



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE  
OLIGOSACÁRIDOS ANTINUTRICIONALES EN  
GARBANZO DURANTE LA PRODUCCIÓN DE  
TEMPE**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

**CRISTINA REYES MARTÍNEZ**



**MÉXICO, D.F., 2008.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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.

○ **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profra. Olga del Carmen Velázquez Madrazo.

**VOCAL:** Dra. María del Carmen Wachter Rodarte.

**SECRETARIO:** Profra. Aurora Irma Ortegón Avila.

**1er. SUPLENTE:** Profra. Beatriz de Guadalupe Serrano López.

**2do. SUPLENTE:** Profra. Martha Giles Gómez.

○ **Sitio donde se desarrolló el tema:**

Departamento de Biotecnología y Alimentos. Laboratorio 321, Conjunto E, Facultad de Química, Ciudad Universitaria.

○ **Asesor del tema:**

Dra. Wachter Rodarte María del Carmen.

\_\_\_\_\_

○ **Supervisor técnico:**

Dra. Calderón Villagómez Hilda Elizabeth.

\_\_\_\_\_

○ **Sustentante:**

Reyes Martínez Cristina.

\_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS:**

### **ADIOS:**

*Por su amparo, su infinita misericordia y la sabiduría que me brinda día con día.*

### **A MIS PADRES:**

*Por darme la vida, el gran testimonio y ejemplo de vida y por sus consejos acertados en todo momento. Gracias por su apoyo incondicional.*

### **A MIS HERMANOS:**

*A Beto y Fausto por su apoyo económico y moral, por demostrarme que el trabajo no es cansancio sino es fuerza y decisión en la vida, pero sobre todo por confiar en mí.*

*A Lucy por compartir su madurez y éxito intelectual en la vida, gracias por cambiarme los pañales.*

*A Jouis por tener el don de la paciencia y tolerancia, gracias por tus consejos y tu confianza.*

*A Paquito por compartir su sabiduría y el conocimiento de una carrera profesional, gracias por tu apoyo en todo momento.*

*A Irene por ser la mejor amiga y compañera en nuestra vida universitaria, por sus observaciones acertadas y por cuidarme a cada momento.*

### **A MIS SOBRINOS:**

*A Karen, Carlos, Jesús, Luis, Valeria, Ismael, Miguel, Laura, Mónica, Juan y Emiliano por que representan cada etapa de la vida, gracias por permitirme apodos, consejos, sugerencias, clases de matemáticas y química, apuntes y tareas rayadas, juegos, regaños y un gran cariño desinteresado.*

### **A MIS CUÑADAS Y CUÑADOS:**

*A Noemí, Eva, Elena, Regino y Félix por representar el cuidado, impulso y amor de mis hermanos, gracias por sus cuidados.*

### **A LA DRA. HILDA CALDERON:**

*Por su confianza, apoyo incondicional y su conocimiento compartido para la realización de este trabajo. Pero sobre todo por brindarme su amistad, gracias.*

### **AL DR. FRANCISCO RUIZ:**

*Por su valioso intelecto en el desarrollo de este proyecto, por ser en todo momento un amigo aun en la distancia. Gracias por confiarme éste proyecto.*

## **AGRADECIMIENTOS**

### ***A LA DRA. CARMEN WACHER:***

*Por su apoyo económico y moral en el desarrollo de este proyecto, gracias por su valioso interés y supervisión en ausencia del Dr. Francisco.*

### ***A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DEL LAB. 321:***

*Gracias a Eli, Richard, Alice Rivero, Alice Camacho y Tere por compartir la comida, las tardes y las mañanas de experimentos y conocimientos técnicos, pero sobre todo por su gran amistad.*

### ***A LA UNIVERSIDAD:***

*Por ser la mejor universidad del mundo y enseñarme el inmenso universo que representan la juventud y años de experiencia en sus profesores, académicos, investigadores y alumnos.*

### ***A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DE LA FACULTAD DE QUÍMICA:***

*Gracias a cada uno de los compañeros de clase pero sobre todo al grandioso grupo 19.*

---

---

## ÍNDICE GENERAL

<b>1.</b>	<b>RESUMEN</b> .....	<b>iii</b>
<b>2.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>iv</b>
<b>3.</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>1</b>
3.1.	ALIMENTOS FERMENTADOS .....	1
3.2.	TEMPE .....	3
3.3.	FERMENTACIÓN SÓLIDA POR HONGO: TEMPE .....	5
	3.3.1. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FERMENTACIÓN .....	8
3.4.	ELABORACIÓN DE TEMPE .....	10
3.5.	LEGUMINOSAS .....	12
	3.5.1. PROTEÍNAS .....	17
	3.5.2. LÍPIDOS .....	18
	3.5.3. MINERALES .....	18
	3.5.4. VITAMINAS .....	19
3.6.	CULTIVO Y PRODUCCIÓN DEL GARBANZO ( <i>Cicer arietinum</i> L.) .....	19
3.7.	CARBOHIDRATOS EN LEGUMINOSAS .....	22
	3.7.1. AZÚCARES EN EL PROCESO DE LA FERMENTACIÓN DE ALIMENTOS .....	23
	3.7.2. SUSTRATOS .....	24
	3.7.3. MONOSACÁRIDOS .....	24
	3.7.4. DI Y OLIGOSACÁRIDOS .....	25
3.8.	OLIGOSACÁRIDOS .....	25
3.9.	RAFINOSA Y ESTAQUIOSA .....	28
	3.9.1. RAFINOSA .....	28
	3.9.2. ESTAQUIOSA .....	28
3.10.	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) .....	30
3.11.	ANÁLISIS DE AZUCARES EN HPLC .....	31
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
4.1.	OBJETIVO GENERAL .....	34
4.2.	OBJETIVOS PARTICULARES .....	34
<b>5.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
5.1.	DIAGRAMA GENERAL .....	35
5.2.	DATOS DE LA MUESTRA .....	36
5.3.	MICROORGANISMOS .....	36
5.4.	PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE ESPORAS .....	37
5.5.	MEDICIÓN DEL CRECIMIENTO DE <i>R. oligosporus</i> SOBRE LOS GRANOS DE GARBANZO .....	37
5.6.	ACONDICIONAMIENTO DEL SUSTRATO .....	38
	5.6.1. EFECTO DE LA COCCIÓN Y ESCALDADO SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>R. oligosporus</i> .....	38

---



---

5.6.2.	EFECTO DE LA ADICIÓN DE FUENTE DE NITRÓGENO SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>R. oligosporus</i> .	39
5.6.3.	EFECTO DE LA MEZCLA CON SOYA Y GARBANZO (50-50) SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>R. oligosporus</i> .	39
5.6.4.	EFECTO DEL REMOJO DEL GARBANZO EN ÁCIDO LÁCTICO Y ÁCIDO ACÉTICO, SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>R. oligosporus</i> .	40
5.7.	ELABORACIÓN DE TEMPE DE GARBANZO.	40
5.8.	ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL	41
5.8.1.	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA CRUDA	41
5.8.2.	DETERMINACIÓN DE GRASA	42
5.8.3.	DETERMINACIÓN DE CENIZAS	44
5.8.4.	DETERMINACIÓN DE HUMEDAD	45
5.9.	EXTRACCIÓN DE LOS AZÚCARES	46
5.10.	DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LOS AZÚCARES (RAFINOSA Y ESTAQUIOSA), POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	47
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>50</b>
6.1.	CRECIMIENTO DE <i>R. oligosporus</i> SOBRE GARBANZO	50
6.1.1.	INFLUENCIA DEL REMOJO DE GARBANZO Y SOYA EN ÁCIDO LÁCTICO Y ÁCIDO ACÉTICO, SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>R. oligosporus</i>	52
6.1.2.	INFLUENCIA DE LA COCCIÓN Y ESCALDADO SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>R. oligosporus</i> SOBRE LOS GRANOS DE GARBANZO	53
6.1.3.	INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE FUENTE DE NITRÓGENO SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>R. oligosporus</i>	54
6.1.4.	INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DEL 50% DE SOYA AL GARBANZO SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>R. oligosporus</i>	55
6.2.	ANÁLISIS PROXIMAL	55
6.3.	CAMBIOS EN LA CONCENTRACION DE LOS AZÚCARES DEL GARBANZO DURANTE LA FERMENTACIÓN	57
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>62</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>64</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXO I: CRECIMIENTO DE <i>Rhizopus oligosporus</i></b>	<b>70</b>
<b>10.</b>	<b>ANEXO II: RESULTADOS DE PROTEÍNA, GRASA, HUMEDAD Y CENIZAS</b>	<b>70</b>
<b>11.</b>	<b>ANEXO III: CROMATOGRAMAS DE LOS AZÚCARES EN ESTUDIO</b>	<b>71</b>
<b>12.</b>	<b>ANEXO IV: ANÁLISIS DE LA CUANTIFICACIÓN DE FRUCTOSA, RAFINOSA Y ESTAQUIOSA POR HPLC</b>	<b>73</b>

## 1. RESUMEN

La fermentación sólida es una alternativa para el mejoramiento de la calidad nutricional de las leguminosas, ya que se ha reportado que ocurre una disminución de factores antinutricionales como los inhibidores de proteasas, fitatos, etc. Uno de éstos es el tempe, que es una torta que resulta de la fermentación sólida de leguminosas por hongos. Uno de los más conocidos es el que se elabora con una matriz de soya, y se conoce como *Tempe kedele*. Es consumido en Indonesia y actualmente se consume en Canadá, Holanda, el oeste de India, Estados Unidos y Japón.

En México el cultivo de las leguminosas es muy antiguo. En algunos casos existen evidencias de uso en la alimentación entre las culturas prehispánicas por más de 4,000 años, como es el caso del frijol; y en otras más, como el garbanzo, su cultivo va íntimamente ligado con la llegada de los españoles.

El garbanzo (*Cicer arietinum L.*) es una buena fuente de carbohidratos y proteínas; contiene una buena cantidad de tiamina y niacina, minerales (calcio, fósforo, hierro, magnesio, potasio) y una cantidad de ácidos grasos (oleico, linoleico), sin embargo, es deficiente en aminoácidos que contienen azufre. Asimismo tienen atributos indeseables como por ejemplo fitatos, inhibidores de proteasas, y compuestos polifenólicos, los cuales pueden ser reducidos o eliminados antes de su utilización. Requiere de un tiempo de cocción largo para su consumo.

En México se cultivan dos variedades de garbanzo según el tamaño y el color: a) el garbanzo café y pequeño, denominado porquero o forrajero, destinado casi en su totalidad a la alimentación de cerdos, ganado lechero y pollos, b) el garbanzo blanco y grande para consumo humano, destinado en su mayoría a la exportación.



La variedad del garbanzo porquero presenta un gran contenido de grasa (3.0%) y de fibra (9.2%) y por esto se utiliza en la alimentación animal.

Es importante aumentar el consumo de leguminosas, específicamente del garbanzo (*Cicer arietinum*), ya que es una alternativa al consumo de leguminosas en México.

El objetivo de este trabajo es establecer las condiciones para el acondicionamiento de la variedad porquero, para la elaboración de un alimento fermentado similar al tempe, igualmente, determinar el efecto de la fermentación sobre la reducción en la concentración de los oligosacáridos antinutricionales (rafinosa y estaquiosa) en esta matriz, ya que estos oligosacáridos son responsables de la flatulencia, que afecta la digestión humana y animal.

## 2. INTRODUCCIÓN

Los alimentos fermentados son aquéllos en los que se involucra el crecimiento y actividad de un microorganismo, éstos pueden ser bacterias, levaduras, mohos, mezclas de mohos y levaduras así como un cultivo mixto de bacterias y levaduras. En particular, en la elaboración de tempe se utiliza un moho (*Rhizopus oligosporus*) como microorganismo responsable de la fermentación sobre una leguminosa (garbanzo, soya, haba, etc.).

La fermentación de las leguminosas ocasiona cambios benéficos y nutricionales muy importantes, debido a que se producen enzimas que modifican la materia prima y sintetizan otros compuestos responsables de nuevas características organolépticas. Asimismo, se asocia una diferencia en el valor nutricional ya que se producen algunos aminoácidos y con ello aumenta su disponibilidad; se ha reportado también que durante la fermentación aumenta el contenido de algunas vitaminas, se facilita la digestibilidad del producto final y hay disminución de compuestos antinutricionales. Existen compuestos como la rafinosa y estaquiosa que son los responsables de las flatulencias, por lo que su presencia disminuye el consumo de estas leguminosas en la dieta humana y animal (García, 1993).

El garbanzo (*Cicer arietinum L.*) es una leguminosa, cuya producción en México ocupa actualmente el quinto lugar a nivel mundial, esta producción ha disminuido en los últimos dos años. Esta leguminosa es una buena fuente de proteína (proteína cruda 20.9%), carbohidratos (69.8 %), lípidos (6.1 %) y algunas vitaminas (tiamina, niacina, ácido ascórbico), sin embargo no es utilizado ampliamente para alimentación humana y animal debido a sus propiedades antinutricionales, como son los fitatos, los oligosacáridos (responsables de la flatulencia). Se requiere además un tiempo largo de cocción.

Dichos oligosacáridos pertenecen a la familia de la rafinosa y en el garbanzo están presentes rafinosa y estaquiosa y son los responsables de la flatulencia en animales y humanos (Van Buren, 1994 y Sánchez et al., 1998).

En este trabajo se estudiará el destino que tienen los oligosacáridos que están presentes en el garbanzo, y que son responsables de la flatulencia, durante la producción y fermentación del tempe hecho a base de esta leguminosa, ofreciendo como una alternativa para un aumento en el consumo de esta leguminosa en nuestro país, como alimento fermentado.

## **1. ANTECEDENTES**

Los alimentos fermentados de origen animal o vegetal están distribuidos en todo el mundo y son objeto de estudio. El objetivo primordial de la fermentación en cereales y leguminosas no es sólo su preservación sino que además la modificación de sus propiedades organolépticas y nutricionales (Nout and Kiers, 2005). El tempe es uno de estos productos, que es una alternativa para el consumo de leguminosas.

### **1.1. ALIMENTOS FERMENTADOS**

Los alimentos producidos por acción de microorganismos han existido desde tiempos muy antiguos, existe referencia en bibliografía que data en el libro chino del año 2838 a.C. en donde se menciona que la leguminosa mas utilizada es el frijol de soya, de las cuales se obtienen una gran variedad de alimentos fermentados orientales. Del gran número de fermentaciones autóctonas, solo se tiene información de unas cuantas, pero a fines del siglo XIX se comienza a reportar sobre la descripción del producto, la acción del microorganismo sobre el sustrato y el aislamiento del microorganismo involucrado en los alimentos y bebidas fermentadas (García, 1993).

Los alimentos fermentados de origen animal o vegetal están distribuidos ampliamente en el mundo y actualmente se ha incrementado el interés en el estudio de estos productos. Se tiene una clasificación de los alimentos fermentados autóctonos de acuerdo al microorganismo involucrado en el proceso y existe otra clasificación de acuerdo al sustrato utilizado.

En los alimentos fermentados de acuerdo al microorganismo utilizado en el proceso se tiene:

- Alimentos fermentados por mohos, como el kecap y el sufu, donde se utilizan géneros de *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus* y *Neurospora*.
- Alimentos fermentados por bacterias, en las que predominan las bacterias lácticas y las del género *Bacillus*. En este caso existe una amplia aplicación de este género como lo es en verduras, pescados, lácteos y granos, algunos ejemplos son el kecap, el natto, el thua-nao, el ogi, el gari, el pulque mexicano, el buttermilk y el yakult entre otros.
- Alimentos fermentados por mezcla de mohos y levaduras, dentro de este grupo encontramos, el inoculo, el ragi en donde se encuentran especies de los géneros de *Rhizopus* y *Mucor*, combinado con levaduras del género *Candida*, *Encomyopsis* y *Saccharomyces*.
- Alimentos fermentados por cultivos mixtos, como el kéfir y el koumiss, siendo producto de la fermentación de levaduras y bacterias lácticas. En México se preparan el vinagre y el tepache a partir de frutas (García, 1993).

Existe otra manera de clasificar a los alimentos fermentados tradicionales la cual se basa en estudio del sustrato utilizado, de esta manera también se tiene los siguientes casos:

- Alimentos elaborados a base de cereales, como el maíz, sorgo, mijo, arroz y trigo, con los que se elabora el pozol, kenkey y ogi entre otros.
- Alimentos a base de nueces y otras semillas como el oncom.
- Alimentos elaborados de tubérculos como el gari.
- Alimentos a base de frutas y verduras, como el tepache y el kimchi, respectivamente.

Dependiendo de la manera de clasificar a los alimentos fermentados, la mayor parte de éstos se preparan por procesos de fermentación en estado sólido y dentro de los alimentos fermentados por mohos se encuentran el kecap, el tempe y el oncom de origen indonesio y se utiliza principalmente a *Rhizopus oligosporus* como el responsable de la fermentación sobre granos de soya y cacahuete (Mathews, 1989 y Steinkraus, 1995).

### **1.2. TEMPE**

Los alimentos fermentados son elementos esenciales de dietas en todas las partes del mundo. Nosotros conocemos la gran contribución de los quesos, otros productos lácteos fermentados, encurtidos, salsas fermentadas, vinos y cerveza que han formado parte de la dieta del occidente al mundo.

Del gran número de fermentaciones autóctonas se tiene información completa solo de unas cuantas. A fines del siglo XIX comenzaron a reportar alimentos y bebidas fermentados. Estos estudios solo consistían en la descripción del producto, el aislamiento del microorganismo asociado y la acción de dicho microorganismo sobre el sustrato, hoy en día los estudios son más avanzados y específicos, dando lugar a productos fermentados sofisticados.

En los alimentos fermentados autóctonos más tradicionales se encuentran el oncom y el tempe de origen indonesio, donde la matriz es de cacahuete y granos de soya, respectivamente; el miso y el hamanatto de origen japonés, alimentos fermentados a partir de una matriz de cereales con inóculos de hongos, levaduras y bacterias.

El tempe, es una torta que resulta de la fermentación sólida de leguminosas por hongos. De los mas conocidos es el que se elabora con una matriz de soya, se conoce como *Tempe kedele* y es originario de Indonesia, donde se elabora a nivel casero (García, 1993).

El producto fermentado es una torta compacta blanca y de olor fresco y limpio, esto es por que el micelio del hongo no sólo crece sobre la superficie de las leguminosas si no que también crece sobre los cotiledones del grano, sin embargo, este alimento no se consume crudo.

