee, L. D. y Miller, G. A. 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. Journal of Food Science. 42:1269-1273.
- Hwang, K. T. y Regenstein, J. M. 1988. Protection of menhaden mince lipids from rancidity during frozen storage. Journal of Food Science. 54:1120-1124.
- Jambunathan, R. y Singh, U. 1981. Studies on desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars III. Mineral and trace element composition. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 29:1091.
- Jelen, P. 1985. Introduction to food procesing. En: Microorganisms in foods. p. 29-47. Reston Publishing Company, Inc., A Prentice-Hall Company, Virginia.
- Jideani, I. A. O. y Okeke, C. R. 1991. Comparative study of microorganisms and sensory attributes of condiments from the fermentation of different seeds. Plant Foods for Human Nutrition. 41:27-34.

- Jood, S., Chauhan, B. M. y Kapoor, A. C. 1989. Protein digestibility " in vitro " of chickpea and blackgram seeds as affected by domestic processing and cooking. *Plant Foods for Human Nutrition*. 39:149-154.
- Jurus, A.M. y Sundberg, W. J. 1976. Penetration of *Rhizopus oligosporus* into soybeans in tempeh. *Applied and Environmental Microbiology*. 32:284-287.
- Khetarpaul, N. y Chauhan, B. M. 1989. Effect of fermentation on protein, fat, minerals and thiamine content of pearl millet. *Plant Foods for Human Nutrition*. 39:169-177.
- Ko, S. D. y Hesseltine, C. W. 1979. Tempeh and related foods. En *Economic Microbiology. Microbial Biomass*. A. H. Rose (Ed). p.115-139. Academic Press, Londres.
- Kumar, G. y Venkataraman, L. V. 1990. Chickpea seed proteins: Isolation and characterization of 10.3S. Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 28:524-528.
- Kuo, J. C., Wang, S. Y. Peng, A. C. y Ockerman, H. W. 1989. Effect of tempeh on properties of hams. *Journal of Food Science* 54:1188-1233.
- Laurena, A. C., Rodriguez, F. M., Sabino, W. G., Zamora, A. F. y Mendoza. 1991. Aminoacid composition, relative nutritive value and " in vitro " protein digestibility of several philippine indigenous legumes. *Plant Foods for Human Nutrition*. 41:59-68.
- Leistner, L. 1990. Mould-fermented foods: recent developments. *Food Biotechnology*. 4:433-441.
- Lucas, R. D. y Donawa, A. L. 1991. Potential uses of pigeon pea in the small-scale manufacture of fermented sausages in the

Caribbean. Tropical Agriculture. 68:23-26.

- Martinelli, A. y Hesseltine, C. W. 1964. Tempeh fermentation. Package and tray. Food Technology. 18:167-171.
- Mital, B. K. y Garg, S. K. 1990. Tempeh-Technology and food value. Food Reviews International. 6:213-224.
- Mital, B. K. y Steinkraus, K. H. 1975. Utilization of oligosaccharides by lactic acid bacteria during fermentation of soy milk. Journal of Food Science. 40:114-118.
- Mitchell, D. A., Do, D. D. y Greenfield, P. F. 1991. A semi-mechanistic mathematical model for growth of *Rhizopus oligosporus* in a model solid-state fermentation system. Biotechnology and Bioengineering. 38:353-362.
- Mohamed, S., Johan, Z. y Bakar, J. 1989. Chickpea, mung bean, cowpea and peanuts as substitutes for soybean curds. International Journal of Food Science and Technology. 24:385-394.
- Mossé, J. y Pernollet, J. C. 1983. Storage proteins of legumes seeds. En : Chemistry and Biochemistry of Legumes. S. K. Arora. p. 111-193. Edward Arnold, Londres.
- Naczki, M., Rubin, L. J. y Shahidi, F. 1986. Functional properties and phytate content of pea protein preparations. Journal of Food Science. 51:1245-1247.
- Njoku, H. O. y Okemadu, C. P. 1989. Biochemical changes during the natural fermentation of the african oil bean (*Pentaclethra macrophylla*) for the production of ugba. Journal of the Science of Food and Agriculture. 49:457-465.
- Nnahna, I. A., Phillips, R. D., McWatters, K. H. y Hung, Y. C. 1990. Effect of germination on the physical, chemical and

