



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**TRATAMIENTO TÉRMICO EN LA PRODUCCIÓN DE UN
CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE FRIJOL (*PHASEOLUS
VULGARIS*): DESACTIVACIÓN DE INHIBIDORES DE
TRIPSINA.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

SUSANA LIMA SÁNCHEZ



CDMX, MÉXICO

2018



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: Profesor: María Amanda Gálvez Mariscal
VOCAL: Profesor: José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio
SECRETARIO: Profesor: Mariana Ramírez Gilly
1er. SUPLENTE: Profesor: Juan Diego Ortiz Palma
2° SUPLENTE: Profesor: Roeb García Arrazola

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 312, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA,
CONJUNTO E DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM Y PLANTA PILOTO DEL
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

MARÍA AMANDA GÁLVEZ MARISCAL

SUPERVISOR TÉCNICO:

MANUEL ALBERTO CAMPOS GÓMEZ

SUSTENTANTE:

SUSANA LIMA SÁNCHEZ

Índice

1. Introducción.....	5
1.1. Leguminosas.....	5
1.1.1. Composición química de las leguminosas	5
1.1.2. Producción y Consumo de leguminosas a nivel mundial	6
1.2. Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	8
1.2.1. Morfología y taxonomía del frijol	8
1.2.2. Producción y consumo de frijol a nivel mundial y en México.....	9
1.2.3. Composición química del frijol	11
1.2.4. Proteína del frijol.....	14
1.2.5. Factores antinutrimientales del frijol	15
1.3. Productos proteínicos vegetales	18
2. Antecedentes	20
3. Justificación.....	22
4. Hipótesis.....	24
5. Objetivos	24
5.1. Objetivo principal.....	24
5.2. Objetivos particulares.....	24
6. Metodología.....	25
6.1. Materia prima	26
6.2. Proceso original y modificaciones generales.....	26
6.3. Tratamiento térmico	27
6.4. Determinación de inhibidores de tripsina (miniaturización de la técnica) .	28
6.5. Producción de lotes utilizando las condiciones adecuadas de tratamiento térmico.....	30
6.6. Análisis microbiológico	30
6.7. Análisis Químico Proximal (AQP).....	32
6.8. Análisis de almidón total y almidón resistente	32

7.	Resultados y discusión	33
7.1.	Análisis de Materia prima	33
7.2.	Determinación de inhibidores de tripsina (miniaturización de la técnica) .	37
7.3.	Tratamiento térmico	38
7.4.	Producción de lotes utilizando las condiciones adecuadas de tratamiento térmico.....	42
7.5.	Análisis microbiológico	49
8.	Conclusiones	51
9.	Perspectivas	52
10.	Bibliografía	53

1. Introducción

1.1. Leguminosas

Las leguminosas son plantas angiospermas (con flores y semillas encerradas en un fruto) cuya característica distintiva es tener vainas, donde se alojan las semillas, las cuales se abren longitudinalmente en dos valvas a lo largo de dos suturas. Se les agrupa como miembros de la familia *Leguminosae* [Aparicio-Fernández y Espinosa, 2015]. Esta familia se divide en tres subfamilias [Pratap y Kumar, 2011; Nogueira da Silva *et al.*, 2013], donde la subfamilia *Papilionoidae* contiene las especies de cultivo de leguminosas más importantes para el consumo humano: soya (*Glycine max*), chícharos (*Pisum sativum*), garbanzos (*Cicer arietinum*), frijol común (*Phaseolus vulgaris*), lentejas (*Lens culinaris*) y cacahuate (*Arachis hypogaea*).

Las leguminosas son una fuente importante de proteína la cual se complementa con la presente en los granos de cereales brindando una proteína completa, de calidad similar a la proteína animal, pero sin el aporte de grasa saturada y colesterol, además es de menor costo [Aparicio-Fernández y Espinosa, 2015; Gálvez y Salinas, 2015]. Las leguminosas son clave en la seguridad nacional de grandes grupos de población. Constituyen la principal fuente de proteínas en muchos países en desarrollo, en especial entre los grupos de población más pobres, que obtienen las proteínas y la energía de fuentes vegetales, mientras que en los países desarrollados, donde el consumo de leguminosas ha ido disminuyendo con los años, la consideración de alimentos saludables ha favorecido el incremento de su consumo [Olmedilla *et al.*, 2010].

1.1.1. Composición química de las leguminosas

La principal característica de estas plantas es su elevado contenido proteínico, las cuales son relativamente pobres en aminoácidos azufrados (metionina, cisteína y triptófano), pero con contenidos de lisina muy superiores a los de los granos de cereales, de forma que ambos grupos de alimentos se complementan para tener un aporte proteínico correcto para la dieta humana [Olmedilla *et al.*, 2010]. Además son excelentes fuentes de almidón de digestión y asimilación lenta,

benéficos para la salud, pues son un alimentos de índice glucémico (IG) bajo [Aparicio-Fernández y Espinosa, 2015]. También aportan vitaminas, sobre todo del complejo B y minerales importantes para la salud humana, tales como hierro, calcio y zinc [Fraile *et al.*, 2007].

Tabla 1. Composición proximal de algunas leguminosas [Aparicio-Fernández, 2015].

Nutriente	Soya	Garbanzo	Cacahuete	Chícharo	Haba	Lenteja	Frijol
Humedad (%)	8.54	11.53	6.5	11.27	10.98	10.4	11.02
Proteína (%)	36.49	10.30	25.80	24.55	26.12	25.8	21.60
Grasa (%)	19.94	6.04	49.54	1.16	1.53	1.06	1.42
Cenizas (%)	4.87	2.48	2.33	2.65	3.08	2.67	3.60
Carbohidratos	30.16	60.65	16.13	60.37	58.29	60.08	62.36
Fibra total (%)	9.30	17.4	8.50	25.5	25	30.50	15.2
Calcio (mg/100g)	277	105	92	55	103	56	123
Hierro (mg/100g)	15.70	6.24	4.58	4.43	6.70	7.54	5.02
Magnesio (mg/100g)	280	115	168	115	192	122	171
Potasio (mg/100g)	1797	875	705	981	1062	955	1483
Zinc (mg/100g)	4.89	3.43	3.27	3.01	3.14	4.78	3.65
Selenio (mg/100g)	17.8	8.2	7.2	1.60	8.2	8.3	3.2

1.1.2. Producción y Consumo de leguminosas a nivel mundial

Las leguminosas presentan una amplia distribución en el mundo debido a su gran variedad de especies y cultivos. Según datos la Dirección de Estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAOSTAT, 2015] durante el periodo de 1993 a 2013 las regiones con mayor porcentaje en la producción fueron Asia (45.2 %) y América (19.2 %). Como se puede apreciar en la Figura 1 los principales países productores a nivel mundial son: India, Brasil y China.