La fermentación del tempe es similar a la de un queso, es una fermentación en la que existe una hidrólisis de proteínas y lípidos, teniendo como consecuencia que el sabor llega a fortalecerse por la presencia de los ácidos grasos libres y el color blanco inicial de la torta comienza a desaparecer debido a las esporas producidas por el hongo, cuando se acerca el final de la fermentación.

El tempe constituye una fuente importante de proteínas que se consume actualmente en Indonesia, Malasia, Holanda, Canadá, Oeste de India y en algunos estados de Estados Unidos, producido por inmigrantes de Indonesia (Steinkraus, 1995). Actualmente se ha incrementado su producción comercial en otros países. La torta es cortada en rebanadas de diferentes tamaños, son colocadas en salmuera para posteriormente ser horneadas, asadas o fritas, acompañando ensaladas con otras verduras, sustituyendo en algunos casos la proteína de origen animal.

Este alimento autóctono es consumido y producido en todas las partes de Indonesia, actualmente se produce comercialmente en Canadá, Holanda, el oeste de India, Estados Unidos y Japón (Steinkraus, 1995 y Nout and Kiers, 2005). En Indonesia el tempe es consumido como un sustituto de carne.

En México existe una amplia variedad de alimentos tradicionales fermentados indígenas que aun no han sido estudiados con detalle, a diferencia de los alimentos fermentados orientales como el tempe, pero no debemos olvidar que estos alimentos

fermentados son con una base de cereal en este caso es el maíz, lo que no impide la utilización de nuestras leguminosas como el frijol, el garbanzo, etc., leguminosas que en nuestro país también se producen y que se pueden utilizar como matriz de alimentos fermentados.

### **1.3. FERMENTACIÓN SÓLIDA POR HONGO: TEMPE**

Los alimentos fermentados de origen animal o vegetal están distribuidos en el mundo y son objeto de estudios detallados.

El objetivo primordial de la fermentación de cereales y granos, no es su conservación, si no más bien es la modificación de sus propiedades organolépticas y nutricionales. La fermentación del tempe se lleva a cabo por la acción de un hongo que en este caso se trata de *Rhizopus oligosporus*.

Los hongos son organismos multicelulares filamentosos, que pueden tener un cuerpo carnoso en el caso de los hongos macroscópicos y en el caso de hongos microscópicos están los mohos y hongos filamentosos. Todos los hongos son quimioheterótrofos, requieren de compuestos orgánicos como fuente de energía y de carbono. La mayoría de ellos son aeróbicos o facultativamente anaeróbicos, contribuyendo significativamente a la descomposición y reciclaje de nutrientes (Nout and Kiers, 2005 y Tortora, 1995).

Los hongos filamentosos pueden reproducirse asexualmente por fragmentación de sus hifas, además se pueden reproducir sexual y asexualmente por la formación de esporas, de esta manera los hongos filamentosos pueden ser clasificados e identificados por el tipo de espora que producen, como en el caso de *Rhizopus oligosporus* que produce



esporangiosporas. El crecimiento de los hongos es común en ciertas condiciones, crecen en un pH de 2.0 a 5.0, en presencia de oxígeno, sobre cualquier superficie con azúcares, son capaces de metabolizar carbohidratos complejos, crecen a baja actividad acuosa ( $A_w$  0.7), a diferencia de las bacterias no necesita grandes cantidades de nitrógeno, es por esto que los hongos pueden desarrollarse en condiciones críticas de pH, presión osmótica, humedad y ciertos nutrientes (Owen, 1989 y Tortora, 1995).

En particular se ha reportado que la adición de potasio estimula el crecimiento de *R. oligosporus*, (Peñaloza et al, 1991); también que es capaz de crecer a concentraciones muy bajas de  $O_2$  (0.2%), (Lin and Wang, 1991); requiere de una temperatura óptima de crecimiento de 37° C y su crecimiento se ve inhibido por 5-10% v/v de dióxido de carbono (Nout and Kiers, 2005).

Diferentes especies de hongos han sido reportadas en la literatura como responsables de la fermentación sólida en leguminosas, algunas de estas especies son del genero *Rhizopus*, dentro de ellas tenemos a *R. oryzae*, *R. stolonifer*, *R. arrhizus*, *R. formosaensis*, *R. achlamydosporus* y *R. oligosporus* Saito, siendo ésta última la principal especie utilizada en Indonesia en la preparación de tempe y ésta no depende del lugar de donde es producido.

El hongo utiliza diferentes fuentes de nitrógeno y carbono, los azúcares más comunes son glucosa, fructosa, galactosa y maltosa, con los cuales se obtiene un crecimiento excelente. Varios aceites vegetales pueden ser sustituidos por azucares como fuente de carbono. Principalmente los ácidos grasos son la fuente primaria de energía para llevar a cabo la fermentación sólida.

*Rhizopus oligosporus* es un hongo altamente proteolítico, por lo que se han observado dos sistemas enzimáticos: uno tiene un pH óptimo a 3.0 y el otro a 5.5, tienen una actividad máxima a 50 – 55° C y son bastante estables a pH de 3.0 – 6.0, pero rápidamente desnaturalizados a pH de 2.0 o cerca de 7.0. Además de esta actividad proteolítica se suma la fuerte actividad de la lipasa, pero baja la actividad de amilasas (Ruiz, 1996). Tampoco requiere de mucha aireación como muchos otros hongos, de tal manera que si no se cuida ésta y por el contrario se favorece un exceso, tendremos una esporulación temprana por el metabolismo del hongo.

El objetivo de la fermentación sólida no solo es representar una alternativa tecnológica para conservar una gran variedad de leguminosas o cereales, principalmente, es obtener una calidad nutricional y productos comestibles con características sensoriales palatables.

Durante la fermentación sólida ocurren muchos cambios en los granos de las leguminosas. Aumenta la concentración de nitrógeno soluble de 0.5 a 2%, los lípidos son reducidos en un 22.5%. Aumenta la riboflavina, niacina y biotina aumentan mientras que la tiamina disminuye (Mathews, 1989).

También se han llevado a cabo muchos cambios químicos incluyendo la destrucción de la textura de los granos y la producción de uno de los compuestos antibacterianos. Además disminuyen los factores antinutricionales de dichas leguminosas, tales como el contenido de fitatos, así mismo, el tiempo de cocción disminuye. La digestibilidad de los granos fermentados aumenta, el contenido de la vitamina B<sub>12</sub> puede aumentar cuando en la fermentación hay contaminación con la bacteria *Klebsiella pneumoniae*, ya que *R. oligosporus* no produce dicha vitamina.

Finalmente el inóculo puede ser obtenido de diferentes fuentes como lo es un fragmento de tempe con una fermentación avanzada y que presenta esporulación, otra manera es deshidratar y moler el fragmento de tempe con esporas del hongo y rociarlo sobre la matriz, generalmente 1 a 3 g de esta masa deshidratada son usadas para inocular 1,000 g de cotiledones de la matriz. De esta manera se realiza la elaboración de tempe tradicionalmente ya que las personas guardan rebanadas de producto fermentado anteriormente para elaborar nuevo tempe.

### **1.3.1. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FERMENTACIÓN**

Así como el tipo de microorganismo y el tipo de carbohidrato que es fermentado intervienen en el proceso de fermentación en sistemas de alimentos, existen otros factores como el pH y la temperatura.

**El pH:** la mayoría de los sustratos de alimentos fermentados tienen un pH de 7 como se indica en la Tabla I, en la mayoría de estos sistemas el pH esta en un intervalo de 4 - 7 y la mayoría de los microorganismos se encuentran viables para crecer en este intervalo. Por ejemplo, un intervalo de pH, en los jugos de frutas, es de 3 – 4, de tal modo que favorece el crecimiento de levaduras y hongos en la elaboración de vinos. Debido a que muchos de los productos de fermentación son ácidos, durante la fermentación el pH puede cambiar, al igual que las condiciones que son favorables para otro tipo de microorganismos y pueden cambiar las condiciones de crecimiento.

**TABLA I:** Intervalo de pH de diferentes sistemas de alimentos en los que puede llevarse a cabo una fermentación (Koivistoinen, 1980).

SISTEMA	pH
Leche	6.5 - 7.0
Carne	5.5 - 6.5
Verduras	5.5 - 6.5
Fruta	2.9 - 4.5
Pastas	4.5 - 6.0

**TEMPERATURA:** debido a que la fermentación es una combinación de reacciones químicas esto depende fuertemente de la temperatura. Normalmente el proceso de fermentación se lleva a cabo a temperaturas cercanas a los 37° C, dependiendo en la duración del proceso.

**OXÍGENO:** el metabolismo de los carbohidratos es fuertemente dependiente de la presencia de oxígeno. Sin embargo la solubilidad de oxígeno en sistemas acuosos es extremadamente baja y normalmente éste no se adiciona a los sistemas de fermentación tradicionales.

**POTENCIAL REDOX:** el potencial redox de la fermentación influencia el medio de metabolismo especialmente en la llamada fermentación parcialmente aeróbica, donde esta presente una pequeña cantidad de oxígeno y consecuentemente la concentración residual de oxígeno puede tener un efecto indirecto en la fermentación.

**TIPOS DE CARBOHIDRATOS CONVENCIONALES:** tradicionalmente las fermentaciones en alimentos incluyen la degradación microbiana del carbohidrato que este presente, por ejemplo: lactosa en leche; glucosa, fructosa y sacarosa en verduras y frutas; glucosa y maltosa en pastas.

De esta manera se provee de una fuente de carbohidrato que no representa un costo en la fermentación. Existen algunas otras fermentaciones que utilizan carbohidratos no convencionales como los oligosacáridos o bien, lactosa que se obtiene del suero de la leche (Koivistoinen, 1980).

Por otro lado, la inoculación puede ser con esporas de *R. oligosporus* se utiliza una concentración de  $1 \cdot 10^7$  o  $1 \cdot 10^9$  (esporas/L) donde las esporas están resuspendidas en agua estéril, este inóculo se obtiene de las universidades y de los institutos donde se tiene esta especie perfectamente identificada. El tempe comercial es elaborado con este tipo de inóculo, además se presentan diferentes alternativas para el mejoramiento de la calidad nutricional como lo es la adición de la bacteria que produce la vitamina B<sub>12</sub>, *Klebsiella pneumoniae*, (Ko et al., 1979; Nout et al., 2005; Reyes et al., 2004; Mathews, 1989; Steinkraus, 1995).

#### **1.4. ELABORACIÓN DE TEMPE**

Tradicionalmente para elaborar el tempe se remojan los granos en agua hasta que es fácil remover las cascarillas, manualmente. Algunos prefieren el uso de agua caliente para realizar el remojo. Después de descascarillar los granos son calentados en un exceso de agua, son drenados y enfriados. Se mezclan pequeñas piezas de tempe previamente fermentado, un cultivo comercial, son mezclados con los granos de las leguminosas los cuales son guardados, en hojas de plátano y la fermentación se lleva a cabo en un cuarto a temperatura ambiente por 24 a 48 h hasta que los granos son cubiertos con el micelio blanco y forman una torta blanca. La torta es deshidratada y colocada en una solución salina, finalmente se fríen y se cortan en pequeñas piezas se añaden a sopas o se consumen solas.

En industria el tempe se elabora utilizando los avances en la tecnología y la información de investigaciones en los laboratorios de universidades, de esta manera se realiza un remojo en agua acidificada (ácido láctico), se elimina el agua y se descascaran los granos de forma mecánica, se realiza una cocción de 20-30 min en agua, los granos son drenados y se enfrían a temperatura ambiente.

Posteriormente los granos se rocían y se mezclan con la suspensión de esporas del inóculo *R. oligosporus* **NRRL2710** en una concentración de  $(1 \cdot 10^9)$  esporas/L después se colocan en un cuarto a temperatura de 37°C por 48 h sobre mallas. Finalmente detienen la fermentación con calentamiento a 52° C. Las rebanadas son empacadas en bolsas de polietileno y finalmente se comercializan.

En la actualidad se han realizado muchos cambios en la forma de elaborar tempe ya que se han hecho innovaciones tecnológicas a nivel casero. El primer paso es el descascarillado de forma mecánica y no manual, la fermentación se lleva a cabo en bolsas de polietileno y no en hojas de plátano. No es común encontrar de un cepa pura, sino que ahora, realizan la deshidratación de los fragmentos de tempe con la fermentación avanzada, en donde el hongo ha formado esporas, estas son molidas, hidratadas y posteriormente los granos son rociados con esta agua que contiene el inóculo de esporas y las bacterias que hacen una primera fermentación acida.

En la industria no hay fermentación acida producida por bacterias, ya que el inóculo es una cepa pura, en donde únicamente las esporas de *R. oligosporus* **NRRL 2710** están resuspendidas en agua estéril.

Además se ha estudiado que *R. oligosporus* produce un agente antibacteriano que inhibe el crecimiento de bacterias como *E. coli*, *Pseudomonas pyocyanea*, entre otros géneros (Ko and Hesseltine, 1979).

Gracias a estos estudios ahora, en la industria se ha llegado a la biomasa que es una representación teórica del crecimiento del hongo representado en cambios en los niveles de oxígeno. Se tiene así que el oxígeno disminuye 2% y comúnmente las concentraciones de CO<sub>2</sub> aumentan a niveles de 5-10%.

De tal forma que la fermentación puede ser monitoreada por la producción de ATP, el consumo de O<sub>2</sub> o bien la producción de CO<sub>2</sub>. Estos datos han implicado ser un gran reto en laboratorio ya que es muy difícil tener una reproducibilidad por las dificultades que se tienen en reproducir las condiciones en las que el hongo crece, intervienen factores como el aumento de temperatura, el tiempo de fermentación, las condiciones de aireación y el tipo de matriz que se utilizó (Nout and Kiers, 2005).

### **1.5. LEGUMINOSAS**

La utilización de las leguminosas en la alimentación, para humanos y animales, se remonta a tiempos inmemoriales. Por su alto contenido proteico se convierten en una fuente de proteínas vegetales importante y económica que adquieren una gran relevancia en aquellos países en donde la ingesta proteica es baja y en donde se les llega a considerar como la “carne de los pobres”. También destacan por su alto contenido de carbohidratos y en algunos minerales y vitaminas, así como su bajo contenido de grasa.

Son de distribución universal y en cada región existe una, por ejemplo, en América del Sur encontramos cacahuates y ejotes, en extremo oriente soya y garbanzo y en África haba gruesa, por mencionar algunos ejemplos.

Las leguminosas son semillas secas, limpias, sanas y separadas de la vaina, procedentes de la familia *Fabaceae* dentro de las cuales se encuentran: la judía común, lenteja, garbanzo, soja, cacahuate y algarroba entre otros. Las leguminosas secas que se han cultivado tradicionalmente para el consumo humano son el garbanzo, la lenteja, la alubia, haba y soja. De acuerdo con su composición existen básicamente dos grupos de leguminosas las que contienen un alto nivel de proteína y grasa, entre las que se encuentran la soja, cacahuate y la judía. Presentan un contenido de proteína del 35% y el contenido de grasa oscila entre el 5 y el 45%.

Por otro lado tenemos un segundo grupo que comprende a las leguminosas con contenido medio de proteína y bajo en grasa. En este grupo encontramos las leguminosas representativas para el consumo humano, tal es el caso de el frijón, el garbanzo y las habas, entre otros. Presentan un contenido de proteína del 17-30% y de 1% de grasa y contienen con frecuencia almidón (Norman, 1986 y Astiasarán et al., 2000).

Las leguminosas son ricas en aminoácidos esenciales como lisina y contienen una importante cantidad de fito-químicos como el fitosterol, el cual ha sido asociado con la prevención de cáncer.

La acumulación de carbohidratos y proteínas durante la maduración de los granos ha sido estudiada con mucho detalle, se ha observado que la acumulación de nitrógeno soluble disminuye durante el periodo de maduración del garbanzo (Sing, 1981). Así mismo se ha encontrado que hay un aumento en aminoácidos esenciales como histidina, lisina y arginina; en la maduración, los azúcares solubles aumentan continuamente hasta alcanzar una madurez de 28 días y en discrepancia comienzan a disminuir a los 35 días.



Por otra parte el tiempo de cocción es un aspecto muy relevante, dicha característica es herencia genética y una de las muchas causas que limitan la utilización de leguminosas en la alimentación, dicha característica se atribuye a la presencia de fibra dietaria, lignina, celulosa y hemicelulosa (Singh, 1992). El contenido de humedad varía entre el 5-10%, facilitando entonces su almacenamiento.

Los procesos de maduración y recolección determinan la textura de los granos, en este sentido, el contenido en carbohidratos desempeña un papel importante, ya que el comportamiento en la cocción depende del contenido de almidón, que determina el grado de hinchamiento del grano por absorción del agua y la textura del producto cocido.

Los componentes de las paredes celulares, especialmente las pectinas, condicionan la elasticidad y por consiguiente la resistencia de la piel (Kaur, 2005) Un aspecto adicional es que albergan bacterias simbióticas que fijan el nitrógeno del aire, debido a que las raíces poseen unos nódulos típicos, que contienen bacterias como *Rhizobium leguminosarum* (Muller, 1989).

El valor nutritivo de las leguminosas se atribuye fundamentalmente a su elevado contenido de proteínas y también son fuentes de carbohidratos, lípidos, minerales y vitaminas, como se muestra en la Tabla II la composición química de algunas leguminosas.

Son pobres en los aminoácidos azufrados como metionina y cistina, pero ricas en lisina. Esto no es frecuente en las proteínas vegetales, por lo que este grupo es el complemento ideal de las dietas de cereales en el que el contenido de lisina es bajo. La calificación química de la proteína en las leguminosas está en un intervalo de 18.5 a 21.90 g/100g en granos crudos y un intervalo de 21.3 a 23.7 g/100g en leguminosas cocidas.

**TABLA II:** Composición química de las leguminosas mas consumidas en México (g/100g)  
(Hernández et al., 1987).

GRANO SECO	PORCION COMESTIBLE	ENERGIA (Kcal/g)	PROTEINA CRUDA	LIPIDOS	HIDRATOS DE CARBONO	FIBRA CRUDA
Alubia	100	330	20,3	2,8	58,6	4,0
Chicharo	100	345	22,0	2,0	64,0	4,7
Frijol amarillo	100	337	14,2	1,7	67,1	4,5
Frijol blanco	100	320	22,4	2,7	52,0	3,9
Frijol negro	100	322	21,8	2,5	55,4	4,1
Garbanzo	96	370	19,0	6,2	61,0	3,4
Haba	80	345	22,9	2,2	61,5	5,9
Haba blanca	100	331	25,4	1,3	57,1	4,9
Lenteja	100	335	23,1	1,4	59,7	3,2

El contenido de proteína está en un intervalo de 14% a 17%, contrastando con 7%-13% de los cereales, pero es similar al contenido de proteína de la carne 18%-25%, sin embargo el bajo valor nutricional de la proteína de las leguminosas representa el problema más grande de este grupo de alimento.