- sensory characteristics of cowpea products : flour, paste and akara. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38:812-816.
- Nwanko, D., Andu, E. y Osoro, R. 1989. Cassava-fermenting organisms. *MIRCEN Journal*. 5:169-179.
- Odibo, F. J. C. y Umeh, A. I. 1989. Microbiology of the fermentation of *Telfaria* seeds for ogiri production. *MIRCEN Journal*. 5:217-222.
- Onyekwere, O. O., Akinrele, I. A. y Koleoso, O. A. 1989. Industrialization of *ogi* fermentation. En : *Industrialization of Indigenous Fermented Foods*. K. H. Steinkraus, p. 329-362. Marcel Decker, Inc., New York, N. Y.
- Ordorica, C. A. 1988. Obtención de aislados proteicos por micelización y precipitación isoeléctrica a partir de pastas de cártamo. Tesis de Doctorado en Biotecnología de Plantas, CIEA del IPN, Unidad Irapuato, Irapuato, Gto.
- Paredes-López, O. y Alpuche-Solis, A. 1991. Solid substrate fermentation -A biotechnological approach to bioconversion of wastes. En: *Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products*. p. 115-143. A. M. Martín (Ed). Elsevier Appl. Sci. Publ., Londres.
- Paredes-López, O. y Harry, G. I. 1988. Food biotechnology review: traditional solid state fermentations of plant raw materials -Applications, nutritional significance and future prospects. *CRC Critical Review Food Science and Nutrition*. 27:159-187.
- Paredes-López, O., Harry, G. I. y González-Castañeda, J. 1990. Sensory evaluation of tempeh produced by fermentation of

- common beans. *Journal of Food Science*. 58:123-126.
- Paredes-López, O., Harry, G. I., y Montes-Rivera, R. 1987. Development of a fermentation procedure to produce a tempeh - related food using common beans as substrate. *Biotechnology Letters*. 9:333-338.
- Pidoux, M. 1989. The microbial flora of sugar y kefir grain (The gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. *MIRCEN Journal*. 5:223-238.
- Prasad, D. T. 1990. Proteins of the phenolic extracted sunflower meal: 1. Simple method for removal of polyphenolic components and characteristics of salt soluble proteins. *Lebensmit-Wissenschaft un Technology*. 23:229-235.
- Price, M. L., Van Scoyoc, S. y Butler, L. G. 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 26:1214-1218.
- Pütter, J. 1974. Peroxidases. En: *Methods of Enzymatic Analysis*. H. U. Bergmeyer (Ed). p. 885-890. Verlag Chemie International, Deerfield Beach, Florida.
- Ramakrishnan, C. V. 1977. The use of fermented foods in India. *Symposium on Indigenous Fermented Foods, Bangkok, Tallandia*.
- Rasyid, A. 1988. Protein quality of soybean, red bean and corn tempeh. Tesis de Maestria, Washington State University, Washington, EUA.
- Reddy, N. R. Pierson, M. D., Sathe, S. K. y Salunkhe, D. K. 1985. Dry bean tannins: a review of nutritional implications. *Journal of the American Oil Chemist's Society*. 62:541-549.

- Robinson, J. y Kao, C. 1977. Tempeh and miso from chickpea, horsebean and soybean. *Cereal Chemistry*. 54:1192-1197.
- Samson, R. A., Van Kooij, J. A. y Boer, E. 1987. Microbiological quality of commercial tempeh in the Netherlands. *Journal of Food Protection*. 50:92-94.
- Sankar, D. S. y Singh, U. 1981. Mineral composition of four Indian legumes. *Journal of Food Science*. 46:1962.
- Sathe, S. K., Deshpande, S. S. y Salunke, D. K. 1984. Dry beans of *Phaseolus*. A review. Part. I. Chemical composition: Proteins. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 20:1-45.
- Sathe, S. K. y Salunke, D. K. 1981. Solubilization and electrophoretic characterization of the great northern bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins. *Journal of Food Science*. 46:82-87.
- Scorza, O. C., Chirife, J., Cattaneo, P., Viago, M. S., Berton, M. H. y Sarraih, P. 1981. Factores que condicionan el crecimiento microbiano en alimentos de humedad intermedia. *La Alimentación Latinoamericana*. 127:62-67.
- SECOFI. 1977a. Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial. Cuenta de bacterias mesofílicas aerobias, NOM-F-253. Dirección General de Normas, México, D. F.
- SECOFI. 1977b. Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial. Cuenta de organismos coliformes, NOM-F-254. Dirección General de Normas, México, D. F.
- SECOFI. 1977c. Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial. Método de conteo de hongos y levaduras en alimentos, NOM-F-255. Dirección General de Normas, México, D. F.
- SECOFI. 1977d. Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial.

Preparación y dilución de muestras de alimentos para análisis microbiológicos, NOM-F-286. Dirección General de Normas, México, D. F.

SECOFI. 1977e. Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial. Método general de investigación de *Salmonella* en alimentos, NOM-F-304. Dirección General de Normas, México, D. F.