Entre 1961 y 2012, gracias a la industrialización de la agricultura, se presentaron aumentos masivos en el rendimiento y producción de muchos alimentos básicos, desafortunadamente las leguminosas (a excepción de la soya) no han experimentado el mismo aumento de producción en los últimos 50 años. Durante este período el maíz, trigo y arroz aumentaron la producción entre el 200 y 300 por

ciento, mientras que las leguminosas crecieron en sólo el 59 por ciento durante este mismo intervalo de tiempo [FAO, 2014].

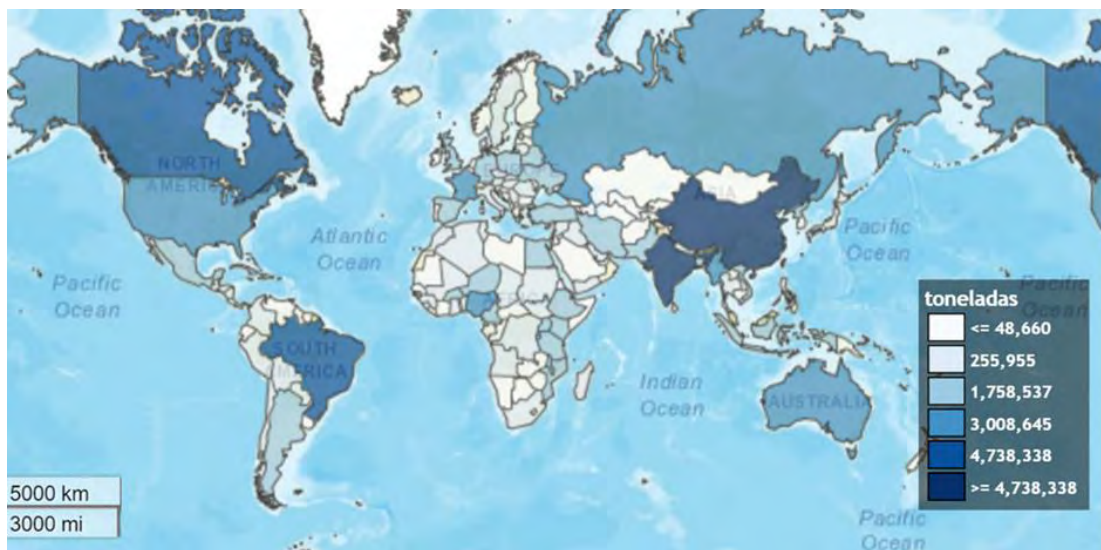


Figura 1. Distribución de la producción a nivel mundial de las leguminosas. [FAOSTAT, 2015].

El consumo de leguminosas ha experimentado una disminución lenta pero constante tanto en los países desarrollados como en desarrollo, el promedio mundial se encuentra alrededor de 7 kg/ persona/ año [FAO, 2016a]. Sin embargo, las leguminosas son una importante fuente de proteínas y minerales en muchos países en desarrollo debido a su composición química, en especial entre los grupos de población más pobres [Olmedilla *et al.*, 2010]. La proteína obtenida de leguminosas es menos costosa en relación con los productos de origen animal, por lo que implica una contribución a la seguridad alimentaria. [FAO, 2016b]. De las especies conocidas, únicamente siete de ellas son producidas comercialmente para consumo: soya, cacahuate, frijol, chícharo, lenteja, haba y garbanzo [Aparicio-Fernández y Espinosa, 2015]. En México el frijol representa un producto de suma importancia debido a que está asociado históricamente con el desarrollo de culturas prehispánicas, aparte de ser un alimento tradicional en la cocina mexicana [Salinas, 2014].

1.2. Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

1.2.1. Morfología y taxonomía del frijol

El frijol es una planta de vida corta, que se enreda en forma de espiral en algún soporte, o en forma de arbusto. Sus hojas son alternas (nacen una a una a lo largo del tallo), pecioladas (unidas al tallo por un rabo), compuestas con tres hojas (llamadas foliolos) ovaladas a rómbicas, con el ápice agudo. El color de sus flores tiene tonalidades rosa, lila y violeta. Sus semillas se encuentran en una vaina lineal, a veces cubiertos de pelillos (Figura 2) [Vibrans, 2009].

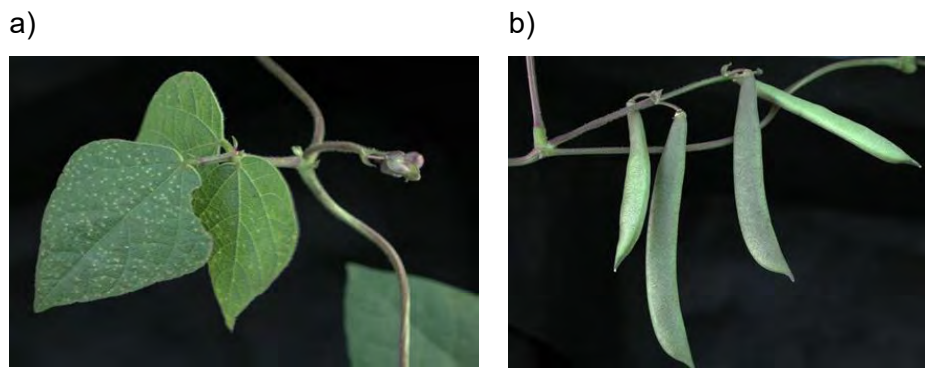


Figura 2. Hojas (a) y fruto (b) de *Phaseolus vulgaris* [Tenorio, 2000].

Las semillas, lo que conocemos como frijol propiamente, tienen forma de riñón y pueden ser oblongas, ovals o redondeadas y de color rojo, amarillo, café, pinto o negro según la variedad [Financiera Rural, 2011]. El frijol es una dicotiledónea ya que cuenta con dos cotiledones donde se encuentran las reservas nutritivas, cubiertos por la testa que es la capa secundaria del óvulo [CIAT, 1984] que se compone principalmente de fibra. En la Figura 3 se aprecia la estructura del frijol.

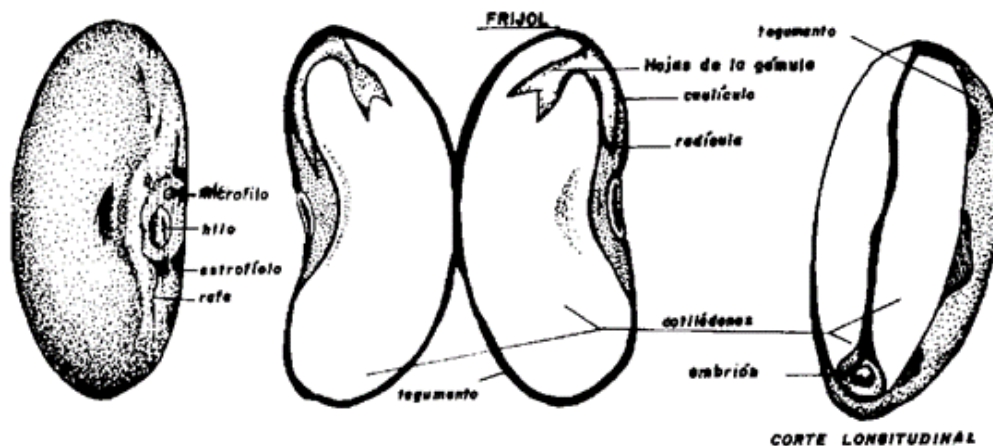


Figura 3. Estructura de la semilla frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) [FAO, 1993].