La fibra dietética causa diferentes efectos fisiológicos como lo son: alteración del tránsito gastrointestinal, interviene en la disminución de los niveles de colesterol en el cuerpo, disminuye los valores de glucosa y lisina, causa flatulencia y alteración en la biodisponibilidad de los nutrientes y todo depende de las propiedades y estructuras químicas que los diferentes componentes de las leguminosas presentan (Ermetice et al., 2006).

El garbanzo presenta un alto contenido de lípidos, bajos valores de fibra insoluble y fibra dietética no se detecta. Cerca de 20 leguminosas son usadas como granos secos e inapreciables para la nutrición humana, como las lentejas, fríjol y garbanzo se consumen en poca cantidad y la producción nacional disminuye cada año. Se importan anualmente de México y Chile cerca de 3,000 TM de garbanzo. (Morrow, 1991 y Nielse, 1991).

El garbanzo es la leguminosa que presenta el más alto valor de proteína y lípidos totales, aproximadamente 3 veces más que fríjol común y las lentejas, no se detecta en él fibra dietaría, así también influye el proceso de cocinado ya que este proceso puede cambiar características físico-químicas de las leguminosas.

Pese a estas ventajas las leguminosas han dejado de formar parte de los hábitos alimenticios debido a aspectos socioeconómicos y a la presencia en su composición de una serie de factores antinutricionales, los cuales están clasificados como termolábiles y termoestables, que en algunos casos pueden afectar la digestión, absorción y metabolismo de los nutrientes.

Dentro de los termoestables se encuentran los taninos, las isoflavonas, los factores de flatulencia, los fitatos y las saponinas; los termolábiles son las lectinas, los inhibidores de proteasas y los compuestos cianogénicos. Sumándose la susceptibilidad a la contaminación por hongos productores de aflatoxinas, especialmente en cacahuate y soya. Afortunadamente las toxinas presentes en este grupo se destruyen tras un remojo durante 12–24 horas seguidas de un proceso de cocción (Sotelo, 1987; Alarcón, 2005 y Astiasarán et al., 2000).

Las lectinas o fitohemaglutininas presentes en algunas leguminosas son glucoproteínas capaces de unirse a azúcares o proteínas, que disminuyen el transporte de nutrientes a través de la pared intestinal, precipitación de eritrocitos y alteración en el sistema inmune.

Los inhibidores de las proteasas son sustancias que se encuentran en la fracción proteica de las leguminosas y se caracterizan por su capacidad de inhibir la acción de enzimas digestivas como la tripsina y quimotripsina y como consecuencia las proteínas no son digeridas adecuadamente y disminuye la biodisponibilidad de los aminoácidos.

Los taninos son compuestos fenólicos capaces de unirse a enzimas y a otras proteínas mediante puentes de hidrógeno, dando lugar a compuestos insolubles disminuyendo la utilización de los aminoácidos azufrados y la absorción de azúcares en el intestino.

Las saponinas, por su parte, están formadas por un grupo triterpeno (aglicona) unido a una o más moléculas de azúcar, las cuales producen la hemólisis y la alteración de la permeabilización del intestino.

En general las leguminosas tienen de 14 a 17% de proteína; pero la soya y el cacahuate contienen 30 a 45%. El contenido de lípidos está entre 1 a 7%, con excepción de soya y del cacahuate los cuales contienen de 18 a 20% y de 48 a 50% respectivamente, los cuales constituyen una buena fuente de fibra dietaria y minerales. En cuanto al contenido de minerales está en un intervalo de 2 a 5%, siendo buenas fuentes de calcio, hierro y vitaminas hidrosolubles como la tiamina, la riboflavina y el ácido nicótico. La composición química de las leguminosas depende totalmente del cultivo, lugar geográfico y sobre todo de las condiciones de crecimiento.

### **1.5.1. *PROTEÍNAS***

Las proteínas de las leguminosas son principalmente de dos tipos: enzimáticas y estructurales, los cuales son responsables de las actividades celulares normales, incluyendo la síntesis de proteínas de almacenamiento y de estructura.

El contenido de proteína en granos de garbanzo varía de 15 a 29.6%, cabe mencionar que estos valores incluyen la mezcla de diferentes compuestos de nitrógeno, incluyendo así compuestos como aminoácidos libres, aminos, lípidos complejos, bases purinas y pirimidinas, ácidos nucleicos y alcaloides. La composición de aminoácidos en las proteínas de leguminosas ha sido estudiada, mostrando que son deficientes en aminoácidos con azufre y triptofano, pero son ricas en lisina, aminoácido en la cual los cereales presentan deficiencia (Iqbal, 2006).

### **1.5.2. LÍPIDOS**

Las leguminosas contienen de 1 a 7% de lípidos, pero también existen casos especiales como la soya, el cacahuate que presentan del 20 al 40%. La mayoría de las leguminosas contienen ácidos grasos esenciales como los ácidos linoleico y linolénico, ácidos grasos esenciales más importantes, que son requeridos para el crecimiento, funciones fisiológicas y sostén del cuerpo. El ácido oleico y linoleico son los ácidos que se encuentran en mayor proporción en cacahuates, soya, garbanzo y lentejas.

### **1.5.3. MINERALES**

Las leguminosas son una buena fuente de minerales como el calcio, hierro, cobre, zinc, potasio y magnesio, en la mayoría de las leguminosas el potasio aporta del 25-30% del total del contenido de minerales. Este puede ser utilizado en personas que toman diuréticos para el control del agua en el organismo y para quienes sufren de excesiva excreción de potasio. Las leguminosas también contienen grandes cantidades de fósforo, expresado como ácido fitico, pero sus niveles de presencia pueden ser disminuidos en el proceso de preparación. El ácido fitico afecta la absorción y utilización de calcio ya que éste precipita como sales insolubles en el estómago y en el duodeno.

#### **1.5.4. VITAMINAS**

En las leguminosas se encuentran presentes la tiamina, riboflavina y niacina, la mayoría de las especies contienen únicamente pequeñas cantidades de caroteno. Sin embargo esto no contribuye mucho como precursor de la vitamina A para la dieta. El ácido ascórbico desaparece después de un largo proceso de cocción, se sugiere que la presencia de polisacáridos no digeribles y la lignina, compuestos de fibra dietaria, puede reducir la viabilidad de B<sub>6</sub> para la absorción intestinal. En comparación con otros alimentos comunes, las leguminosas son una buena fuente de ácido fólico.

#### **1.6. CULTIVO Y PRODUCCIÓN DEL GARBANZO (*Cicer arietinum* L.)**

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) pertenece a la familia *Fabaceae* de las leguminosas y es una planta de ciclo anual diploide. Se conocen tres variedades que se distinguen por el color de la semilla: la amarilla, la rojiza y la negra. La variedad amarilla es la semilla más grande y es utilizada básicamente en la alimentación del hombre. Es una planta que se adapta a climas templados-fríos e incluso en climas cálido-secos.

En México se cultiva en el noroeste del país, los principales productores son Sinaloa, Sonora y Baja California Sur (Reyes et al., 2000). En la actualidad nuestro país ocupa el noveno lugar en la producción mundial de garbanzo y compite en el mercado internacional con un tipo “extra”, considerado por muchos como el mejor garbanzo del mundo. Actualmente México produce 165,000 toneladas y exporta 79, 199 toneladas, cerca del 48 % de su producción (FAO, 2007).

La India produce el 80 % del total de la producción mundial de garbanzo, entre otros países se encuentran Pakistán, Turquía, Australia y México que contribuyen fuertemente con la producción mundial. India además de la semilla normal, cultivan híbridos como la variedad *Kabuli* y *Desi*, aunque su producción aun no es muy notoria.

La producción comercial del garbanzo lleva más de 50 años en nuestro país. A pesar de ser un cultivo que no utiliza grandes superficies, su importancia radica en que es un producto que se destina en mayor medida al mercado internacional. El garbanzo mexicano se ha ubicado como el mejor del mundo, no sólo por su alta calidad, sino también por la capacidad que ha tenido para introducir diversas variedades al mercado lo que le ha permitido llegar a más de 18 países (INFOASERCA, 1997).

En México se cultivan dos variedades de garbanzo según el tamaño y el color: a) el garbanzo café y pequeño, denominado porquero o forrajero, destinado casi en su totalidad a la alimentación de cerdos, ganado lechero y pollos, b) el garbanzo blanco y grande para consumo humano, destinado en su mayoría a la exportación, como son Surutato, Surutato 77, Sonora, Sonora 80, Macarena y Breve Duro entre otros. La variedad del garbanzo porquero presenta un gran contenido de grasa (3.0%) y de fibra (9.2%) por esto se utiliza en la alimentación animal (Sotelo et al., 1987).

Por su valor proteico, llega a ser utilizado en la elaboración de formulas lácteas para infantes en el caso de las variedades Surutato y Breve Duro (Sotelo, 1986 y Alarcón, 2005), además de su utilización en la alimentación animal, en el caso de la variedad "Porquero", en los alimentos fermentados tradicionales como lo es la elaboración de tempe, en los países asiáticos.

Los granos de garbanzo son una excelente fuente de proteínas, sin embargo tienden a acumular cantidades de metales tóxicos que forman parte de la planta.

Las plantas acumulan adecuadas cantidades de metales esenciales como el Fe, Cu, Zn en los granos, mientras que los metales tóxicos como Cd y Cr están presentes en pequeñas cantidades, su acumulación depende de la variedad de garbanzo, esta es una posible razón de que estas plantas exhiben mecanismos de detoxificación, como la síntesis de fitoquelatina. Los estudios de los efectos de residuos de contaminantes con metales pesados en trazas producen varios efectos fitotóxicos en plantas disminuyendo las actividades enzimáticas (Gupta, 2006).

El garbanzo es la quinta leguminosa del mundo en términos de producción total después de la soya, cacahuete y frijol. En México es una de las leguminosas más importantes, actualmente se exporta hasta un 90% de la producción nacional y el resto es usado para el consumo animal.

El tamaño y el color dependen del tipo de cultivo. La forma puede ser redonda, semiredonda, ovalada o semiovalada. La capa exterior contribuye con el 14.5-16.5 % del peso del grano, los dos cotiledones y el germen contribuyen con el 83-84 %. El color de los cotiledones es amarillo a café, amarillo, rojizo-café y granos negros, el contenido de proteína está en un intervalo de 15-30 % posee una de las mejores calidades nutricionales en la familia de las leguminosas (Paredes, 1991).

Presenta un índice glucémico bajo, marcando la importancia de este alimento para personas diabéticas y vegetarianas como una buena fuente de proteínas. El agua que se absorbe en el proceso de cocción facilita las reacciones químicas como la gelatinización del almidón y desnaturalización de las proteínas, esto gracias a que durante la cocción el agua penetra los cotiledones y llega hasta el centro de cada grano, afectando directamente sus propiedades de textura (Gowen, 2007). Se ha reportado que a 37° C se tiene la máxima absorción de agua, así también el aumento de vitaminas como la tiamina y la niacina (Williams, 1983).



Es un suplemento adecuado de proteína cruda, aporta energía, proteína y aminoácidos que pueden soportar con eficiencia el crecimiento de cerdos (Zamora et al., 1975; Cazarin et al., 1976 y Vladimirov et al., 2006). Desarrollaron un proceso básico para obtener un producto fermentado por medio de la fermentación sólida, utilizando *Rhizopus oligosporus* y garbanzo como sustrato, en donde la actividad del agua disminuyó a 0.92 durante el proceso. Durante la fermentación aumentó el total de la proteína soluble, los sólidos solubles y carbohidratos solubles, no obstante disminuyó el contenido de fibra y el pH.

En Latinoamérica el garbanzo no es usado significativamente en el consumo humano, pero en su mayoría se destina a la alimentación animal y tal vez se deba a dos de sus particulares propiedades el sabor y aroma (Paredes, 1991).

### **1.7. CARBOHIDRATOS EN LEGUMINOSAS**

El total de carbohidratos de las leguminosas está en un intervalo de 24 a 60%, este grupo incluye mono y oligosacáridos, fibra y otros polisacáridos.

Del total de azúcares presentes los oligosacáridos llega a ocupar hasta un alto porcentaje del total de carbohidratos en leguminosa deshidratadas, representado en su mayoría por los azúcares de la familia de la rafinosa.

La predominancia de un oligosacárido en particular depende del tipo de leguminosa. La verbascosa es el oligosacárido que predomina en frijol negro, mientras que la estaquiosa lo es en soya, lentejas y judías. La rafinosa está presente en cantidades moderadas en una minoría de leguminosas. Muchos reportes han sugerido que los oligosacáridos están ligados directamente a la producción de flatulencia tanto en el hombre como en animales.

La fibra cruda está compuesta por celulosa y hemicelulosa, predominando el grupo de pentosas como la lignina y ácido peptínico. El papel de la fibra dietética es bajar los niveles de colesterol en sangre. La celulosa tiene efecto directo en la utilización de nutrientes. La utilización de ingesta de proteína disminuye cuando la ingesta de celulosa aumenta, la cual esta presente en la fibra dietética.

### ***1.7.1. AZÚCARES EN EL PROCESO DE LA FERMENTACIÓN DE ALIMENTOS***

El uso de microorganismos para proveer la calidad de alimentos ha sido conocido por muchos años. El propósito del crecimiento microbiano es el convertir algunos de los compuestos, especialmente los carbohidratos, durante la fermentación; dichos productos son los azúcares ya conocidos y otros compuestos como: ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido pirúvico y etanol, entre otros. Estos procesos han sido usados en la producción de diferentes alimentos como productos lácteos, sauerkraut, salmueras, salsas y cerveza.

Los productos de la fermentación pueden prolongar la vida de anaquel y mejorar la textura. En este trabajo se discutirá cómo algunos carbohidratos son metabolizados durante la fermentación sólida, en presencia de oxígeno.

Durante la fermentación el microorganismo inoculado convierte algunos de los compuestos orgánicos en productos de fermentación. La primera parte de esta conversión se relaciona con la producción de energía, normalmente en la forma de adenosín trifosfato. La energía producida por la degradación de compuestos orgánicos es usada para la síntesis de los compuestos, como proteínas y lípidos.

El tipo de producto principal formado en la fermentación depende de los compuestos orgánicos que se comienzan a degradar y de la conversión de los microorganismos sobre estos. Sin embargo esto depende de diversos factores como el pH, temperatura, contenido de oxígeno, contenido de agua, fuerza iónica, el potencial de reducción del sistema y su estructura.

### **1.7.2. SUSTRATOS**

Los microorganismos tienen algunas preferencias con respecto a la fuente de carbono. Esta preferencia puede ser utilizando en primer orden a los monosacáridos, luego los disacáridos, oligosacáridos, alcoholes, ácidos orgánicos y compuestos nitrogenados. La mayoría de los sistemas en los cuales los procesos de fermentación toman lugar contienen carbohidratos de forma natural o bien en ocasiones esta fuente de carbono es adicionada en el proceso de fermentación. Entre los sustratos más comunes se encuentran la glucosa y la sacarosa.

### **1.7.3. MONOSACÁRIDOS**

Los monosacáridos más importantes en la fermentación de alimentos son glucosa y fructosa, ellos son metabolizados a la par por los microorganismos, provocando reacciones muy diferentes. Existen diferentes tipos de fermentación para las hexosas entre ellas se encuentran: respiración aeróbica en donde la hexosa es oxidada completamente a CO<sub>2</sub>, en su mayoría no es utilizada en los sistemas de fermentación.

Metabolismo homofermentativo: este es el proceso de fermentación responsable de la mayoría de las producciones de ácido láctico, ya que se produce al 100% este producto, ésta es realizada por bacterias lácticas.

Metabolismo heterofermentativo: una de las fermentaciones de este tipo es cuando se produce ácido acético o etanol, ácido láctico y CO<sub>2</sub>, esta conversión se puede llevar con diferentes tipos de bacterias lácticas heterofermentativas.

Formación anaeróbica de ácido butírico: finalmente una de las reacciones anaeróbicas que no son deseadas ya que producen un olor desagradable y por que además indica la presencia de algunas especies de *Clostridium sp* que puede producir toxinas.

#### **1.7.4. DI Y OLIGOSACÁRIDOS**

Estos productos son hidrolizados a monosacáridos y después metabolizados, algunos disacáridos únicamente pueden ser hidrolizados por pocos microorganismos, como el caso de la lactosa. Lo mismo ocurre con algunos oligo- y polisacáridos (Koivistoinen, 1980).

#### **1.8. OLIGOSACÁRIDOS**

Polímeros que son carbohidratos compuestos por menos de diez monosacáridos unidos se designan oligosacáridos. Son cristalinos y generalmente poseen sabor dulce, aunque el grado de dulzor es variable. Se pueden subdividir con base en el número de monosacáridos. En la Tabla III se muestran algunos oligosacáridos importantes nutricionalmente (Muller, 1989).

**TABLA III:** Algunos oligosacáridos importantes, sus monosacáridos constituyentes y sus enlaces.

NOMBRE	CONSTITUYENTES MONOSACÁRIDOS EN ORDEN DE UNIÓN.	ENLACES (EN ORDEN)
<u>Disacáridos:</u>		
Sacarosa	Glucosa – fructosa	$\alpha$ 1,2
Maltosa	Glucosa – glucosa	$\alpha$ 1,4
Lactosa	Glucosa – galactosa	$\beta$ 1,4
Isomaltosa	Glucosa – glucosa	$\alpha$ 1,6
<u>Trisacáridos:</u>		
Rafinosa	Galactosa – glucosa – fructosa	$\alpha$ 1,6 $\alpha$ 1,2
<u>Tetrasacáridos:</u>		
Estaquiosa	Galactosa – galactosa – glucosa - fructosa	$\alpha$ 1,6 $\alpha$ 1,6 $\alpha$ 1,2

Oligosacáridos que dan de 2 a 8 unidades de monosacáridos cuando se hidrolizan. Los más conocidos son los disacáridos, dímeros que constan de dos monosacáridos y estos pueden ser iguales o distintos. Los disacáridos se unen por medio de un enlace de glucosídico del grupo -OH de un monosacárido con el carbono anomérico del otro.