SECOFI. 1977f. Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial. Alimentos-Yoghurt o leche búlgara. Especificaciones microbiológicas, NOM-F-254. Dirección General de Normas, México, D. F.

Shieh, Y. S. y Beuchat, L. R. 1982. Microbial changes in fermented peanut and soybean pastes containing kojis prepared using *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oligosporus*. Journal of Food Science. 47:518-522.

Shieh, Y. S., Beuchat, L. R., Worthington, R. E. y Phillips, R. D. 1982. Physical and chemical changes in fermented peanut and soybean pastes containing kojis prepared using *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oligosporus*. Journal Food Science. 47:523-529.

Singh, U. 1984. Dietary fiber and its constituents in *desi* and *kabuli* chickpea (*Cicer arretinum* L.) cultivars. Nutritional Report International. 29:419.

Singh, U., Kumar, J., Jambunathan, R. y Smithson, J. B. 1980. Variability in the seed coat content of *desi* and *kabuli* chickpea cultivars. International Chickpea Newsletter. 3:18.

Sinskey, A. J. 1978. Fungi as a source of protein. En : Food and beverage mycology. L. R. P. Beuchat (Ed). p. 334-367. AVI Publishing Company, Inc., Westport, CT.

- Snow, S. D. y Brooks, J. R. 1989. Fractionation of rice glutelin polypeptides using gel filtration chromatography. *Journal of Food Science*. 54:730-733.
- Soni, S. K. y Sandhu, D. K. 1989. Fermentation of idli : effects of changes in raw materials and physico-chemical conditions. *Journal of Cereal Science*. 10:227-238.
- Steinkraus, K. H. . 1983. Indonesian tempeh and related fermentations. En *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. Microbiology Series. p. 4-94. Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y.
- Steinkraus, K. H., Van Buren, J. P., Hackler, L. R. y Hand, D. B. 1965. A pilot plant process for the production of dehydrated *tempeh*. *Food Technology*. 19:63-68.
- Steinkraus, K. H., Yap, B. H., Van Buren, J. P., Providenti, M. I., y Hand, D. B. 1960. Studies on tempeh - An Indonesian fermented food. *Food Research*. 25:771-781.
- Sudarmadji, S. y Markakis, P. 1978. Lipid and other changes occurring during the fermentation and frying of tempeh. *Food Chemistry*. 3:165-170.
- Supramo y Markakis, P. 1987. Tempeh prepared from germinated soybeans. *Journal of Food Science*. 52:1736-1737.
- Tendergy, R. P. 1985. Solid substrate fermentation. *Trends in Biotechnology*. 3:96-99.
- Thambirajah, J. J. 1989. Safety evaluation of cassava fermented with micro-fungi. *Tropical Agricultural*. 66:326-328.
- Thompson, L. U., Tenebaum, A. U. y Hui, H. 1986. Effect of lectins and the mixing of proteins on rate of protein digestibility. *Journal of Food Science*. 51:150-152.

- Uebbersax, M. A., Ruengsakulrach, S. y Occella, L. G. 1991. Strategies and procedures for processing dry beans. Food Technology. 45:104-111.
- Ulloa, M. 1974. Mycofloral succession in pozol from Tabasco, México. Sociedad Mexicana de Micología. 8:17-48.
- Ulloa-Sosa, M. y Herrera, T. 1980. Fermented corn products of México. Advances in Biotechnology-Fuels, Chemicals, Foods and Waste Treatment. M. Moo-Young (Ed). p. 535-540. Pergamon Press, Toronto.
- Vallejo-Córdoba, B., Nakai, S., Powrie, W. D. y Beveridge, T. 1986. Protein hydrolysates for reducing water activity in meat products. Journal of Food Science. 51:1156-1161.
- Van der Riet, W. B., Wight, A. W., Cilliers, J. J. L. y Datel, J. M. 1987. Food chemical analysis of tempeh prepared from south African-grown soybeans. Food Chemistry. 25:197-206.
- Wang, H. L., Swain, E. W. y Hesseltine, C. W. 1975 a. Mass production of *Rhizopus oligosporus*. spores and their application in tempeh fermentation. Journal of Food Science. 40:168-170.
- Wang, H.L., Ruttle, D. I. y Hesseltine, C. W. 1968. Protein quality of wheat and soy bean after *Rhizopus oligosporus* fermentation. Journal of Nutrition. 96:109-114.
- Webster, S. N., Fowler, D. R. y Cooke, R. D. 1985. Control of a range of food related microorganismos by a multi-parameter preservation system. Journal of Food Technology. 20:311-318.