1.2.2. Producción y consumo de frijol a nivel mundial y en México

La producción mundial de frijol creció a una tasa promedio anual de 0.8 por ciento entre 2003 y 2013, para ubicarse en 22.8 millones de toneladas. En siete países se concentró el 64.8 por ciento de la producción mundial de frijol en 2013: Myanmar, India, Brasil, México, Tanzania, Estados Unidos y China (Figura 4) [FIRA, 2015]. Entre los principales países productores, destaca la producción de frijol entre 2003 y 2013 en Myanmar y Tanzania, donde creció a tasas promedio anuales de 7.4 y 12.8 por ciento, respectivamente. Por el contrario, en India, Brasil y México, el volumen de producción se redujo durante el mismo período, respectivamente. A pesar de lo anterior, en el año 2014, México se posicionó dentro de los cinco principales productores con 1.27 Mt (Figura, 5) [FIRA, 2015; FAOSTAT, 2015a].

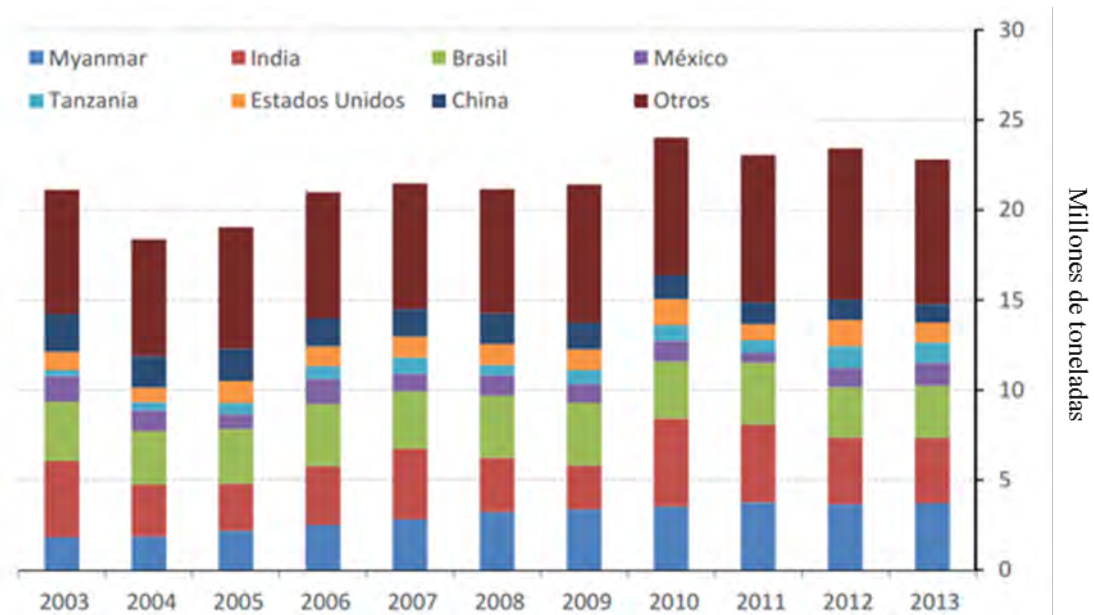


Figura 4. Producción mundial de frijol, 2003–2013. (Millones de toneladas) [FIRA, 2015].

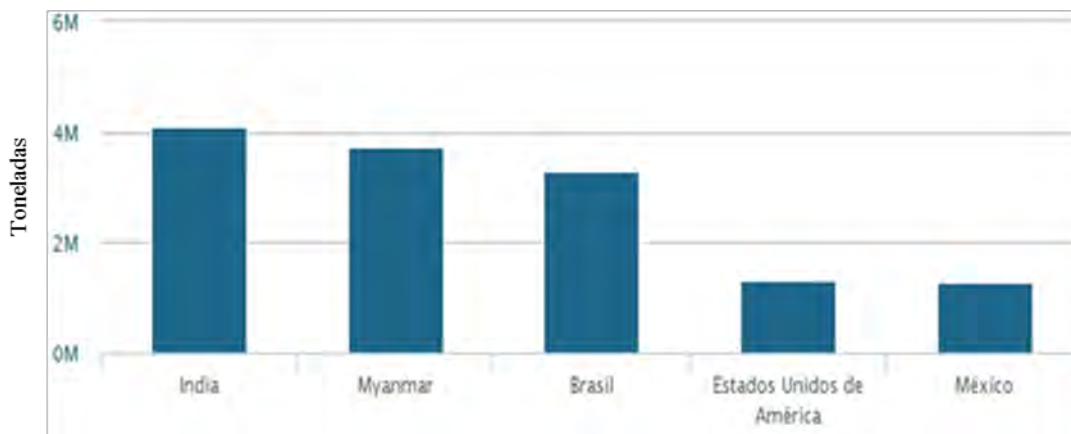


Figura 5. Principales productores de frijol en 2014 [FAOSTAT, 2015a].

A nivel mundial, el consumo de frijol, al igual que la producción, muestra una alta concentración. Los primeros cinco países consumidores participan con el 57.7 por ciento del consumo mundial: India (24.7 %), Brasil (19.0 %), Estados Unidos (5.5 %), México (5.3 %) y Tanzania (3.3%). Sin embargo, en México se ha presentado una disminución en su consumo, como se mencionó. En los años sesenta el registro anual era de 18.46 kg *per cápita* [Gálvez y Salinas, 2015] mientras que en 2015 tan solo fue de 10.8 kg *per cápita*

[SIAP, 2015]. Esto se debe a que la sociedad enfrenta modificaciones importantes, incluyendo hábitos alimenticios, a consecuencia del urbanismo, la migración y el empleo [Gálvez y Salinas, 2010; SE, 2012].