Se han realizado muchos estudios tratando de encontrar las causas y los componentes que originan las flatulencias y todos ellos han concluido que los oligosacáridos tales como la rafinosa y la estaquiosa son altamente responsables de la flatulencia. Las flatulencias han sido asociadas en especial con las leguminosas, debido a su alto contenido de oligosacáridos, en especial los de la familia de la rafinosa, a la cual se le atribuye dicho efecto con ayuda de la microbiota microbiana nativa que se encuentra en la parte baja del ileon y en el colon.

El efecto flatulento es debido a la ausencia, en la mucosa intestinal, de la enzima  $\alpha$ -1,6 galactosidasa en el hombre y en los animales monogástricos. Esta se sintetiza en el reino vegetal y por algunos microorganismos, principalmente anaerobios. Existen otros alimentos que también se les asocia con la formación de gases como algunos tubérculos, papa, cebolla y calabaza, algunas frutas como manzana, naranja, fresas y tomates. La leche y el huevo han sido incluidos dentro de la lista de alimentos flatulentos ya que se cree que los alimentos con un alto contenido de grasa y lactosa ó elaborados con éstos también pueden formar gases.

Al igual que otras características de las leguminosas la concentración y composición de oligosacáridos de rafinosa difieren dependiendo de la especie de la planta y estas variedades presentan diferentes potenciales en la producción de flatulencias. La fracción de carbohidratos de las leguminosas incluye monosacáridos (ribosa, glucosa, galactosa y fructosa), disacáridos (sacarosa y maltosa) y oligosacáridos de la familia de la rafinosa (rafinosa, estaquiosa y verbascosa) en las cuales la galactosa está presente en las uniones  $\alpha$ -D-1,6, estos oligosacáridos son bien conocidos por producir flatulencia en humanos y animales.

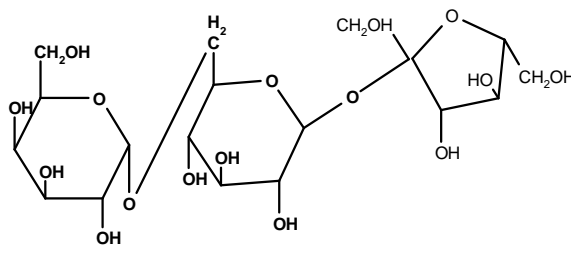
Por lo tanto para utilizar leguminosas como fuente aceptable y económica de proteínas, es deseable reducir el nivel de compuestos productores de flatulencia. La presencia de los oligosacáridos es mayor en las leguminosas que en los cereales, siendo los principales sacarosa, estaquiosa y verbascosa (Fennema, 2000).

Estos también son llamados como  $\alpha$  – Galactósidos, tienen una función importante en los granos de muchas plantas. En un reporte por Muzquiz, (2005) y Bernal, (1992), algunos de estas funciones son iniciar un almacenamiento y mecanismo de transporte para carbohidratos, así mismo la autoprotección de efectos tóxicos de lectinas y otras toxinas y finalmente favorecen la rehidratación de la semilla durante la germinación.

## 1.9. RAFINOSA Y ESTAQUIOSA

### 1.9.1. RAFINOSA

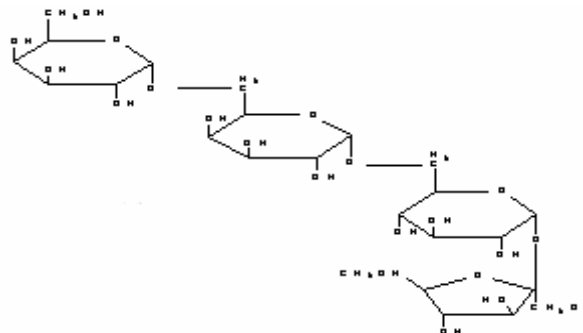
$C_{18}H_{32}O_{16} \cdot 5 H_2O$ ; tiene un peso molecular de 504.44 g/mol. Es un trisacárido conformado por un mol de D-galactosa, D-glucosa y D-fructosa. En su forma pentahidratada forma cristales, con una densidad de 1.465 g/ml, un punto de fusión de 80°C; un gramo de rafinosa se disuelve en 7ml de agua, en 10ml de metanol. Tiene una rotación óptica +104,5 grados. Además es soluble en piridina y ligeramente soluble en alcohol. De esta manera no es un azúcar reductor y no forma una osazona.



**Figura 1:** Estructura de la rafinosa.

### 1.9.2. ESTAQUIOSA

$C_{24}H_{42}O_{21}$ , tiene un peso molecular de 666.583 g/mol. Es un tetrasacárido,  $\beta$ -D-fructofuranosil-O- $\alpha$ -galactopiranosil-(1-6)-O- $\alpha$ -D-galactopiranosil-(1-6)- $\alpha$ -D-glucopiranosido. En su forma hidratada se encuentra en cristales con un punto de fusión de 101-105 °C; índice de refracción de 131.3; un gramo se disuelve en 4.5 ml de agua y en 3.8ml de etanol. Se a aislado del vástago de jazmín blanco, semillas de lupino amarillo, soya, lentejas y fresno mana (Van Buren, 1994 y Ruiz Terán, 1999).



**Figura 2:** Estructura de la estaquirosa.

Estos azúcares no pueden ser hidrolizados y absorbidos por animales monogástricos porque está ausente la enzima  $\alpha$ -galactosidasa en el intestino delgado. Existen microorganismos en el intestino largo que utilizan estos azúcares, provocando la producción de flatulencias ( $H_2$ ,  $CO_2$  y pequeñas cantidades de  $CH_4$ ), provocando dolor abdominal, diarrea y otras molestias.

Extensos estudios han concurrido en la determinación del contenido de los factores que causan flatulencia, se han estudiado los procesos post-cosecha así como otros métodos como el remojo, la cocción, la germinación, la irradiación y el tratamiento con la enzima  $\alpha$ -galactosidasa en los niveles de factores de flatulencia.

Se ha encontrado que el efecto de remojo y de cocción y la adición de la enzima cruda ( $\alpha$ -galactosidasa) son tratamientos que han reducido significativamente los factores de flatulencia así como la eliminación o reducción de los niveles de oligosacáridos (Pugalenthi, 2006). Por otra parte existen una serie de estudios enfocados al análisis de estos oligosacáridos como sustancias que proveen efectos benéficos a la salud y como medios de sobrevivencia de probióticos en productos lácteos (Martínez, 2006).



### **1.10. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)**

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) es también conocida como de alta eficiencia, es una de las técnicas más útiles y en la actualidad la más utilizada para la identificación y determinación cuantitativa de los azúcares de los alimentos. Debido a que los azúcares no absorben la luz a las longitudes de onda del ultravioleta, por lo tanto el único método directo es el índice de refracción (IR). Sin embargo existen otros métodos como el detector de masas y es aproximadamente 40 veces más sensible que el IR, sin embargo su uso es muy limitado por utilizar estándares en un intervalo de concentración corto.

La separación por HPLC se efectúa en su mayoría por cromatografía de intercambio de cationes fuertes o mediante columnas de sílice modificado con aminas y la separación en éstas se realiza en un orden creciente del peso molecular, utilizando fase móvil de acetonitrilo-agua normalmente en una proporción de 80:20 o 75:25.

El HPLC de fase invertida donde se usa un gel de sílice modificado de C18 con agua como fase móvil parece ser una técnica factible para la determinación de oligosacáridos, en donde las cadenas laterales más cortas disminuyen la resolución y los tiempos de retención.

También se han reportado estudios con resinas de intercambio catiónico, como por ejemplo la forma cálcica desarrolladas sobre poliestireno o sílice, usando agua o  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 0.01% como fase móvil y se opera a  $85^\circ\text{C}$ . De esta manera los azúcares son eluidos en orden descendente del peso molecular con la fructosa después de la glucosa, de tal forma que si en las columnas se corren a temperaturas más bajas se puede causar un ensanchamiento de los picos. Esto se debe a separaciones de la forma anomérica del azúcar.

### **1.11. ANÁLISIS DE AZÚCARES EN HPLC**

Los primeros análisis de azúcares que se han realizado fueron por medio de la cromatografía en papel. La primera columna usada para la separación de estos compuestos fue la filtración en gel y después fueron remplazados por el intercambio iónico, pero presentaban la desventaja de poseer largos tiempos de análisis y requerir altas temperaturas. Después de estos se comenzaron a utilizar las fases polares químicamente enlazadas, principalmente el amino como fase normal y a su vez debe ser una fase compatible con una gran variedad de fases móviles polares en donde el agua es el componente mayoritario, para lograr la solubilidad de los azúcares.

En la mayoría de los reportes en donde se utiliza una columna de este tipo para realizar la separación de los azúcares se utiliza una como fase móvil una mezcla de acetonitrilo-agua en una proporción de 80:20 ó 75: 20 para azúcares simples y hasta una proporción de 60:40 para oligosacáridos (Muzquiz, 1992 y Yin, 2006).

Los carbohidratos también se pueden separar por intercambio iónico ya que es un método bien establecido que se ha visto favorecido por el desarrollo y la tecnología de nuevas técnicas de separación.

Por otra parte se tiene la separación de mezclas de carbohidratos por intercambio de ligantes usando resinas de intercambio iónico poliméricas cargadas con iones metálicos como calcio para alcoholes de azúcares y de plata para los polímeros de los carbohidratos, utilizando en ambos casos agua desionizada o soluciones de disolventes orgánicos como fase móvil.

La retención en este caso se lleva a cabo por una combinación de exclusión estérica y atracción electrostática entre el átomo de oxígeno electronegativo y los cationes del metal electropositivos. Por otro lado los carbohidratos son ácidos débiles (pKa 11.9-12.5) por lo tanto pueden ser separados por cromatografía de intercambio aniónico utilizando empaques con un pH mayor de 12 y soluciones acuosas de hidróxido de sodio como eluyente. En los carbohidratos se espera una carga negativa singular por unidad de sacárido y eluyen en orden al incremento en su tamaño y al grado de ionización efectiva.

Además existe otra manera de separar azúcares para su identificación. Tal es el caso del uso de columnas con sílices aminadas en donde los principales azúcares en alimentos se lleva a cabo utilizando agua y acetonitrilo como eluyente. En estos casos al aumentar la polaridad de la fase móvil disminuyen los tiempos de retención.

Se ha reportado que en las columnas aminadas: los azúcares son retenidos porque sus grupos hidroxilos reaccionan con los grupos amino de la columna; la retención aumenta con el tamaño molecular del azúcar en donde hay mas retención para las aldosas que para las cetosas, finalmente la fuerza de la fase móvil se incrementa con el aumento en la proporción de agua el componente mas polar de la mezcla.

Sin embargo la diversidad de tipos de carbohidratos como los monosacáridos que comprenden aldosas y cetosas, así como la combinación de estos monosacáridos para tener di, tri y oligosacáridos ha llevado al desarrollo de metodologías y de la tecnología para la identificación de cada uno de los mismos.

A pesar de la gran cantidad de estudios realizados no se han establecido las condiciones adecuadas para el análisis simultáneo de los diferentes azúcares en una mezcla tan compleja como lo son los alimentos.

Pero existen lineamientos generales para el análisis de azúcares en alimentos por cromatografía de líquidos, no existe un método universal por lo que dependiendo del alimento o producto a analizar se deben seleccionar cuidadosamente la columna y las condiciones a emplear así como el tratamiento de la muestra.

Las leguminosas se han utilizado en función de su composición de forma directa como ingredientes de las dietas o como compuestos para animales y en otras ocasiones en la obtención de aceites vegetales y en la preparación de concentrados de proteína y como ya se ha mencionado su contenido de compuestos antinutricionales dificultan su utilización. El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es una de las principales leguminosas con grandes propiedades proteicas y en nuestro país el consumo de esta leguminosa se a reducido.

Es por esto que actualmente se busca la aplicación de tecnologías, como la fermentación sólida con *Rhizopus oligosporus*, que permitan obtener productos con un mayor contenido de proteínas y en donde se destruyan o disminuyan dichos factores antinutricionales, como la rafinosa y estaquiosa, así mismo fomentar su acompañamiento en las dietas más comunes. De tal modo que se favorezca el aprovechamiento nutritivo del garbanzo porquero, satisfaciendo las necesidades del consumidor.

## **1. OBJETIVOS**

### **1.1. OBJETIVO GENERAL**

- Estudiar el efecto de la fermentación sobre los oligosacáridos antinutricionales (rafinosa y estaquiosa) en garbanzo, durante la fermentación de tempe.

### **1.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

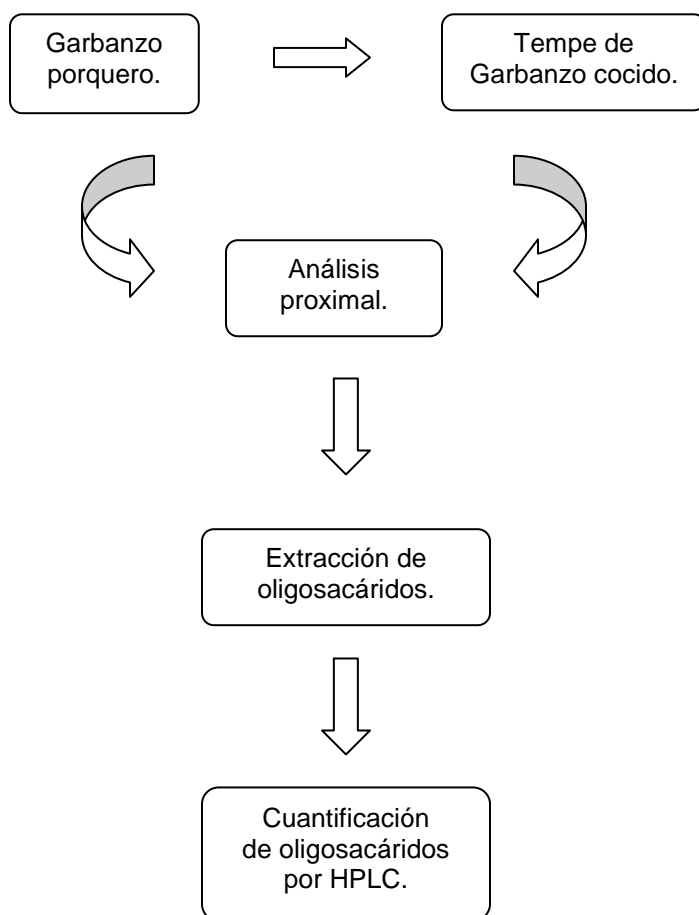
- Determinar el efecto del remojo de garbanzo sobre la disminución de los oligosacáridos (rafinosa y estaquiosa).
- Establecer el efecto de la fermentación, utilizando *Rhizopus oligosporus* sobre la disminución de los azúcares.
- Establecer las condiciones para la fermentación sólida con garbanzo y *Rhizopus oligosporus*.

## 1. MATERIALES Y MÉTODOS

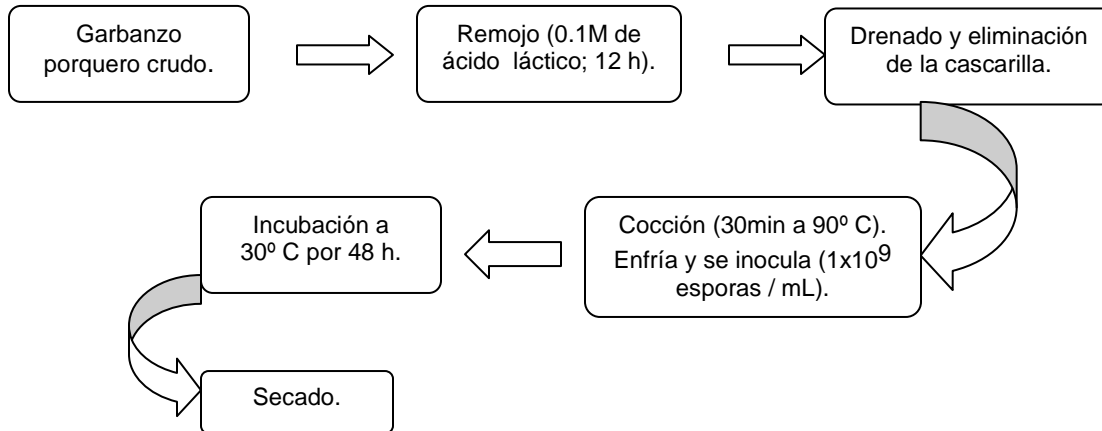
### 1.1. DIAGRAMA GENERAL

Diagrama general para la evaluación del contenido de oligosacáridos antinutricionales en la fermentación sólida del garbanzo.

**Figura 3: DIAGRAMA GENERAL**



**Figura 4: DIAGRAMA PARA LA ELABORACIÓN DE TEMPE**



### 1.2. DATOS DE LA MUESTRA

El garbanzo utilizado en este experimento es garbanzo de la variedad porquero, destinado en su totalidad al consumo animal esta variedad. Se obtuvo directamente de la Central de Abastos en la ciudad de México, DF., bajo condiciones de almacenamiento en bodega para su venta al consumidor. Esta variedad proviene de la región de Sinaloa, México.

### 1.3. MICROORGANISMOS

La cepa de esporas de *Rhizopus oligosporus*, fue proporcionada por el cepario de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional Autónoma de México.

#### **1.4. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE ESPORAS**

Se tomaron 100  $\mu$ l de esta suspensión, los cuales fueron sembrados en cajas petri que contenían agar papa dextrosa. Las cajas fueron incubadas a 30° C durante cinco días. Después de este tiempo el microorganismo produce cantidades importantes de esporas como se muestra en el Anexo I, las cuales fueron colectadas, con agua estéril y con perlas de ebullición para lograr la separación total de las esporas del micelio. Las cajas se agitaron con movimientos circulares y los sobrenadantes se colectaron en microtubos; éstos se centrifugaron durante 5 min a 10,000 rpm, en una centrifuga IEC CENTRA-M, el sobrenadante se retiró las esporas y se resuspendieron en agua estéril. Las esporas se almacenaron a 4° C en refrigeración hasta su uso.

#### **1.5. MEDICION DEL CRECIMIENTO DE R. oligosporus SOBRE LOS GRANOS DE GARBANZO.**

Para la evaluación del crecimiento de *Rhizopus oligosporus* sobre los cotiledones de garbanzo se realizó una comparación con el crecimiento de éste sobre los granos de soya, debido a que esta fermentación ha sido ampliamente estudiada.

No se realizó la medición de biomasa por lo que se elaboró una escala hedónica, dentro de la cual se evaluó el crecimiento del hongo sobre la matriz.

De esta manera se estableció que un crecimiento óptimo de *R. oligosporus*, se alcanza cuando los cotiledones son totalmente cubiertos por el micelio del hongo y forman una torta blanca y compacta, sin olores desagradables; un crecimiento no óptimo de éste sobre garbanzo es cuando no se forma una torta compacta y hay existencia de olores desagradables que no son característicos de una fermentación por *R. oligosporus*.



## **1.6. ACONDICIONAMIENTO DEL SUSTRATO**

A partir del grano de garbanzo porquero, se procedió a realizar la limpieza del grano, posteriormente se pesaron lotes de 150 g y fueron almacenados en bolsas de polietileno a temperatura ambiente hasta su utilización. Se realizaron diferentes pruebas para la determinación de las condiciones óptimas de crecimiento del hongo sobre la matriz de garbanzo. De la misma manera se procedió con los granos de soya, a la limpieza y separación en lotes de 150 g y almacenados en bolsas de polietileno.

### **1.6.1. EFECTO DE LA COCCIÓN Y ESCALDADO SOBRE EL CRECIMIENTO DE R. oligosporus.**

La cocción es importante para destruir microorganismos indeseables, el inhibidor de tripsina y liberar nutrientes requeridos por el moho. Se utilizó un lote de 150 g de garbanzo. Se realizó el remojo en 450 mL de la solución de ácido láctico 0.1M, por 12 h, se eliminó la cascarilla manualmente.

Posteriormente se realizó un escaldado a 90° C por 10 min, en 300 mL de agua desionizada, se dejaron enfriar y se inocularon con  $1 \times 10^9$  esporas/mL, finalmente se colocaron en bolsas de polietileno y se incubaron a 30° C por 48 h. Por otro lado se colocó otro lote de 150 g de garbanzo en 450 mL de solución de ácido láctico, posteriormente fueron drenados y se colocaron en 300 mL de agua desionizada a 90° C por 30 minutos. Por separado, se realizó un lote con un escaldado a 90° C por 20 min, enseguida se drenó el agua, se eliminó la cascarilla de los cotiledones de manera manual, se inoculó con 1 mL de la suspensión en agua desionizada de  $1 \times 10^9$  esporas/mL, se colocó el lote en bolsa de polietileno y se incubó a 30° C por 48 h.

**1.6.2. EFECTO DE LA ADICIÓN DE FUENTE DE NITRÓGENO SOBRE EL CRECIMIENTO DE R. oligosporus.**

En esta etapa se utilizaron diferentes fuentes de nitrógeno considerando la posibilidad de la falta de este nutriente en la matriz de garbanzo porquero, para favorecer el crecimiento del moho. Se utilizaron como fuentes de nitrógeno sulfato de amonio, extracto de levadura y peptona en una concentración del 0.1% (p/p). En esta etapa se tomaron lotes de 150 g, estos lotes fueron remojados en 350 mL de solución de ácido láctico 0.1M por 12 h, se eliminó la cascarilla de los granos manualmente, además se utilizó un escaldado a 90° C por 10 minutos, sustituyendo la cocción del garbanzo. Se inocularon con la misma concentración de esporas que en los casos anteriores, se colocaron en una bolsa de polietileno y así mismo se realizó la incubación a 30° C.

**1.6.3. EFECTO DE LA MEZCLA CON SOYA Y GARBANZO (50-50) SOBRE EL CRECIMIENTO DE R. oligosporus.**

Se realizó una mezcla de soya-garbanzo al 50% para favorecer el crecimiento del micelio sobre el garbanzo.

Se eligieron los granos de soya debido a que en esta matriz se ha estudiado y observado el crecimiento adecuado. Por separado, ambas matrices se remojaron en un volumen de 450 mL de solución de ácido láctico 0.1M durante 12 h, se les eliminó la cascarilla manualmente y se sometieron a cocción en dos volúmenes de agua a 90° C por 30 minutos, se dejaron enfriar y posteriormente se mezclaron en un vaso de precipitados al 50%, es decir, se mezclaron 75 g de cada leguminosa, la mezcla se inoculó con 1 mL de de la suspensión de esporas en agua desionizada, con una concentración de  $1 \times 10^9$  esporas / mL e incubó a 30° C por 48 h.

**1.6.4. EFECTO DEL REMOJO DEL GARBANZO EN ÁCIDO LÁCTICO Y ÁCIDO ACÉTICO, SOBRE EL CRECIMIENTO DE R. oligosporus.**

El remojo en solución ácida a temperatura ambiente se realizó con la finalidad de que los granos absorbieran agua, la acidez se alcanza a un intervalo de pH 4.0-5.0 con el cual se inhibe el crecimiento de bacterias indeseables, favoreciendo a la vez el crecimiento del hongo sobre la matriz.

De acuerdo con Steinkraus (1995) el remojo de granos de soya se realiza con una solución de ácido láctico 0.1M, de acuerdo con esto, en esta etapa se realizó la fermentación de un lote de soya (150 g) y un lote de garbanzo (150 g), por separado. El remojo se realizó en 3 volúmenes con respecto al peso del lote, es decir, se remojó en 450 mL de ácido láctico 0.1M, por 12 h. Por otro lado se colocaron dos lotes más, uno de soya y otro de garbanzo, en 3 volúmenes de la solución de ácido acético 0.1M durante 12 h.

Posteriormente se drenaron los granos, se eliminó de manera manual la cascarilla, en seguida se colocaron en 2 volúmenes de agua destilada a 90° C por 30 min, se enfriaron los cotiledones y se inocularon con 1 mL de la suspensión en agua desionizada de  $1 \times 10^9$  esporas / mL. Se incubaron a 30° C por 48 h.

**1.7. ELABORACIÓN DE TEMPE DE GARBANZO**

Una vez establecidas las condiciones óptimas para el crecimiento del hongo; la elaboración del tempe se realizó según el procedimiento presentado en la figura 1. El lote de los granos enteros de garbanzo (150 g) se remojaron durante 12 h en un volumen de 450 mL de solución de ácido láctico 0.1M a 25° C, los granos fueron drenados y se eliminó la epidermis manualmente.

Los cotiledones se colocaron en un volumen de agua destilada de 300 mL a 90° C durante 30 min. Se enfriaron a temperatura ambiente (25° C) y se inocularon con 1 mL de la suspensión en agua desionizada con  $1 \times 10^9$  esporas/mL de *Rhizopus oligosporus*, posteriormente se colocaron en bolsas de polietileno. La fermentación en estado sólido se realizó a 30° C por 48 h. Al finalizar la fermentación las muestras se secaron por medio de la liofilización (LABCONCO).

### **1.8. ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL**

El análisis proximal se realizó siguiendo las técnicas en el AOAC (1995). Las determinaciones realizadas fueron humedad, cenizas, proteína cruda y grasa cruda, los carbohidratos totales fueron determinados por diferencia. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado. Los oligosacáridos (rafinosa y estaquiosa) fueron extraídos de acuerdo con la técnica de Sánchez-Mata, 1998.

#### **1.8.1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA CRUDA**

La determinación se basa en el Método de Kjeldahl y consiste en una oxidación de la materia orgánica por la acción del  $H_2SO_4$ ,  $H_3PO_4$  Y  $H_2O_2$  y como resultado de ésta se forma  $CO_2$ ,  $H_2O$  Y  $N_2$  el cual se transforma en  $NH_4HSO_4$ . La reacción es catalizada por el  $Cu(CuSO_4 \cdot 5H_2O)$ . Para liberar el  $NH_3$  se usa álcali fuerte (NaOH al 60 %), el  $NH_3$  es recibido en ácido bórico y mediante una titulación con HCl 0.01 N se determina la cantidad que reaccionó con el ácido bórico formando el borato de amonio.

Se pesó en una balanza analítica (OHAUS, AP1105) de 100 –500 mg de muestra en un papel delgado (libre de nitrógeno). Se colocó la muestra en los tubos de digestión, se agregaron el catalizador y 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Digestión: Se colocó el tubo en el digestor a la temperatura de 420° C, se trabajó en la campana encendida, se calentó hasta total destrucción de la materia orgánica, es decir hasta tener coloración azul-verdosa. Se enfrió a temperatura ambiente. Destilación: Se conectó el tubo al equipo de destilación y se agregó 50 mL de NaOH al 40 %. Se recolectó un volumen de 100 mL en 50 mL de ácido bórico al 4% con indicadores. Finalmente se tituló con solución valorada de HCl 0.1N.

**Cálculos:**

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(\text{mL gastados} - \text{mL blanco}) (N_{\text{HCl}}) (0.014)}{\text{peso de muestra}} * 100$$

El nitrógeno obtenido se multiplicó por el factor 6.25 para obtener el contenido de proteína cruda de las muestras.

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ N} \times 6.25$$

**1.8.2. DETERMINACIÓN DE GRASA**

La determinación se basa en la solubilidad de la grasa cruda en éter, la cantidad de material extraído de una muestra mediante reflujo con éter se denomina extracto etéreo o grasa cruda. Existe una gran cantidad de compuestos orgánicos que se encuentran en el extracto etéreo y solo algunos tienen interés nutricional, como los ácidos grasos y sus ésteres, vitaminas liposolubles y pro vitaminas tales como los carotenos.

Se colocó a peso constante un matraz de bola de fondo plano con perlas de ebullición en la estufa (RIOSSA) a 100° C aproximadamente 2 h. Todo el material y el equipo se pesaron en una balanza analítica (OHAUS, AP1105). Por separado se pesaron de 4 – 5 g de muestra en una balanza sobre un papel poroso enrollado y se colocó en un cartucho de celulosa, éste fue tapado con un algodón y finalmente se colocó en el equipo del extractor.

Se conectó el matraz al extractor y éste al refrigerante. Se agregaron dos cargas de disolvente (éter etílico) por el refrigerante y se calentó al matraz con parrilla a ebullición suave. Para verificar que se ha extraído toda la grasa se dejó caer una gota de la descarga sobre papel filtro y al evaporarse el disolvente no se observó residuo de grasa. Una vez que se extrajo toda la grasa se quitó el cartucho con la muestra desengrasada y se continuó calentando hasta casi la total eliminación del disolvente recuperándolo antes de que se descargue. Por último se quitó el matraz y se secó el extracto a 100° C por 30 min, se dejaron secar las muestras para finalmente pesar cada muestra.

### **Cálculos:**

$$\% \text{ de grasa cruda} = [(A - B) \times 100] / M$$

Donde:

A = peso del matraz con residuo lipídico (g)

B = peso constante del matraz (g)

M = peso de la muestra (g)

### 1.8.3. DETERMINACIÓN DE CENIZAS

La determinación se basa en la incineración de la materia orgánica a una temperatura de 500 - 550° C, obteniéndose así las cenizas que comprenden el material inorgánico (minerales). Se colocaron a peso constante los crisoles, para lo cual se colocaron en una mufla (Neyo M-525, series II) a una temperatura de 500 – 550° C, se marcaron con lápiz o cualquier marcador que no se elimine durante el proceso de incineración. El crisol se pesó inicialmente en una balanza (marca OHAUS, AP1105), enseguida se colocaron de 2–5 g de muestra, se colocaron en la campana y con la ayuda de una estufa eléctrica. Se carboniza, hasta entonces se coloca dentro de la mufla.

El tiempo de permanencia en la mufla es variable, en este caso el tiempo fue de 5 a 6 horas. Se consideró que la determinación ha terminado cuando se observó unas cenizas de color homogéneo (grises o blancas) sin puntos negros, además de estar a peso constante. Si se observaron puntos negros es recomendable agregar unas gotas de agua a las cenizas frías y nuevamente colocarlas en la mufla hasta observar homogeneidad en el color.

#### Cálculos:

$$\% \text{ Cenizas} = [(P_f - P_i) / m] \times 100$$

Donde:

$P_f$  = peso del crisol con las cenizas

$P_i$  = peso del crisol a peso constante

$m$  = peso de la muestra en gramos

#### **1.8.4. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD**

La determinación se basa en el material perdido (por evaporación de agua) por la muestra durante el calentamiento a una temperatura no mayor a la de ebullición del agua, o al ponerlo en contacto con un agente deshidratante.

Se colocaron a peso constante los pesa filtros, en una estufa a una temperatura de 65 –110° C (marca RIOSSA) por dos horas. Se pesaron aproximadamente 2 g de las muestras en una balanza analítica (marca OHAUS, AP1105), se colocaron por 2 h en la estufa a 100 – 105° C, después se retiraron de la estufa y se colocaron en un desecador durante 15 minutos, finalmente se pesaron las muestras secas.

#### **Cálculos:**

$$\% \text{ humedad} = [(P_f - P_i) / m ] \times 100$$

Donde:

P<sub>i</sub> = peso del pesa filtro a peso constante con muestra antes de secar

P<sub>f</sub> = peso del pesa filtro con muestra después de secar

m = peso de muestra.

Las determinaciones se realizaron por triplicado, los cálculos del análisis proximal se realizaron como se muestra en cada una de las determinaciones y en el Anexo II, se muestra el cuadro de resultados por cada determinación.



### **1.9. EXTRACCIÓN DE LOS AZÚCARES**

La extracción de los azúcares (rafinosa, estaquiosa y fructosa) se llevó a cabo teniendo en cuenta las siguientes recomendaciones: los azúcares son higroscópicos y los estándares deben secarse antes de ser utilizados, la temperatura de las muestras no debe exceder los 80° C para evitar hidrólisis durante la extracción. Una vez elegido el método a utilizar es necesario determinar el porcentaje de recuperación.

Los azúcares fueron extraídos de la siguiente manera: se tomó cerca de 1.5 g de muestra, tanto para garbanzo porquero como para muestra de tempe, previamente molidas, se colocaron en matraces elermeyer de 100 mL, se agregaron 40 mL de la mezcla de etanol-agua (80:20); se colocaron en baño maría a una temperatura de 55-60° C y se mantuvieron con agitación magnética por 45 minutos.

Se colectaron los remanentes de cada extracción por muestra, cada una de ellas se llevó a centrifugación a 1,900 g (3000 rpm) durante 30 min; nuevamente los sobrenadantes se colectaron por muestra y se filtraron, finalmente se eliminó el etanol con la ayuda de un rotavapor (Büchi Rotavapor R-205). En último lugar los residuos en el matraz se llevaron a un aforo de 5 mL en una mezcla de acetonitrilo-agua-metanol (25:20:55). Se tomó 1 mL de esta solución para inyectar la muestra en el cromatógrafo (Waters 1525, binary HPLC pump, Perkinelmer LC-30 RI detector).

La extracción se realizó por triplicado, los cálculos para obtener los resultados se presentan en el Anexo III.

**1.10. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LOS AZÚCARES (RAFINOSA Y ESTAQUIOSA), POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.**

El desarrollo de la metodología y la elección de una columna para la cuantificación de estos azúcares requirieron de utilizar diferentes columnas, se realizaron una serie de métodos y se probaron:

- Columna aminada -NH<sub>2</sub>, con esta columna se corrieron una serie de inyecciones con un flujo de 1.0 ml / min.; Temperatura de 30° C; fase móvil acetonitrilo:agua (30:70).
- Columna aminex 87H, con esta columna se utilizó como fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 0.1%: acetonitrilo, en diferentes concentraciones desde 95:5, 90:10, 85:15, con un pH de 2.2, en un flujo constante de 1 mL / min a una temperatura ambiente y una temperatura de 80°C.
- Columna Nova-Pack en este caso se utilizó un gradiente de flujo de fase móvil, se probaron corridas con 0.5 a 1.0 mL / min, usando agua a temperatura ambiente. Se utilizó otra fase móvil que fue metanol:acetonitrilo y también se probó con metanol:agua, se realizaron en proporciones de 20:80; 75:25; 70:30 a temperatura ambiente. Al igual que se utilizó una fase móvil en este caso es agua y usando gradientes del flujo desde 0.9 hasta 0.7 mL / min.
- Columna simetric empacada con C18 5µm, utilizando una fase móvil de acetonitrilo:agua en una proporción de 20:80, en esta columna se probó con gradientes de tiempo y de la proporción en un tiempo de 1-6 minutos comenzando de 50:50 hasta terminar en 80:30 de acetonitrilo:agua; flujo de 0.8mL / min.

Con base en los resultados de estas pruebas y la revisión de la bibliografía de años recientes, finalmente se decidió utilizar una columna aminada, con base a la referencia de (Yin J., et al., 2006) se probó como alternativa la columna Bondapack- NH<sub>2</sub> (300mm x 3.9 mm) utilizando una fase móvil acetonitrilo-agua-metanol (25:20:55) a un flujo de 1.0 mL / min a temperatura ambiente.

Finalmente con esta columna aminada se lograron identificar la fructosa, la rafinosa y la estaquiosa. Las soluciones de los estándares fueron preparadas en 1000 µL de la fase móvil (acetonitrilo: agua: metanol), en la misma proporción 25:20:55; posterior a esto, se inyectaron 100 µL de las soluciones de fructosa, rafinosa y estaquiosa por separado y por triplicado de cada concentración.

Las concentraciones se muestran en la tabla IV, de acuerdo con los reportes de Sanchez-Mata, 1998; se procedió a realizar las curvas de calibración usando el método de estándar externo.

**TABLA IV:** Concentraciones para la curva patrón de los estándares.

<b>AZUCARES</b>		
<b>ESTAQUIOSA (g/ml)</b>	<b>RAFINOSA (g/ml)</b>	<b>FRUCTOSA (g/ml)</b>
0.0016	0.0018	0.0026
0.0047	0.0033	0.0103
0.0268	0.011	0.0734
0.0402	0.0203	0.1118

Para determinar la eficiencia del método de extracción de los oligosacáridos se procedió a realizar los ensayos de recuperación, para lo cual se agregaron cantidades conocidas del estándar de fructosa (0.0578, 0.0587 y 0.0576 g) a tres muestras de garbanzo (1.5 g). Las curvas de calibración de los estándares se muestran en el Anexo IV, así como un ejemplo de cálculo para determinar la concentración de estos azúcares.

La fructosa fue considerada en este caso ya que se ha reportado que es el azúcar en mayor concentración en garbanzo y está presente en un intervalo de 0.200 – 0.280 g/100g (Sánchez, 1998). Las imágenes de los cromatogramas se muestran en el Anexo III.