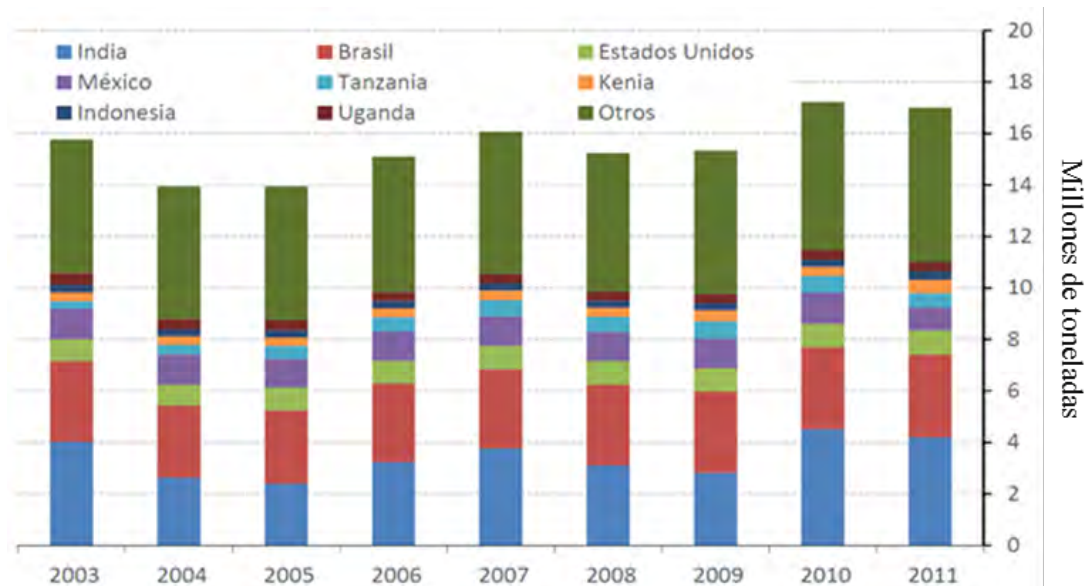


Figura 6. Consumo mundial de frijol, 2003-2011 (Millones de toneladas) [FIRA, 2015].

En México el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ha generado alrededor de cincuenta variedades de frijol común. No obstante, la poca divulgación sobre su calidad y características nutricionales distintivas ha ocasionado que sólo se cultiven comercialmente 20 variedades mejoradas [Rodríguez-Licea *et al.*, 2010; SE, 2012]. Se clasifican las variedades de frijol de acuerdo a las características de su grano, principalmente en relación a su tamaño y color.

1.2.3. Composición química del frijol

El frijol presenta alto contenido de proteínas: dependiendo del tipo, puede presentar de 14% hasta un 33%. En relación a la aportación de carbohidratos el frijol aporta de 52 a 76%, mientras que la fracción más pequeña corresponde a los lípidos, su concentración va de 1.5 a 6.2%. También es una buena fuente de fibra

cuyo valor varía entre el 14 y 19%. Además este alimento también es una fuente considerable de micronutrientes como calcio, hierro, fósforo, magnesio y zinc y de las vitaminas tiamina, niacina y ácido fólico [Ulloa *et al.*, 2007].

Carbohidratos

Los carbohidratos constituyen la fracción principal del grano del frijol. De éstos, el almidón y la fibra dietética son los mayores constituyentes, con una más pequeña pero significativa cantidad de mono, di y oligosacáridos. Esta leguminosa contiene una elevada proporción de carbohidratos no digeribles los cuales incluyen principalmente almidón resistente y la fibra dietética, en la que prevalecen la celulosa, hemicelulosa, y ligninas, pero la también se encuentra la pectina. La fibra dietética se divide en soluble (FDS) e insoluble (FDI). La FDI se constituye por lignina, celulosa y hemicelulosa, mientras que el mayor componente de la FDS en leguminosas, como el frijol, es sustancias pécticas [Silva-Cristobal *et al.*, 2010]. El contenido de FDI es superior que FDS en frijol. En frijol negro se han reportado contenido de FDI de 21.5 % [Basso Los, *et al.*, 2018], mientras que Silva-Cristobal y colaboradores (2010) reportan un contenido de 41.7 % de FDI también en frijol negro. Otras variedades se reportan contenidos de 33.9 % (frijol pinto) [Saura-Calixto *et al.*, 2000] y en frijol brasileño (28.4 %) [Menezes *et al.*, 2004]. Se han reportado valores más bajos (5.6% [Vargas-Torres *et al.*, 2004b]; 5.8 % [Basso Los, *et al.*, 2018] y 7.7 % [Menezes *et al.*, 2004]). Mientras que la concentración FDS en frijol negro reportada es de 10.8 % [Silva-Cristobal *et al.*, 2010], en frijol pinto es de 9.7 % [Saura-Calixto *et al.*, 2000].

En diferentes leguminosas (frijol, garbanzo, lentejas y chícharos) la fibra total varía entre 14 y 32%, con FDS y FDI en intervalos de 0-9 y 10-28, respectivamente contra 3.00-15.02, 0.86-4.33, y 2.14-10.49%, respecto a los cereales como trigo, arroz y cebada) [Yadav *et al.*, 2010; Rebello *et al.*, 2014; Dueñas *et al.*, 2016].

Numerosos beneficios a la salud han sido asociados al consumo de cantidades adecuadas de carbohidratos no digeribles incluyendo la disminución de colesterol en la sangre, reducir el riesgo de enfermedades del corazón, reducir el riesgo de

cáncer en el color y mejorar la tolerancia a la glucosa, pues presentan un índice glicémico bajo [Guevara-González y Torres-Pacheco, 2006; Siddiq y Sultan., 2011].

Lípidos

El frijol posee una baja cantidad de lípidos. Siete variedades de frijol (*P. vulgaris*) mostraron un intervalo de contenido graso de 1.73 a 1.98% [Basso Los, *et al.*, 2018]. La proporción mayoritaria corresponde a los ácidos grasos poliinsaturados (omega-3 y omega-6), seguido de los ácidos grasos saturados y ácidos grasos monoinsaturados (omega-9) [Salinas, 2014].

Vitaminas

Provee una amplia variedad de vitaminas incluyendo: vitamina K, vitamina E, colina, tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina (vitamina B3), ácido pantoténico (vitamina B5), ácido fólico (vitamina B9) y pequeñas cantidades de ácido ascórbico. [Siddiq y Sultan, 2011; Lorán-Juárez, 2013].

Minerales

Los frijoles son ricos en minerales como el potasio, fósforo, magnesio, calcio, hierro, sodio, zinc, selenio, manganeso y cobre [Salinas, 2014]. Pero su biodisponibilidad es baja debido a la presencia de fitatos, compuestos que constituyen el principal inhibidor de la absorción de hierro y zinc. Además el contenido importante de polifenoles en el frijol negro también inhibe la absorción de hierro. No obstante la adición de enzimas microbianas parece ser la forma más eficiente para conseguir una degradación completa de los fitatos y polifenoles [Olmedilla *et al.*, 2010].

Proteínas

La proteína de frijol es relativamente rica en aminoácidos esenciales, particularmente lisina y metionina. Sus aminoácidos limitantes son aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y triptófano. Debido a que el frijol es una fuente de proteínas barata se ha tenido interés por investigar la calidad y las propiedades de la proteína del frijol.

1.2.4. Proteína del frijol

Las principales proteínas en la semilla de frijol común son denominadas faseolina, lectinas y argelinas [Osborn y Brown, 1988]. La faseolina es la principal fracción proteínica del frijol cultivado y representa 40-60% de la proteína total. Es una globulina soluble en soluciones salinas (NaCl 0.5 M) a casi cualquier pH. Este grupo de proteínas está glicosilada un 3-5 % y contiene residuos ácidos y aminos, y alrededor del 1% de residuos que contienen azufre [Sun y Tall, 1975]. Al igual que otras proteínas de semilla de la familia de esta leguminosa, la faseolina es deficiente en aminoácidos azufrados, como metionina [Camacho *et al.*, 2010]. Las lectinas son glicoproteínas y constituyen un grupo heterogéneo de proteínas, que son resistentes a la proteólisis del tracto gastrointestinal, con la habilidad de aglutinar eritrocitos de algunos tipos de sangre y se encuentran en las leguminosas en un intervalo de 5 al 20 % de la proteína total [Guevara-González y Torres-Pacheco, 2006]. Las argelinas poseen subunidades con pesos moleculares entre 35 kDa y 42 kDa, dependiendo de la variante, la proteína nativa tiene un peso molecular de 80 kDa, correspondiendo a un dímero de subunidades polipeptídicas, las dos proteínas tiene pesos moleculares similares inclusive cuando se encuentran deglicosiladas. La composición química de las argelinas contiene más metionina, cisteína y residuos básicos de aminoácidos y más residuos glicosilados [Osborn y Brown, 1988].

Aunque el frijol tiene un buen contenido de proteínas, buen aporte energético, y sea una importante fuente de minerales, no se pueden aprovechar en su totalidad debido a la presencia de factores antinutrimientales como: polifenoles, inhibidores de proteasas, lectinas y ácido fítico.

1.2.5. Factores antinutrimientales del frijol

Los factores antinutrimientales son sustancias que se generan por el metabolismo secundario de la planta para protegerse de depredadores como bacterias, hongos e insectos y otros animales. Estos compuestos interfieren en los procesos digestivos afectando la utilización de los alimentos y comprometen la salud de los animales que los consumen [Savón y Scull, 2006]. Sin embargo, en numerosos estudios se ha reconsiderado el impacto benéfico que estos pueden tener en la salud, por lo que actualmente también se les considera compuestos bioactivos [Olmedilla *et al.*, 2010]. En función de las circunstancias, puede ser necesario eliminarlos, disminuir su actividad o mantenerlos [Champ, 2002].

- **Ácido fítico.** El frijol es una fuente importante de minerales, sin embargo su biodisponibilidad se considera menor que otros alimentos debido al ácido fítico. La mayor parte del fosforo presente en el frijol se encuentra almacenado en la forma hexafosfatada del ácido fítico [Champ, 2002]. Además el ácido fítico tiene una elevada capacidad quelante de iones metálicos, especialmente zinc, calcio y hierro. Se han estudiado las maneras de eliminar eficientemente los fitatos durante el procesamiento de los alimentos aumentando la actividad de las fitasas o añadiendo preparaciones de enzimas [Bilbao *et al.*, 2000, Olmedilla *et al.*, 2010].
- **Polifenoles.** La coloración de las semillas del frijol es determinada por la presencia de compuestos polifenólicos [Guevara-González y Torres-Pacheco, 2006], las variedades oscuras de frijol tienen un contenido importante de polifenoles [Champ, 2002]. Los principales compuestos polifenólicos son los flavonoides como antocianinas y taninos condensados (proantocianidinas). Los polifenoles inhiben la absorción de hierro. Por lo tanto, los frijoles podrían ser una fuente importante de este mineral si se logra degradar los polifenoles [Olmedilla *et al.*, 2010]. Actualmente, ha tomado interés en estudiar la capacidad antioxidante, provenientes del contenido de polifenoles, en diferentes variedades de frijol [Guevara-González *et al.*, 2006].

● **Lectinas.** Las lectinas o fitohemaglutininas son glicoproteínas que pueden unirse reversiblemente a segmentos específicos de azúcar mediante puentes de hidrógeno e interacciones de Van Der Waals, con uno o más sitios de unión por subunidad. Las lectinas son proteínas tetraméricas compuestas por dos diferentes tipos de subunidades: Subunidad tipo-E (PM = 34 kDa) y subunidad tipo-L (32 kDa). La primera tiene la característica de unirse a los eritrocitos mientras que la segunda a los linfocitos. Como la mayoría de las lectinas no se degradan durante su paso a través del tracto digestivo y son capaces de unirse a las células epiteliales que expresan restos de carbohidratos reconocidos por ellas. Una vez unidas al tracto digestivo, las lectinas pueden causar cambios dramáticos en la morfología y metabolismo del estómago y/o intestino delgado y activar señales de cascada que alteran el metabolismo intermediario. Por lo tanto, las lectinas inducen cambios en la digestión, absorción, funciones de protección o secreción del todo el sistema digestivo y afectan a la proliferación y regeneración celular [Cabrera-Orozco *et al.*, 2013]. Los efectos tóxicos de la ingesta de lectinas son debidos a su capacidad de combinarse con sitios receptores específicos de las células de revestimiento del intestino delgado y causan una interferencia no específica de la absorción de los nutrientes. Las lectinas también son consideradas factores bioactivos pudiendo por tanto ser utilizadas de forma pura en reacciones biológicas para fines de diagnósticos clínicos e investigaciones de estructuras de proteínas y carbohidratos en células, pudiendo obtener diversos tratamientos alternativos a enfermedades como cáncer. También se han considerado como coadyuvantes de la vacunación oral pues incrementan la producción de anticuerpos [Elizalde *et al.*, 2009]. A pesar de los efectos perjudiciales a la salud por la ingesta de estos compuestos, se trata de sustancias termolábiles: estos compuestos pueden desdoblarse o desnaturalizarse perdiendo su poder aglutinante y sufrir una rápida eliminación por calor húmedo [Bilbao *et al.*, 2000].