Después de la adición de este estándar el método de extracción se llevó a cabo bajo las mismas condiciones de extracción del resto de los azúcares, así mismo se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos (Waters 1525, binary HPLC pump, Perkinelmer LC-30 RI detector) 100 µl de estas extracciones bajo las mismas condiciones cromatográficas de los estándares y el resto de las muestras de garbanzo sin fructosa, se analizaron en una columna Bondapack- NH<sub>2</sub> (300mm x 3.9 mm) utilizando una fase móvil acetonitrilo-agua-metanol (25:20:55) a un flujo de 1.0 mL / min a temperatura ambiente.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. **CRECIMIENTO DE *R. oligosporus* SOBRE GARBANZO**

Durante esta primera etapa se determinaron las mejores condiciones para el crecimiento del hongo sobre la matriz de garbanzo. De acuerdo con escala hedónica que se realizó: la figura 5 representa una fermentación sólida con óptimo crecimiento del micelio sobre la matriz. En esta fermentación se observa una torta blanca, compacta y presenta olor característico de la fermentación con *R. oligosporus*, este fue el primer punto establecido en la escala hedónica; en este caso hablamos de la fermentación de la matriz de garbanzo, realizado bajo las condiciones indicadas en la figura 5.



**Figura 5:** Apariencia del crecimiento óptimo de *R. oligosporus*, sobre los cotiledones de garbanzo, remojo por 12h con ácido acético 0.1M e incubación a 30°C por 48h.

El segundo punto en la escala hedónica es que existe el crecimiento del micelio sobre la matriz, pero en este caso la esporulación del hongo se hace presente, este punto se estableció como el 50% del crecimiento no óptimo del hongo.

El desarrollo de esporas indica el crecimiento acelerado del microorganismo, la torta es compacta, es ligeramente blanca pero el producto presenta olor no característico.

La figura 6 muestra el 50% del crecimiento no óptimo del hongo sobre los granos de garbanzo; se observan pequeñas zonas con un ligero color negro, que indican el crecimiento del hongo hasta la esporulación; por otro lado se observa el micelio blanco del hongo pero no cubre en su totalidad a los cotiledones, lo que conlleva a que la torta sea parcialmente blanca y no es compacta, es decir, hay desprendimiento de los cotiledones entre sí. En este punto se encuentran los lotes que se adicionaron con fuente de nitrógeno, además fueron remojados en solución de ácido láctico 0.1M por 12 h y cocidos por 30 min a 90°C.



**Figura 6:** Apariencia del 50 % del crecimiento no óptimo sobre los granos de garbanzo, incubación a 30°C por 48h.

Finalmente se tiene el último punto de la escala hedónica, donde se observó nuevamente el crecimiento no óptimo del hongo sobre la matriz de garbanzo. A diferencia de los puntos anteriores, la textura del producto fermentado no es característica de la fermentación.

La figura 7 muestra como es el crecimiento de *R. oligosporus* sobre la matriz; dentro de la cual se aprecia que el micelio no cubre el total de los cotiledones causando que la torta no sea compacta y no es blanca en su totalidad, por el contrario los granos son blandos y se desarrollan olores no característicos de la fermentación sólida, tal es el caso de los lotes que fueron remojados en solución de ácido láctico 0.1M y que solo fueron escaldados a 90° C por 1 min.



**Figura 7:** Apariencia del crecimiento no óptimo de *R. oligosporus* sobre los granos de garbanzo, adicionados con fuente de nitrógeno e incubación a 30°C por 48h.

### **6.1.1. INFLUENCIA DEL REMOJO DE GARBANZO Y SOYA EN ÁCIDO LÁCTICO Y ÁCIDO ACÉTICO, SOBRE EL CRECIMIENTO DE *R. oligosporus*.**

Con el remojo de los granos de soya en la solución de ácido láctico y ácido acético se observó que el crecimiento del hongo es del 100% en cambio en los granos de garbanzo porquero se observó que en la solución de ácido láctico hay un crecimiento del hongo de menos del 50% a las 48 h de incubación, a diferencia del lote que se remojó en la solución con ácido acético, que presenta el crecimiento del 100%, esta apariencia se observó como la figura 7.

El pH de los granos de garbanzo del remojo en la solución de ácido acético fue de 4.5, en cambio el pH de los granos de garbanzo del remojo en la solución de ácido láctico es de 4.0, por lo que esta diferencia contribuye a la actividad proteolítica del hongo, causando así el desarrollo del micelio sobre la leguminosa a las 48 h de incubación, aprovechando las fuentes de proteínas y de lípidos de cada matriz. Lo que indica que a un pH de 4.5 se favorece el crecimiento del hongo sobre los granos de garbanzo. En el caso de la soya se observó un excelente crecimiento de *R. oligosporus* cuando los granos de soya fueron remojados en solución de ácido láctico 0.1M.

Esto se puede deber a que exista una contaminación de algunas bacterias que inhiben el crecimiento de *R. oligosporus* sobre los granos de garbanzo. Sin embargo se ha investigado y reportado que el uso de un ácido (láctico y acético) en el agua de remojo y de cocción es un tratamiento que facilita el aumento del pH de los granos en un intervalo de 4.0–5.0, ya que en este intervalo el crecimiento de las bacterias que contaminan la fermentación, puede ser inhibidas y no se inhibe el crecimiento del hongo de la fermentación en el tempe (Steinkraus, 1995).

#### **6.1.2. INFLUENCIA DE LA COCCIÓN Y ESCALDADO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *R. oligosporus* SOBRE LOS GRANOS DE GARBANZO.**

El crecimiento del hongo en el lote que fue escaldado, fue no óptimo y menor del 50%, en comparación con el lote que fue cocido que tiene un crecimiento mayor del 50% del micelio sobre los granos de garbanzo, estos lotes fueron remojados en ácido láctico. En el lote que fue remojado y escaldado se observó que los lotes presentan una textura blanda de los granos y posterior a las 48 h de incubación aparecen olores desagradables, el crecimiento del hongo es muy limitado y es menor al 50% de crecimiento.



No obstante en la muestra que fue sometida a remojo y a una cocción, el lote muestra el crecimiento del hongo pero, después de las 48 h se observó que el crecimiento del hongo fue limitado, como es el caso de la figura 5.

### **6.1.3. INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE FUENTE DE NITRÓGENO SOBRE EL CRECIMIENTO DE R. oligosporus.**

Debido a la variabilidad de la concentración de proteína presente en el garbanzo y a las variables ya hechas en el proceso se decidió incorporar, sulfato de amonio, peptona y extracto de levadura como fuentes de nitrógeno, con la finalidad de favorecer el crecimiento de hongo. El lote al que incorporamos sulfato de amonio, presentó un crecimiento menor del 50%, presentando la producción de esporas por el hongo, metabolitos que no son deseados en este producto, por su toxicidad, el crecimiento es como se mostró en la figura 6.

El lote que contiene peptona presenta un crecimiento del 50% no obstante requiere de 60h de incubación, la textura del producto se ve afectada ya que es muy blanda, en comparación con un lote de crecimiento del 100% y de 48 h de incubación.

Finalmente la muestra con extracto de levadura también presenta un crecimiento del 50% del micelio sobre la matriz, pero a diferencia del lote con peptona, el crecimiento se alcanza a las 48 h de incubación con la textura y olores característicos de la fermentación por el hongo.

Estos resultados sugieren que la fuente de nitrógeno no es responsable de que el micelio tenga un crecimiento no óptimo sobre la matriz.

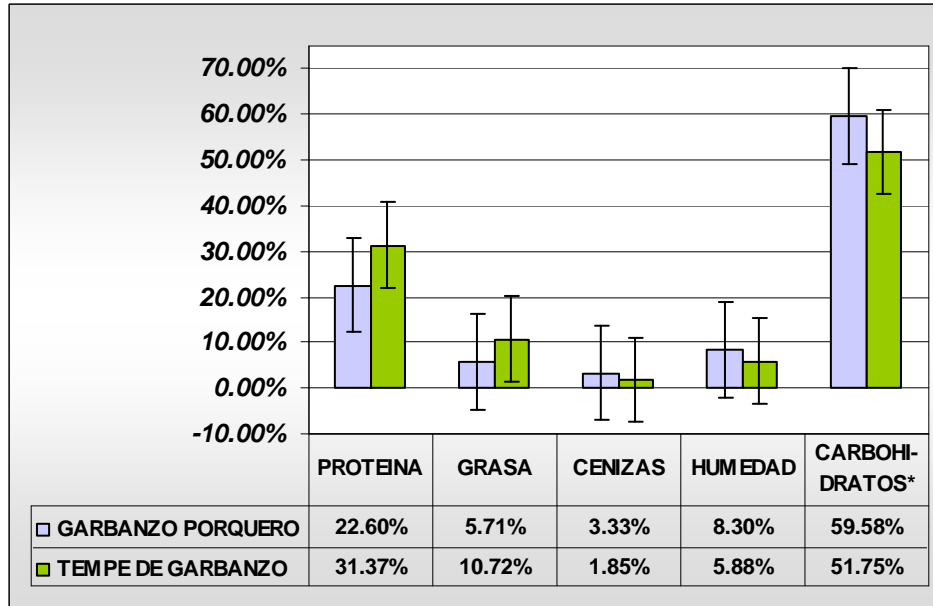
#### **6.1.4. INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DEL 50% DE SOYA AL GARBANZO SOBRE EL CRECIMIENTO DE R. oligosporus.**

La mezcla con los granos de soya fue realizada con la finalidad de complementar los nutrimentos requeridos por el hongo para su óptimo crecimiento. De esta manera se observó un crecimiento mayor del 50%, ya que los granos de soya estaban completamente cubiertos por el micelio mientras que en los granos de garbanzo no se observó lo mismo, estos granos tenían un crecimiento similar al de la figura 6.

Asimismo se diferenciaban los granos de garbanzo y los granos de soya. También es importante lograr la mezcla de estas dos leguminosas para complementar un crecimiento óptimo sobre los cotiledones de garbanzo.

#### **6.2. ANÁLISIS PROXIMAL**

Al realizar el análisis proximal se tiene que la cantidad de proteína y de grasa aumentan, después de la fermentación, en comparación con la materia prima. Esto es debido a la actividad proteolítica y lipolítica de *Rhizopus oligosporus* responsable de la fermentación. Para el caso de las cenizas y de la humedad ambos disminuyen en el producto fermentado (tempe), debido al proceso de remojo y de cocción, que ayudan a eliminar las cantidades de sustancias tóxicas, pero no de los microcomponentes propios de los granos de garbanzo como los minerales y en el caso de la humedad disminuye por el procedimiento de secado posterior a la fermentación, usada para detener la misma.



\* Por diferencia.

**FIGURA 8:** Análisis proximal de garbanzo variedad porquero y Tempe de garbanzo porquero. El análisis químico se realizó por triplicado.

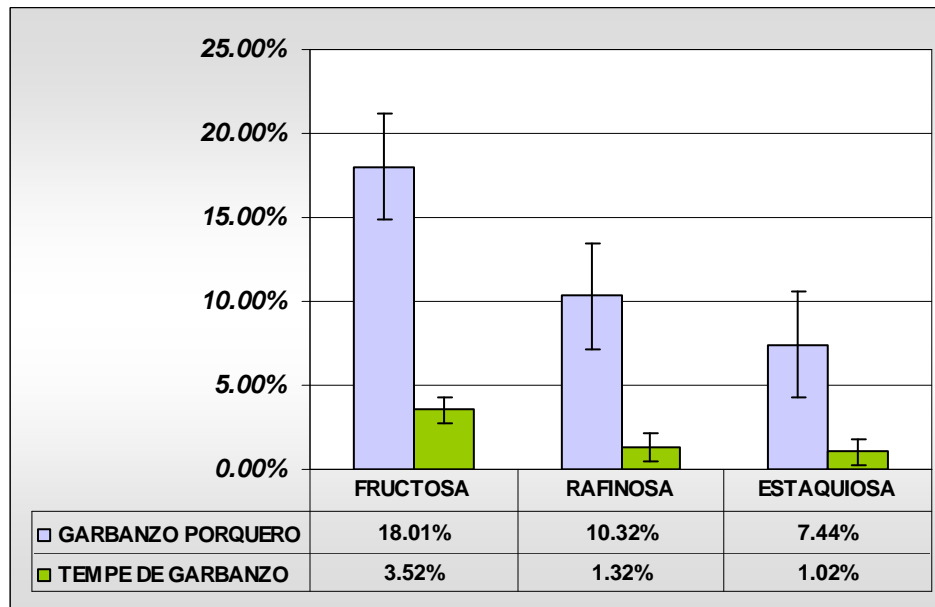
Los carbohidratos se obtuvieron por diferencia para harina de garbanzo y tempe de garbanzo. Para los cuales podemos observar en la misma figura 8, que existe una disminución de carbohidratos en el producto fermentado, esto nos indica una vez más que existe una disminución por efecto de la fermentación del hongo y por procedimiento de la preparación de tempe.

La disminución de carbohidratos en el producto fermentado se debe a muchos factores tanto a la elaboración de tempe como a la utilización de alguno de estos carbohidratos por el microorganismo responsable de la fermentación. Dentro de la elaboración del tempe es por la remoción de la epidermis, la posibilidad de la solubilidad de alguno de estos componentes en el agua de remojo y cocción de los granos. Y finalmente en la utilización de algunos de estos componentes del garbanzo por *R. oligosporus* mediante la fermentación sólida.

**6.3. CAMBIOS EN LA CONCENTRACION DE LOS AZÚCARES DEL GARBANZO DURANTE LA FERMENTACIÓN.**

El objetivo de la fermentación en granos de garbanzo es el estudio de los oligosacáridos principalmente de rafinosa y estaquiosa, ya que son los carbohidratos responsables de la flatulencia y producción de gases en el intestino, tanto en animales como seres humanos. Así mismo están presentes en la matriz y son considerados como antinutrientes.

Para estudiar los cambios que existen en el proceso de elaboración de tempe de garbanzo se estudiaron las tres etapas de elaboración: agua de remojo de los granos de garbanzo con ácido acético; agua de cocción la cual se llevo a cabo con agua destilada y finalmente harina de tempe de garbanzo, en las condiciones ya establecidas y estudiadas.



**FIGURA 9:** Efecto de la fermentación de *R. oligosporus* sobre la concentración de rafinosa, estaquiosa y fructosa en garbanzo porquero.

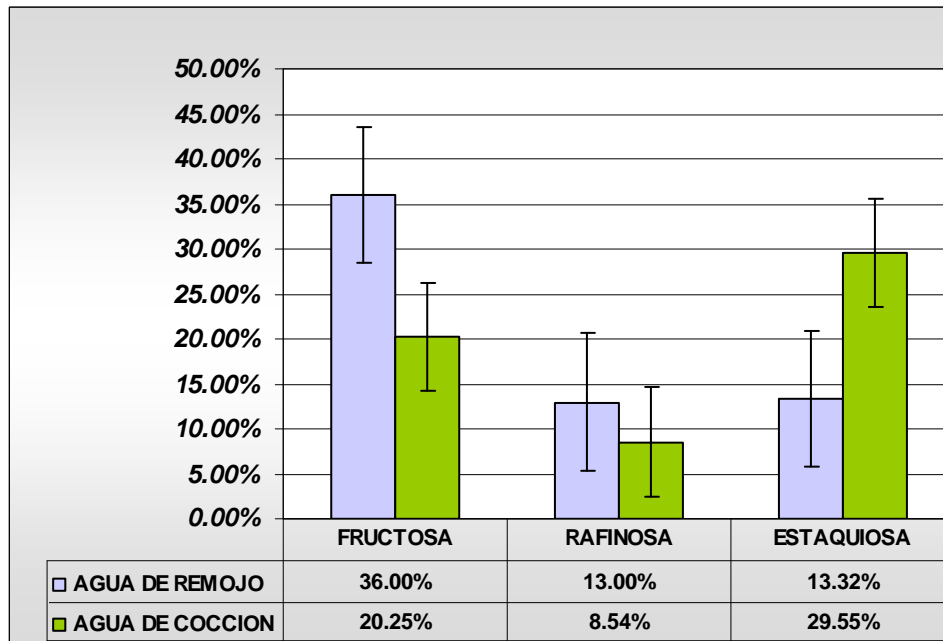
Los resultados muestran que fructosa, estaquiosa y rafinosa disminuyen por efecto de la fermentación sólida realizada con *R. oligosporus*, se observa una disminución en el producto fermentado de los oligosacáridos en estudio, rafinosa y estaquiosa como se muestra en la figura 9, se observa que cerca del 90% de estos oligosacáridos disminuye considerablemente entre la matriz sin fermentar y el producto fermentado.

No obstante a estas concentraciones aun se puede presentar el problema de la flatulencia ya que no podemos olvidar que los animales monogástricos incluyendo al hombre, carecen de la enzima que puede ayudarnos a desdoblarlos y absorberlos en el intestino.

En la fermentación sólida se favorece la disminución de fructosa el azúcar que se tiene en mayor proporción en la matriz, y que es el principal monosacárido que se encuentra en la misma.

De la misma manera se estudió el procedimiento de elaboración de tempe de garbanzo, se sometió a estudio el agua de remojo con ácido acético y el agua de cocción, a lo cual se tiene que también existe una disminución de estos oligosacáridos por efecto de remojo y cocción de la matriz, no solo por el consumo de rafinosa y estaquiosa por parte del hongo.

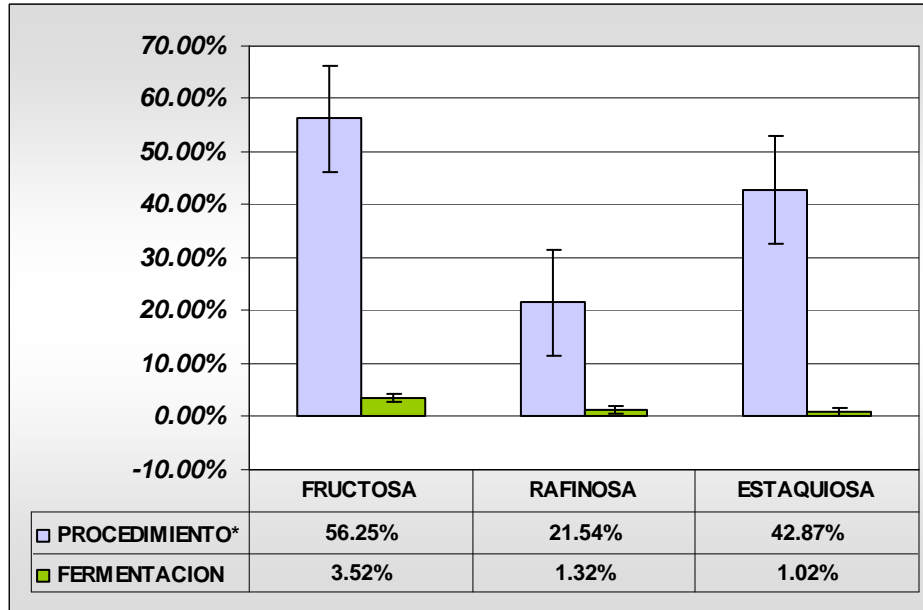
En este caso se observó que la fructosa es el carbohidrato que se retiene en mayor cantidad en el agua de remojo en un 36.0 %, (figura 10) no obstante rafinosa y estaquiosa se encuentran presentes en esta agua en un 13%, debido a que los tres azúcares son solubles en agua.