● **Inhibidores de proteasas.** Son compuestos de naturaleza proteínica que se unen e inactivan a su proteasa objetivo, reduciendo la digestibilidad y absorción de las proteínas. El rol fisiológico de los inhibidores de proteasas de la planta no está claro. Se ha propuesto que estos inhibidores se utilizan como defensa a ataques de microorganismos o de insectos [Domoney y Welham, 1993]. Sin embargo, se cree que estos factores tiene otro rol, pues cambios en la expresión de los genes relacionados con estos factores han causado alteraciones en la morfología de las flores, el crecimiento de la planta y el desarrollo de la semilla [Hartl *et al.*, 2010]. Los inhibidores de proteasas se han clasificado en diez familias con base en sus pesos moleculares, homología en la secuencia de aminoácidos y el contenido de cisteína [Alizadeh, 2012]. En el frijol se han encontrado inhibidores de la familia Bowman-Birk (que actúa uniéndose a la tripsina y quimotripsina) y Kunitz (que actúa uniéndose en forma preferente a la tripsina) [Elizalde *et al.*, 2009]. El efecto más importante de los inhibidores de proteasas es la inhibición del crecimiento, producida principalmente por la inactivación de la tripsina y la quimotripsina, debido a la formación de complejos estables e inactivos; esto origina una hidrólisis incompleta de las cadenas peptídicas por parte de estas enzimas digestivas y por consiguiente, una disminución en la digestibilidad de la proteína; conjuntamente se ocasiona un aumento en la secreción pancreática de enzimas digestivas como tripsina, y quimotripsina, todas estas ricas en aminoácidos, principalmente azufrados como la cisteína y la metionina dando como resultado la pérdida de proteína endógena rica en aminoácidos azufrados esenciales [De Lange *et al.* 2000; Muzquiz *et al.*, 2006]. Gran parte de la actividad de estos inhibidores puede eliminarse utilizando diversos tratamientos como: procesos térmicos, la germinación y la fermentación; estos tratamientos desnaturalizan las proteínas mejorando su digestibilidad. Sin embargo un tratamiento por calor excesivo puede resultar en proteínas dañadas, disminución de los aminoácidos disponibles y una digestibilidad más baja de la proteína, lo que representa pérdida de calidad y riesgo en productos procesados [Elizalde *et al.*, 2009]. Aunque, existen diferentes reportes que sugieren que estos compuestos

pueden tener un efecto benéfico a la salud humana a través de su potencial uso para prevenir del cáncer [Champ, 2002; Duranti, 2006].

1.3. Productos proteínicos vegetales

La industria agroalimentaria genera una gran cantidad de residuos ricos en proteínas, como lo son las harinas desengrasadas procedentes de la extracción del aceite de las semillas, principalmente de la soya [Girón-Calle *et al.*, 2003]. El interés en el aprovechamiento de estas proteínas ha impulsado el desarrollo de procesos de obtención y mejora de las mismas mediante la producción de productos proteínicos vegetales (PPV).

Los PPV son productos alimenticios obtenidos de materias vegetales mediante la reducción o eliminación de algunos de los principales constituyentes no proteínicos (agua, aceite, almidón, otros carbohidratos), de manera que se obtiene una mayor concentración de proteína [CODEX STAN 174-1989]. En el caso de los productos proteínicos de la soya se han clasificado dependiendo su concentración de proteínas [CODEX STAN 175-1989]:

- Harina proteínica: 50 por ciento o más, y menos del 65 por ciento.
- Concentrados proteínicos: 65 por ciento o más y menos del 90 por ciento.
- Aislados proteínicos: 90 por ciento o más.

Para obtener la harina proteínica el frijol crudo es limpiado, quebrado, descascarado y hojueleado. Las hojuelas se pueden producir con toda su grasa, y parcialmente o totalmente desengrasadas. Aunque las harinas desengrasadas son más comunes en el mercado, ya que la extracción del aceite resulta económicamente ventajosa porque se utiliza de forma industrial en la manufactura de margarinas, aceites de mesa, mayonesas y otros productos alimenticios e industriales [de Luna-Jiménez, 2007]. Las hojuelas desengrasadas se cuecen o tuestan para la inactivación de la lipoxigenasa, los inhibidores de tripsina y otros factores antifisiológicos [Smallwood, 2000].

De la harina proteínica desengrasada se obtienen los concentrados y los aislados de proteína. Se eliminan los carbohidratos presentes en la harina, así como la

grasa residual. Existen diferentes métodos y variaciones en los procesos de producción, pero todos se basan en la purificación de la proteína por solubilidad diferencial. Dependiendo del método utilizado las propiedades físicas y funcionales pueden variar. Estos productos son diseñados específicamente para proporcionar las características funcionales deseadas según el alimento que se trate. La concentración de proteína vegetal añadida a un alimento vendrá dada por las características tanto nutricionales como funcionales deseadas para el producto final por la industria y, sobre todo, por la aceptación por parte del consumidor [Girón-Calle *et al.*, 2003].

2. Antecedentes

En el grupo de trabajo de la Facultad de Química se ha logrado la obtención de un concentrado de proteínas del frijol negro a nivel planta piloto. El proceso consiste en la extracción por solubilidad diferencial de las fracciones proteínicas en la semilla (globulinas, glutelinas y albúminas) con posterior precipitación isoeléctrica, recuperación de proteínas (mediante la centrifugación), tratamiento térmico (para la eliminación de factores tóxicos y antinutrimientales) y finalmente secado por aspersión. Las condiciones de proceso se encuentran especificadas en el trabajo de tesis de Salinas [2014], las cuales se han sometido solicitud de patente ("Concentrado de proteínas de frijol con propiedades nutrimentales y funcionales, y su uso". Expediente: MX/a/2015/007746. Folio: MX/E/2015/043382. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, 17 de junio de 2015) por parte de los investigadores del Departamento de Biotecnología y Alimentos de la Facultad de Química, y de la Planta Piloto del IBT.

Se evaluaron sus características fisicoquímicas: solubilidad en diferentes soluciones, absorción de agua, absorción de aceite y capacidad antioxidante [Salinas, 2014]. Además se evaluó su efecto en el crecimiento en ratas, así como en los parámetros bioquímicos hormonales relacionados con lipogénesis. El efecto de la proteína de frijol sobre el crecimiento de animales experimentales no presentó diferencia significativa con la curva de crecimiento de ratas alimentados con proteína de soya [Quiñones, 2010]. Mientras que los resultados de concentración de insulina, glucagón y su relación insulina/glucagón fueron menores en los animales que se alimentaron con proteína de frijol en relación con el grupo control alimentados con caseína, lo cual podría indicar una menor lipogénesis [Tovar y Torres 2010; Ortiz-Huidobro *et al.*, 2012]. La expresión de la proteína SREBP-1 (*Sterol Regularoy Element-Binding Protein-1*) se ve reducida con el consumo de proteína de frijol. Se trata de un factor de transcripción que se encarga de regular la expresión de genes de la síntesis de ácidos grasos y la disminución de su expresión se asocia con la disminución de la lipogénesis lo que conlleva a una menor acumulación de lípidos particularmente en el hígado, favoreciendo la disminución de la resistencia de la acción de la insulina.

Debido a las condiciones de secado del proceso propuesto por Quiñones [2010] el concentrado de proteína no presentaba las propiedades funcionales necesarias para su potencial uso en formulaciones de alimentos y fue necesario mejorarlo. Hasta ahora, se han establecido mejores condiciones de extracción de proteínas y secado del producto durante el proceso de producción a nivel planta piloto [Salinas, 2014]. Dichas modificaciones mejoraron la pureza en el concentrado de proteína, aumentando el rendimiento del proceso y redujeron el tiempo total del proceso (Tabla 2). Además se realizó su caracterización microbiológica, fisicoquímica, bioquímica y funcional del producto final. El concentrado mostró un gran potencial para uso en formulaciones de alimentos al contar con una alta capacidad para absorber agua y una baja capacidad para absorber aceite, además de una solubilidad media y buenas capacidades espumantes y emulsificantes.

Tabla 2. Comparación entre procesos para obtención de concentrado proteínico de frijol negro.

	Proceso Original (Quiñones, 2010)	Proceso mejorado (Salinas, 2014)
Cantidad inicial muestra (kg)	12	12
Aislado seco obtenido (g)	1716 ± 57 ^a	1824 ± 44 ^b
Rendimiento neto aislado en masa (%)	14.30 ± 0.47	15.20 ± 0.37
Rendimiento obtención de proteína	48.84 ± 1.62	58.38 ± 1.4
Tiempo total del proceso (h)	41	19
^a Promedio de dos lotes ^b Promedio de tres lotes		
Nota: Determinaciones realizadas en base húmeda		

Para continuar investigando los efectos y la calidad de la proteína en el concentrado obtenido a partir del frijol, es necesario mejorar un punto crítico de control en el proceso, el tratamiento térmico. El cual asegura la inocuidad del producto, además de disminuir la actividad de los factores antinutrientales presentes, principalmente de los inhibidores de tripsina.

3. Justificación

El frijol es un producto que representa una tradición en la alimentación del mexicano, cumpliendo diversas funciones, tanto de carácter alimentario como para el desarrollo socioeconómico. Sin embargo, se ha presentado una disminución en el consumo de frijol. En los años sesenta el registro anual era de 18.46 kg per cápita [Gálvez y Salinas, 2015] mientras que en 2015 tan solo fue de 10.8 kg per cápita [SIAP, 2015]. Esto se debe a que la sociedad enfrenta modificaciones importantes en sus hábitos alimenticios, a consecuencia del urbanismo y la migración [Gálvez y Salinas, 2015; FIRA, 2011]. En el mercado han surgido nuevos productos alimenticios que se adecúan a las formas de vida urbana, pero desafortunadamente gran parte de estos productos son alimentos refinados de trigo o procesados que presentan elevados contenidos calóricos y bajos perfiles nutricionales. Su consumo excesivo y el sedentarismo se relacionan directamente con enfermedades no transmisibles (ENT), como son enfermedades cardiovasculares, ataques al corazón, hipertensión, cáncer y diabetes mellitus, cada vez más frecuentes en la población mexicana [Gálvez y Salinas, 2015].

La elaboración de productos alimenticios novedosos, a partir del frijol, que se adapten a las nuevas exigencias de los consumidores, es una oportunidad para reactivar el consumo de esta leguminosa. Lo anterior detonaría una demanda del producto y por consiguiente beneficios a lo largo de toda la cadena de valor [FIRA, 2011]. De acuerdo con Lestari y Marsono [2017], el uso de frijoles como un ingrediente en alimentos funcionales debería de ser promovido ya que sería un acercamiento efectivo y económico para mejorar la salud.

Los temas desarrollados en los párrafos anteriores, impulsaron a investigaciones previas [Quiñones 2011; Salinas 2014] y a este trabajo a utilizar el frijol como nueva fuente potencial de proteína vegetal aislada. Como se mencionó en los antecedentes con más detalle, se ha logrado la obtención de un concentrado de proteínas del frijol negro a nivel planta piloto, que mostró un gran potencial para uso en formulaciones de alimentos [Salinas, 2014]. Además, que se ha estudiado el efecto del consumo de proteína de frijol negro en los parámetros bioquímicos

hormonales relacionados con lipogénesis, los resultados demuestran que el consumo de esta proteína podría ayudar a la reducción de la síntesis de ácidos grasos y a la regulación de los niveles glucosa e insulina [Quiñones, 2011].

El proceso utilizado en dichas investigaciones permitió disminuir la actividad antitripsina en el concentrado de proteína de frijol, sin embargo no se habían establecido las condiciones precisas para disminuir dicha actividad a un nivel adecuado para el crecimiento de animales de laboratorio, y en algunos casos el producto debía de ser reprocesado. Es por lo anterior que surgió la necesidad de mejorar el tratamiento térmico del proceso. El objetivo principal de este trabajo es hallar las condiciones adecuadas de tratamiento térmico para asegurar la inocuidad del producto final y llevar a cabo un lote de producción utilizando dichas condiciones. Lo anterior, permitirá realizar un análisis posterior sobre los beneficios del consumo de la proteína de frijol, principalmente conocer el efecto de su consumo en relación con afecciones crónicas, como lo es la diabetes, mediante la experimentación con animales de laboratorio.

4. Hipótesis

Si se estandariza el tratamiento térmico en el proceso de producción del concentrado de proteína de frijol, se logrará obtener un producto más homogéneo disponible para investigaciones posteriores y así contribuir a la generación de información esencial para la revalorización del frijol en México.

5. Objetivos

5.1. Objetivo principal

Estandarizar las condiciones de tratamiento térmico en la producción de un concentrado de proteína de frijol negro (*Phaseolus vulgaris*), basándose en la desactivación de los inhibidores de tripsina.

5.2. Objetivos particulares

- Implementar la miniaturización de la metodología propuesta por Kakade (1974) para la determinación de la actividad antitripsina de la materia prima y del concentrado de proteína de frijol.
- Realizar la producción de un lote de concentrado de proteína de frijol con las condiciones establecidas, para que se utilice en una investigación sobre el efecto de su consumo en relación con afecciones crónicas, como la diabetes.