**FIGURA 10:** Efecto del proceso de remojo y cocción de los granos de garbanzo sobre la concentración de rafinosa, estaquiosa y fructosa.

Para el agua de cocción se observó que los azúcares fructosa y rafinosa se disolvieron en menor proporción que la estaquiosa este se disolvió en un 29 %, la diferencia es por sus propiedades químicas como lo es el punto de fusión, siendo la estaquiosa quien presenta el punto de fusión más alto arriba de 100° C, y el procedimiento de cocción se llevó a cabo a 90°C, lo que puede indicar que fructosa y rafinosa fusionaron a esta temperatura disminuyendo su solubilidad, mientras que la estaquiosa conserva su estructura original facilitando su solubilidad en agua a temperatura de 90°C.

Finalmente se observó que los azúcares disminuyen mayoritariamente por el procedimiento de elaboración de tempe que por el efecto y acción de fermentación de *R. oligosporus*, figura 11, no obstante las dos partes contribuyen a la disminución de estos compuestos antinutricionales.



\*Condiciones del procedimiento: 150 g de garbanzo porquero fueron remojados en 450 ml de solución de ácido acético 0.1M por 12h, posteriormente fueron cocidos en 300 ml de agua desionizada por 30min a 90°C.

**FIGURA 11:** Efecto del procedimiento y de la fermentación sobre la concentración de rafinosa, estaquiosa y fructosa en la elaboración de Tempe de garbanzo porquero.

La fructosa se eliminó por acción del remojo y cocción de los granos de garbanzo y no por la preferencia del hongo por este nutriente no olvidemos que *R. oligosporus* es un hongo que prefiere en primer término el consumo de nutrientes proteicos y no de carbohidratos.

La rafinosa y estaquiosa son los oligosacáridos que disminuyen, al igual que la fructosa, sus concentraciones en el proceso de elaboración de tempe, sin embargo, la rafinosa es capaz de desdoblarse en la fermentación por *R. oligosporus*.

El tempe de garbanzo puede ser comparado con el tempe de soya debido a que en ambos casos la fermentación se lleva a cabo por *Rhizopus oligosporus*, provocando el beneficio del aumento de proteína y grasa para ambas materias primas, cabe señalar que la soya es una leguminosa que se encuentra en el grupo de las leguminosas con alto contenido de proteína y grasa, mientras que el garbanzo pertenece al grupo de leguminosas con valor medio de proteína y valor bajo en grasa.

La fermentación sólida mejora las condiciones nutricionales del garbanzo (*Cicer arietinum L.*) no solo eliminando y disminuyendo los factores antinutricionales como los oligosacáridos, si no que también, ofrece la alternativa de consumo humano de la variedad porquero.

México puede tener a la fermentación sólida como una alternativa de mejoramiento de sus leguminosas a un bajo costo, alta calidad y abastecimiento de fuente de proteína y grasa a la población, como lo vienen realizando los países asiáticos. Sin embargo, también puede ser una principal fuente de producción para alimento animal y complementarse a la dieta animal con otro cereal como el maíz, sorgo, etc.,



## 7. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos durante el acondicionamiento de garbanzo porquero para la fermentación con *Rhizopus oligosporus* y el efecto de ésta sobre los oligosacáridos se concluye que:

- El remojo de garbanzo por 12h en solución 0.1M de ácido acético favorece el desarrollo de *Rhizopus oligosporus* durante la fermentación; el remojo por 12h en solución 0.1M de ácido láctico favorece el crecimiento de *Rhizopus oligosporus* durante la fermentación, en granos de soya.
- El escaldado de garbanzo porquero, en agua a 90 °C por 10min como tratamiento térmico, no favorece el crecimiento del hongo sobre la matriz de garbanzo.
- El garbanzo es una de las leguminosas que contiene un valor medio de proteína y un valor bajo en grasa, comparado con la soya. Las concentraciones de proteína y de grasa, aumentan durante la fermentación de garbanzo porquero, gracias a la fermentación de esta matriz con *Rhizopus oligosporus*.
- La fructosa es el principal azúcar que se encuentra en el garbanzo porquero y es el principal monosacárido cuya concentración disminuye por efecto de remojo en ácido acético de estos cotiledones.

- La estaquiosa es uno de los oligosacáridos antinutricionales que disminuye en un 29 %, por efecto de cocción.
- La rafinosa es el trisacárido que disminuye, por efecto de remojo y por efecto de la fermentación sólida, en un 13 y 10 %, respectivamente.
- Mediante la fermentación sólida se disminuye la concentración de los oligosacáridos que causan la flatulencia, por este motivo el tempe de garbanzo puede ser utilizado para el consumo humano o animal.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Alarcón-Valdez, C., Milán-Carrillo, J., Cárdenas-Valenzuela, OG., Mora-Escobedo, R., Bello-Pérez, L.A. and Reyes-Moreno, C. (2005). **Infant food from quality maize and chickpea: Optimization for preparing and nutritional properties.** *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 56(4): 273-285.

Astiasarán, Iciar y Martínez J. Alfredo. **Alimentos, composición y propiedades.** Mc Graw Hill, Madrid España, 2000 pp 155-163.

Bernal-Lugo, I., Leopold AC. (1992) **Changes in soluble carbohydrates during seed storage.** *Plant Physiology* 98: 1207-1210.

Burbano C., Muzquiz M., Ayet G., Cuadrado C. and Pedrosa M.M. (1999) **Evaluation of antinutritional factors of selected varieties of *Phaseolus vulgaris*.** *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 1468-1472.

Cazarín, A., Bravo, F., de Uriarte, L. A., & Shimada, A. (1976). **Tecnología Pecuaria Mexicana**, 31, 27.

Ermetice Giovana, Queiroz Keila de Silva, Pissini Maria S. and Costa de Oliveira A. (2006). **Chemical Composition, Dietary Fibre, and Resistant ESISTANT Starch Contents of Raw and Cooked Pea, Common Bean, Chickpea and Lentil Legumes.** *Food Chemistry* 94: 327-330.

FAO, FAOSTAT, comercio, TradeSTAT, índices comerciales, prodSTAT, cultivos. Disponible en línea: <http://faostat.fao.org/site/535/DesktopDefault.aspx?PageID=535#anchor>, consultada el 06 de abril del 2008.

Fennema, Owen, R., **Química de Alimentos**. Acribia, S.A., Zaragoza, España, 1993 pp 100 y 108.

García Garibay M., Quintero Ramírez R., y López-Munguía Canales A., **Biología alimentaria**. Limusa, México, 1993 pp 313-325.

Gowen, A., Abu-Ghannam, N., Frias, J. and Oliveira, J. (2007) **Modeling the water absorption process in chickpeas (*Cicer arietinum* L.) The effect of blanching pre-treatment on water intake and texture kinetics**. *Journal of Food Engineering* 78:810-819

Gupta, D.K., Tripathi, R.D., Rai, U.N., Dwivedi, S. Mishra, S., Srivastava, Inouhe, M. (2006) **Changes in amino acid profile and metal content in seeds of *Cicer arietinum* L. (chickpea) grown under various fly-ash amendments**. *Chemosphere* 65: 939-945

Hernández, M., Chávez, A., Bourges, H., V. 1987. **Valor Nutritivo de los Alimentos Mexicanos**. Publicación L-12, 10a edición. INNSZ. México.

INFOASERCA, Claridades Agropecuarias, No. 42. Disponible en línea: <http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/marcos.asp?numero=42> , consultada el 15 de Diciembre de 2007.

Iqbal Amjad, Iqtidar A., Ateeq N., Muhammad Sayyar Khan. (2006) **Nutritional quality of important food legumes**. *Food Chemistry* 97: 331-335.

Kaur, M., Singh, N. and Singh N. (2005) **Physicochemical, cooking, textural and roasting characteristics of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars**. *Journal of Food Engineering* 69: 511-517.

Ko Swan Djen and Hesseltine C.W. (1979) **Tempe and Related Foods**. In **Microbial Biomass**,. London: American Press. 4:115-140.

- Koivistoinen, P. and Hyvönen, L. **Carbohydrate Sweeteners in Foods and Nutrition.** Academic press. Gran Bretaña, 1980.
- Lin, M. S. and Wang H.H. (1991) **Anaerobic growth and oxygen toxicity of *Rhizopus* cultures isolated from starters made by solid state fermentation.** *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 24:229-239.
- Martínez Villaluenga, C., Frías, J., Gómez, R., Vidal Valverde, C. (2006) **Influence of addition of raffinose family oligosaccharides on probiotic survival in fermented milk during refrigerated storage.** *International Dairy Journal* 16: 768-774.
- Mathews Ruth H.. **Legumes Chemistry, Technology and human nutrition.** Marcel, Dekker. INC, N.Y. 1989 pp 181-185 y 190-194.
- Milán Carrillo, J., Reyes Moreno, C., Armienta Rodelo, A., Carábez Trejo, A. and Mora Escobedo, R. (2000) **Physicochemical and Nutritional Characteristics of Extruded Flours from Fresh and Hardened Chickpeas (*Cicer arietinum* L.)** *Academic Press* 33:117-123.
- Morrow, B. (1991). **The Rebith of Legumes: legumes production, consumption and export are increasing as more people become aware of legumes nutritional benefits.** *Food Technology* 9:96-121.
- Muller G.H. and Tobin, G. **Nutrición y ciencia de los alimentos.** Editorial Acribia, Zaragoza, España. 1989 pp 142-148.
- Muzquiz, M., Rey, C. and Cuadrado, C. (1992) **Effect of germination on the oligosaccharide content of lupin species.** *Journal of Chromatography* 607: 349-352.

Nielsen, S.S. (1991) **Digestibility of legume protein: studies indicate that the digestibility of heated legume protein is affected by the presence of other seed components and the structure of the protein.** *Food Technology* 45 (9):112-114.

Norman N. Potter and Joseph H. Hotchkiss. **Food Science Texts.** 5<sup>th</sup> Edition. Chapman & Hall, Thomson Publishing, N.Y., 1986.

Nout M.J.R. and Kiers J.L. (2005) **Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millennium.** *Journal of Applied Microbiology* 98: 789-805.

Owen, P. Ward. **Biotecnología de la fermentación. Principios, procesos y productos.** Acribia, Zaragoza, España, 1989 pp 66-68.

Pagalenthi, M., Siddhuraju and Vadivel, V. (2006) **Effect of soaking followed by cooking and the addition of  $\alpha$ -galactosidase on oligosaccharides levels in different *Canavalia* accessions.** *Journal of Food Composition and Analysis* 19:512-517.

Paredes Lopez, O. González Castañeda, J. and Cárabez Trejo, A. (1991) **Influence of Solid Substrate Fermentation on the Chemical Composition of Chickpea.** *Journal of Fermentation and Bioengineering* 71:58-62.

Paredes Lopez, O., Ordorica-Falomir C., and Olivares-Vázquez, M.R. **Chickpea Proteins Isolates: Physicochemical, Functional and Nutritional Characterization.** *Journal of Food Science* 56: 3:1996.

Peñaloza, W., Davey, C.L., Hendger, J.N. and Kell, D.B. (1991) **Stimulation by potassium ions of the growth of *Rhizopus oligosporus* during liquid and solid-substrate fermentations.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 7: 260-268.

Reyes Moreno, C., Cuevas Rodríguez, EO., Milán Carrillo J., Cárdenas Valenzuela, OG. and Barrón Hoyos, J. (2004) **Solid state fermentation process for producing chickpea (*Cicer arietinum* L) Tempe flour. Physicochemical and nutritional characteristics of the product.** *Journal of Science of Food and Agriculture* 84: 271-278.

Reyes Moreno, C., Paredes López, O., (1993) **Hard-to-cook Phenomenon in Common Beans: A Review.** *Crit Rev. Food Science Nutrition* 33:227-286.

Reyes Moreno, C. Romero Urías, C.A., Milán Carrillo, J. and Gómez Garza, R.M. (2000) **Chemical composition and nutritional quality of fresh and hardened chickpea (*Cicer arietinum* L.) after the solid state fermentation (SSF).** *Food Science and Technology International* 6(3): 251-258.

Ruiz Terán, F. and Owens David, J. (1996) **Chemical and Enzymic Changes During the Fermentation of Bacteria-Free Soya Bean Tempe.** *Journal of Science of Food and Agriculture* 71:523-530.

Sánchez-Mata C., Peñuela-Teruel, J., Cámara-Hurtado, M., Díez-Marqués, C. y Torija-Isasa, E. (1998) **Determination of Mono-,Di-,and Oligosaccharides in Legumes by High-Performance Liquid Chromatography Using an Amino-Bonded Silica Column.** *Journal of the Agriculture and Food Chemistry* 46: 3648-3652.

Singh, N., Sekhon, K.S., Bajwa, U., and Goyal, S. (1992) **Cooking and Parching Characteristics of Chickpea (*Cicer arietinum* L.).** *Journal of Food Science and Technology* 31:62-65.

Singh, U.; Jambunathan, R. and Saxena, P. (1981) **Changes in Carbohydrates, Amino acids and Proteins in Developing Seed of Chickpea.** *Phytochemistry* 20:273-278.

Sotelo-Angela, Flores-Fernando, Hernández-Miguel. (1987) **Chemical composition and nutritional value of Mexican varieties of chickpea (*Cicer arietinum* L.)** *Plant Foods for Human Nutrition* 37: 299-306.

Steinkraus K.H. **Handbook of Indigenous Fermented Foods**, 2nd revised and expanded dn. New York: Marcel Dekker. 1995 pp 9-53

Van Buren J.P. **Removal of Oligosaccharides from Soy milk by an enzyme from *Aspergillus Saiton***. New York State Agricultural Experiment Station, Cornell University, Geneva, New York. 1994, 14456.

Vladimiro C., Ambrosiadis, J., Sossidou, E., Bampidis, V., Arkoudilos J., Hucko B., Iliadis, C. (2006) **Effect of Replacing Soybean Meal by Extruded Chickpeas in the Diets of Growing-Finishing pigs on Meat Quality.** *Meat Science* 73: 529-535.

Williams P.C., Nakoul, H. , and Singh, K. B. (1983) **Relationship between Cooking Time and Some Physical Characteristics in Chickpea (*Cicer Arietinum* L.)** *Journal of Science of Food and Agriculture* 34:492-496.

Yi-Chieh W., Roch-Chui, Y., Hsin-Yi, Y. Cheng-Chun, C. (2003) **Sugar and acid contents in soymilk fermented with bifidobacteria.** *Food Microbiology* 20: 333-338.

Yin J., Yang, G., Wang, S. and Chen, Y. (2006) **Purification and determination of stachyose in Chinese artichoke (*Stachys Sieboldii* Miq.) by high-performance liquid chromatography whit evaporative light scattering detection.** *Talanta* 70: 208-212.

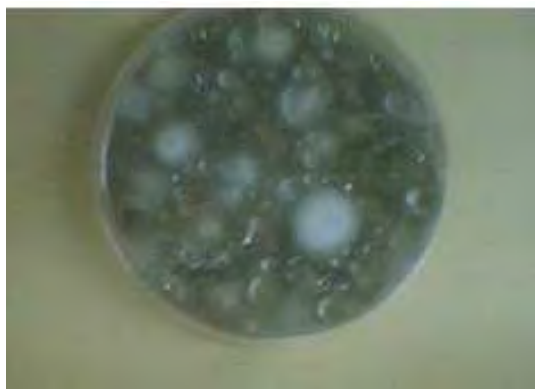
Zamora, J. M., Aguirre, A. Shimada, A. & Martínez, L. (1975) **Tecnología Pecuaria Mexicana**, 28: 40.



## 9. ANEXO I: CRECIMIENTO DE *Rhizopus oligosporus*.

El crecimiento de *Rhizopus oligosporus* en las cajas petri, se llevó a cabo con agar papa dextrosa y se colocaron durante 5 días a 30°C .

Después de este tiempo el hongo se ha desarrollado lo suficiente para producir esporas, en este momento se procedió a la colecta de estas esporas, con agua desionizada estéril.



**Figura 12:** Formación de esporas por *Rhizopus oligosporus* a 30°C durante cinco días.

## 10. ANEXO II: RESULTADOS DE PROTEÍNA, GRASA, HUMEDAD Y CENIZAS.

**Tabla V:** resultados de cada determinación de grasa, humedad, cenizas, proteínas y carbohidratos, para cada análisis proximal de tempe de garbanzo y garbanzo porquero:

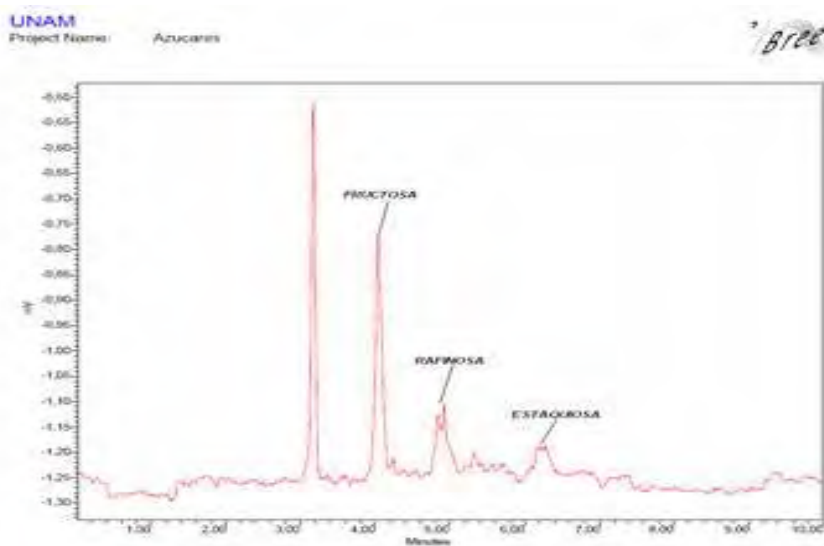
	GARBANZO PORQUERO			TEMPE DE GARBANZO PORQUERO		
<b>PROTEINA**</b>	22.81 %	21.98 %	23.01 %	31.90 %	31.4 %	30.83 %
<b>GRASA</b>	6.33 %	5.16 %	5.64 %	10.73 %	10.71 %	10.72 %
<b>CENIZAS</b>	3.28 %	3.36 %	3.34 %	1.88 %	1.83 %	1.83 %
<b>HUMEDAD</b>	8.98 %	8.05 %	7.87 %	5.28 %	5.35 %	7.02 %
<b>CARBOHIDRATOS*</b>	58.60 %	61.45 %	60.14 %	50.21 %	50.71 %	49.60 %

\* Obtenidos por diferencia.

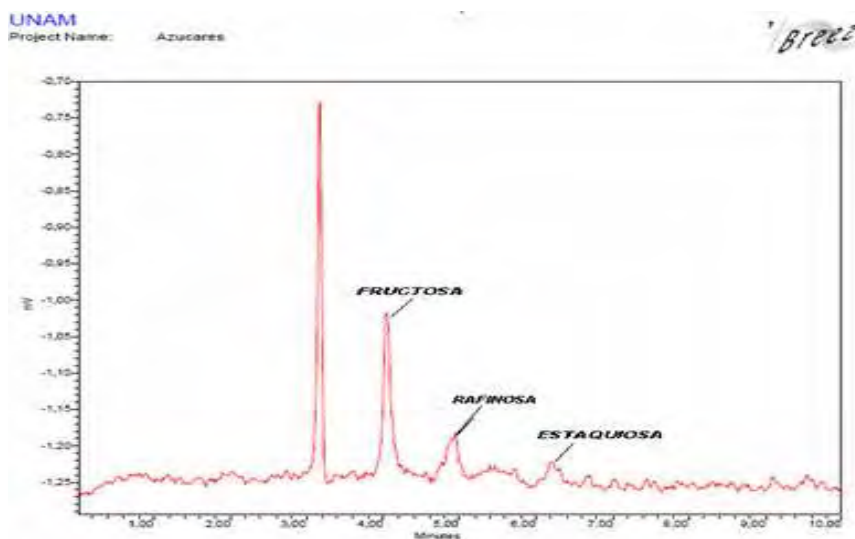
\*\* Valores en base seca y sin grasa.

**11. ANEXO III: CROMATOGRAMAS DE LOS AZÚCARES EN ESTUDIO.**

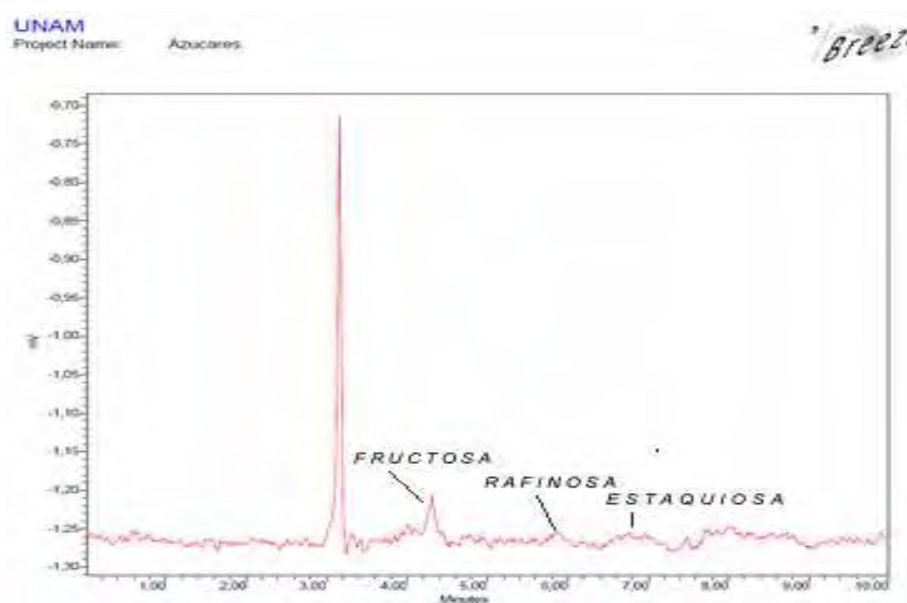
- a) Cromatograma que muestra los azúcares extraídos de la muestra de la matriz sin ningún tratamiento.



- b) Cromatograma del agua de remojo de los granos de garbanzo en solución de ácido acético 0.1M durante 12 h.



- c) Cromatograma de los azúcares extraídos de la muestra de tempe de garbanzo, con remojo de 12 h en 350 mL de solución de ácido acético 0.1M y cocción de los granos en 300 mL de agua desionizada a 90°C por 30 min, fermentación con esporas de *R. oligosporus* por 48 h a 27°C.



## 12. ANEXO IV: ANÁLISIS DE LA CUANTIFICACIÓN DE FRUCTOSA, RAFINOSA Y ESTAQUIOSA POR HPLC.

Para realizar el análisis cromatográfico, el primer paso que se realizó fueron las inyecciones de los estándares, cada muestra fue inyectada 4 veces y se obtuvieron los correspondientes promedios y gráficos. De estos gráficos obtenemos los siguientes datos:

**Tabla VI:** Estándares inyectados en el HPLC en concentraciones conocidas para la elaboración de los gráficos lineales y obtención de las ecuaciones.

ESTAQUIOSA			RAFINOSA			FRUCTOSA		
g/ml	TIEMPO	AREA	g/mL	TIEMPO	AREA	g/mL	TIEMPO	AREA
0.0016	7.315	262747.5	0.0018	5.321	422884.3	0.0026	3.946	646.3
0.0047	7.245	943832.8	0.0033	5.310	595712.8	0.0103	3.944	1961666.0
0.0268	6.881	5453813.0	0.011	5.290	2199930.5	0.0734	3.865	12523775.3
0.0402	6.789	7707786.8	0.0203	5.262	3496510.0	0.1118	3.839	17921313.0

Con estos datos se obtuvieron las siguientes ecuaciones lineales:

	EQUACION LINEAL	R <sup>2</sup>
<b>FRUCTOSA</b>	$y = 2E + 08x$	0.997
<b>RAFINOSA</b>	$y = 2E + 08x$	0.987
<b>ESTAQUIOSA</b>	$y = 2E + 08x$	0.998

Las muestras fueron preparadas de la siguiente manera (este es solo un ejemplo de los cálculos realizados):

Para la muestra de garbanzo porquero se peso 1.5003 g de harina de garbanzo sin grasa.

Se agregaron 40 mL de la mezcla (etanol-agua, 80:20); se agitaron las mezclas por 45 min en dos ocasiones (vol. Total obtenido 80 mL) después de la centrifugación y filtración, quedó un vol. aproximado de 50 mL; de esta mezcla se evaporaron cerca del 100% de agua y alcohol, quedando un volumen de 500  $\mu$ L, los cuales fueron llevados a un aforo de 5 mL con la mezcla de acetonitrilo-agua-metanol (25:20:55); de esta muestra se tomaron 100  $\mu$ L para finalmente ser inyectados 20  $\mu$ L al HPLC.

Esta muestra fue inyectada 4 veces, de donde se obtuvo el promedio del área bajo la curva es:

**TABLA VII:** Tiempo de retención y área bajo la curva para fructosa, rafinosa y estaquiosa, del cromatograma de una muestra de garbanzo porquero, sin ningún tratamiento.

<b>MUESTRA DE GARBANZO M1</b>					
<b>FRUCTOSA</b>		<b>RAFINOSA</b>		<b>ESTAQUIOSA</b>	
TIEMPO	AREA	TIEMPO	AREA	TIEMPO	AREA
4.056	559	4.836	245	6.243	262
4.030	500	4.917	333	6.341	312
3.935	1034	4.865	180	6.177	398
4.047	761	4.895	515	6.281	503
<b>PROMEDIO</b>					
<b>4.017</b>	<b>713.5</b>	<b>4.878</b>	<b>318.3</b>	<b>6.261</b>	<b>368.8</b>

Con la información generada hasta el momento, tomaremos el caso de la rafinosa:

De la curva patrón para rafinosa tengo que es:

$$Y = 2E+08X$$

$$R^2 = 0.987$$

De donde:

$$X \text{ (g/mL)} = Y / 2 \cdot 10^8$$

Después de haber inyectado cada muestra y obtener el área bajo la curva se obtuvieron los siguientes datos, para cada azúcar:

**Tabla VIII:** Áreas bajo la curva de las muestras inyectadas en el HPLC.

<b>MUESTRA DE GARBANZO (PRIMERA EXTRACCION) M1</b>					
<b>FRUCTOSA</b>		<b>RAFINOSA</b>		<b>ESTAQUIOSA</b>	
TIEMPO	AREA	TIEMPO	AREA	TIEMPO	AREA
4.056	559	4.836	245	6.243	262
4.03	500	4.917	333	6.341	312
3.935	1034	4.865	180	6.177	398
4.047	761	4.895	515	6.281	503
<b>PROMEDIO</b>					
4.017	713.5	4.878	<b>318.3</b>	6.261	368.8

En donde  $Y = 318.3$  que es el área bajo la curva del promedio de inyecciones hechas de esta muestra, por tanto:

$$X = 318.3 / 2 * 10^8 = 0.000001592 \text{ g de rafinosa / mL de Extracto de Garbanzo (Ext. G.)}$$

Se pesó 1.5003 g de harina de garbanzo (g HG) para realizar la primera extracción:

$$1.5003 \text{ g HG} / 80 \text{ mL} = 0.01875 \text{ g HG / mL} / 0.5 \text{ mL de Ext.G} = 0.0375 \text{ g HG} / 5 \text{ mL (aforo)} = 0.0075015 \text{ g HG / mL}$$

Entonces:

$$1.5952 * 10^{-6} \text{ g de rafinosa / mL Ext.G} / 0.020 \text{ mL Ext. G} = 7.9575 * 10^{-5} \text{ g de rafinosa} * 5 \text{ mL (aforo)} = 0.000397875 \text{ g de rafinosa} / \text{mL Ext.G} / 0.0075015 \text{ g HG} / \text{mL Ext.G} = 0.0530 \text{ g rafinosa.} / \text{g HG} = 5.30 \% \text{ rafinosa en Harina de Garbanzo.} = 0.3979 \text{ mg de rafinosa} / \text{mL Ext.G}$$

Esta ecuación se repite para cada muestra en la que se extrajeron cada uno de los azúcares de interés.

Para determinar la concentración de azúcares en las muestras en porcentajes se utilizó la siguiente ecuación:

$0.0003979 \text{ g de rafinosa} / 0.0075 \text{ g de HG} = 0.0530 \text{ g de rafinosa} / \text{g de HG} * 100 = 5.30 \% \text{ de rafinosa.}$

De ésta manera se tiene la siguiente tabla:

**TABLA IX:** Concentración de fructosa, rafinosa y estaquiosa en las muestras de garbanzo porquero y tempe de garbanzo porquero (%).

MUESTRA DE GARBANZO			MUESTRA DE TEMPE		
FRUCTOSA	RAFINOSA	ESTAQUIOSA	FRUCTOSA	RAFINOSA	ESTAQUIOSA
10,11%	<b>5,30%</b>	6,14%	0,63%	0,37%	1,05%
22,89%	12,33%	6,58%	0,69%	0,47%	0,33%
13,25%	8,86%	6,39%	7,71%	2,57%	1,28%
PROMEDIO					
15.41%	<b>8.83%</b>	6.37%	3.01%	1.13%	0.88%

Para tener resultados en base seca y sin grasa se utilizó la siguiente ecuación:

$(8.83 \text{ g de rafinosa} * 100 \text{ g de harina húmeda}) / (100\text{g de harina húmeda} - 8.30 \text{ g de harina sin humedad}) = 9.63 \text{ g de rafinosa} / 100 \text{ g de harina de garbanzo sin humedad} * 100 \text{ g de harina de garbanzo con grasa sin humedad} / (100 \text{ g de harina con grasa sin humedad} - 5.71 \text{ g de grasa}) = 10.21 \text{ g de rafinosa} / 100 \text{ g de harina de garbanzo sin grasa y sin humedad.}$

De esta manera, se tienen los resultados finales:

**TABLA X:** Concentración de fructosa, rafinosa y estaquiosa en garbanzo porquero y tempe de garbanzo (%), base seca y sin grasa.

MUESTRA DE GARBANZO			MUESTRA DE TEMPE		
FRUCTOSA	RAFINOSA	ESTAQUIOSA	FRUCTOSA	RAFINOSA	ESTAQUIOSA
17.82%	<b>10.21%</b>	7.36%	3.58%	1.34%	1.04%

Para determinar la eficiencia del método de extracción de los oligosacáridos se procedió a realizar los ensayos de recuperación, para lo cual se agregaron cantidades conocidas del estándar de fructosa (0.0578, 0.0587 y 0.0576 g) a tres muestras de garbanzo (1.5 g). El análisis se realizó por triplicado.

**TABLA XI:** Cantidades de garbanzo porquero y fructosa añadida para comprobar la eficiencia del método de extracción de los azúcares.

<b>GARBANZO PORQUERO (g)</b>	<b>FRUCTOSA AÑADIDA (g)</b>	<b>FRUCTOSA AÑADIDA (%)</b>
1,5931	<b>0,0578</b>	3.61
1,5898	0,0587	3.69
1,5672	0,0576	3.67

En promedio, la cantidad de fructosa que se añadió es de 3.65%, con respecto al peso de la muestra de harina de garbanzo.

Como ejemplo tomaremos la primera cantidad de fructosa añadida en la siguiente ecuación:

$$0.0578 \text{ g de fruc} / 80 \text{ mL} = (0.0007225 \text{ g fruc} / \text{mL}) / 0.5 \text{ mL de Ext. G} = 0.001445 \text{ g Fruc} / \text{mL de Ext. G} / 5 \text{ mL (aforo)} = 0.000289 \text{ g fruc} / \text{mL de Ext. G}$$

En donde:

Fruc = fructosa

Ext. G = extracto de harina de garbanzo porquero

HG = harina de garbanzo porquero

Se realizó el mismo análisis de tal forma que se tiene: fructosa añadida más la cantidad de harina de garbanzo porquero (0.0578 g de Fruc + 1.593 g de HG), de esta manera se tienen los valores que se indican en la tabla XII.



**TABLA XII:** Concentración de fructosa añadida en el extracto de harina de garbanzo porquero.

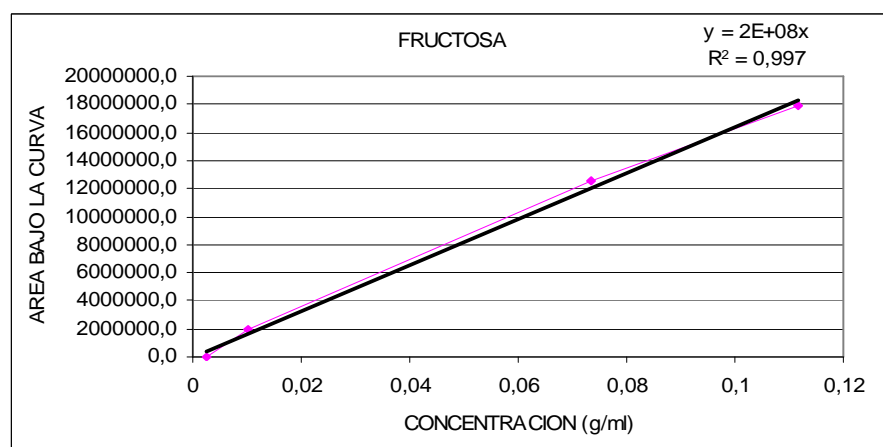
<b>GARBANZO (g)</b>	<b>FRUCTOSA AÑADIDA (g)</b>	<b>g de Fru añadida / mL Ext.G</b>	<b>g de Fru+g de HG / mL Ext.G</b>
1,5931	0,0578	0,000289	0,0082545
1,5898	0,0587	0,0002935	0,0082425
1,5672	0,0576	0,000288	0,008124

Ahora tenemos las lecturas del área bajo la curva de la fructosa más la harina de garbanzo en las siguientes inyecciones:

**TABLA XIII:** Áreas bajo la curva y tiempos de retención de fructosa adicionada en harina de garbanzo porquero.

<b>MUESTRA DE GARBANZO CON FRUCTOSA</b>						
<b>FRUCTOSA ADICIONADA. (g)</b>	<b>FRUCTOSA</b>		<b>RAFINOSA</b>		<b>ESTAQUIOSA</b>	
	TIEMPO	AREA	TIEMPO	AREA	TIEMPO	AREA
0,0578	3,943	<b>767,7</b>	4,893	391,7	6,168	291
0,0587	3,909	<b>1672,3</b>	4,893	769,3	6,197	693,3
0,0576	3,914	<b>1017</b>	4,889	383,5	6,175	288,75

Con los datos anteriores se obtuvo la siguiente curva patrón para la fructosa adicionada:

**FIGURA 13:** Ecuación lineal del estándar de fructosa adicionada a la harina de garbanzo porquero.

De la curva patrón para la fructosa adicionada se obtuvo la siguiente ecuación:

$$Y = 2E+08X$$

$$R^2 = 0.997$$

De donde:

$$X \text{ (g/mL)} = Y / 2 \cdot 10^8$$

Entonces:

$$X = 767.7 / 2 \cdot 10^8 = 0.000038385 \text{ g de Fruc / mL de Ext.G}$$

$3.8385 \cdot 10^{-6}$  g de Fruc / 0.020 mL Ext.G =  $1.9193 \cdot 10^{-4}$  g de Fruc / mL Ext.G X 5 mL = 0.0009596 g Fruc / 0.0082545 g de HG = 0.1163 g de Fruc / g de HG = 11.62 % de Fruc

**TABLA XIV:** Concentración final de fructosa (fructosa del garbanzo porquero más fructosa adicionada).

<b>GARBANZO (g)</b>	<b>FRUCTOSA AÑADIDA (g)</b>	<b>g de Fruc / g de HG+Fruc</b>	<b>FRUCTOSA</b>
1,5931	0,0578	0,0009596	<b>11,62%</b>
1,5898	0,0587	0,0020905	25,63%
1,5672	0,0576	0,00127125	15,64%
		<b>PROMEDIO</b>	17,63%

La concentración de fructosa adicionada y la de la harina de garbanzo porquero es de 17.63% y la concentración de fructosa en garbanzo porquero es de 15.42%; se obtuvo la diferencia de 2.21% correspondiente a la concentración de fructosa que se recuperó con respecto al 3.65% de fructosa que se adicionó.

Finalmente, la eficiencia del método de extracción de los azúcares en estudio es de 60.55%.