6. Metodología

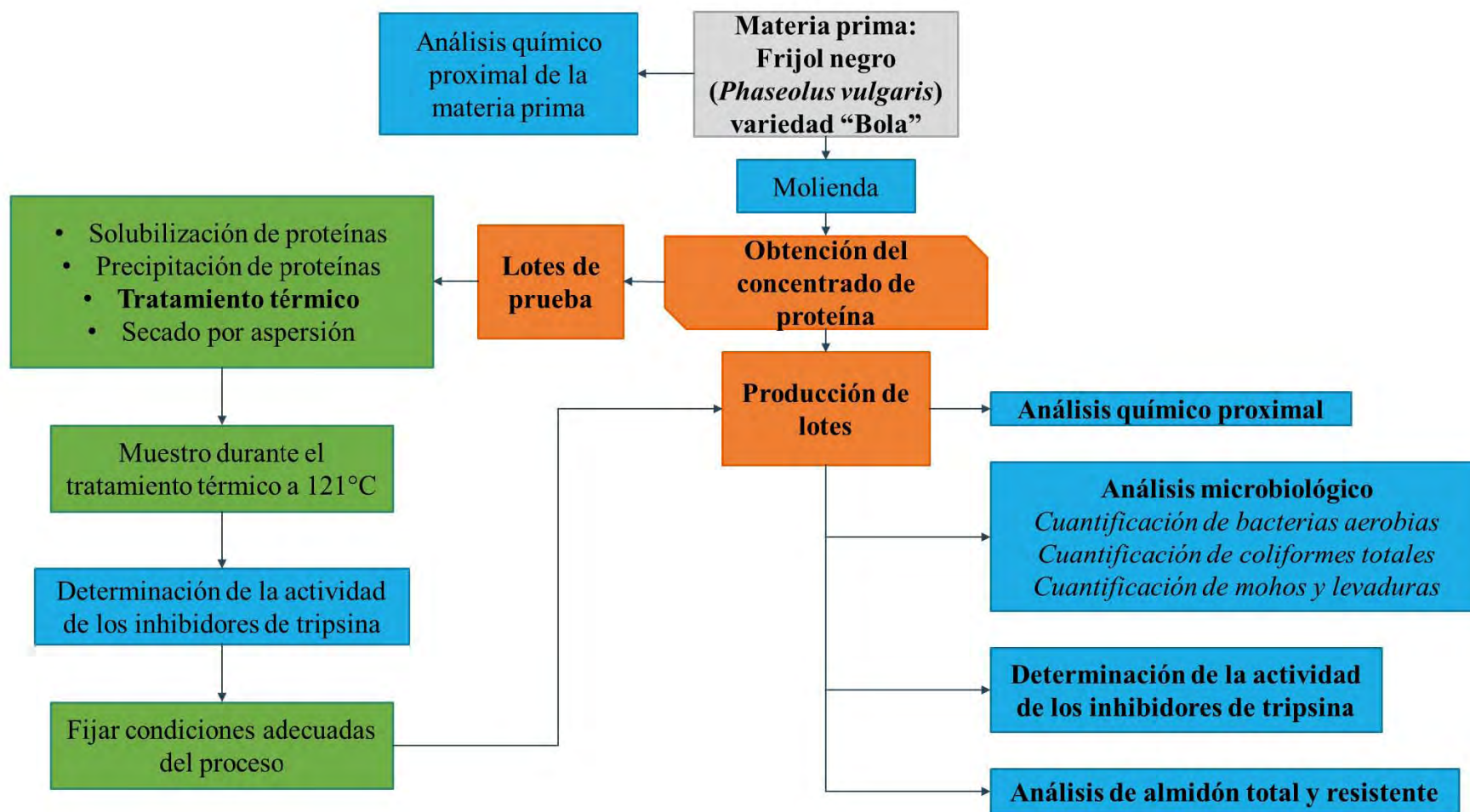


Figura 7. Diagrama general de la estrategia experimental desarrollada en este trabajo

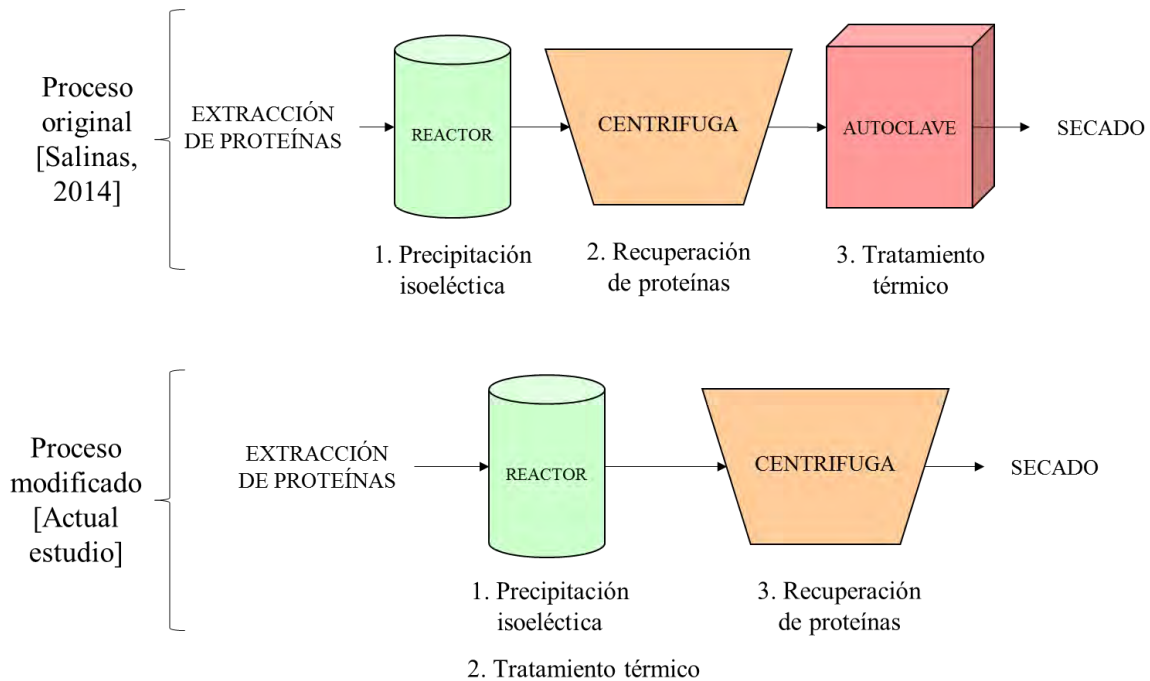
6.1. Materia prima

Para la elaboración del concentrado de proteína se utilizó un lote comercial de frijol negro entero, de la variedad “Bola”, sembrado en Zacatecas. Esta semilla fue obtenida por donación del Sr. José Antonio Bojorge, de la empresa Campo Verde S.A. de C.V. Previo al proceso de producción los granos se sometieron a una molienda doble en un molino de cuchillas (Fitz Patrick Company®) ubicado en el establecimiento con razón social “Molino El Faro” Col. Tacuba, Ciudad de México.

6.2. Proceso original y modificaciones generales

El proceso de obtención del concentrado de proteínas se realizó en la Unidad de Escalamiento y Planta Piloto del Instituto de Biotecnología (IBT), UNAM, fue establecido por Quiñones [2010] y modificado por Salinas [2014]. Como se había mencionado en antecedentes, el proceso original consistía en la extracción por solubilidad diferencial de las fracciones proteínicas de la semilla (globulinas, glutelinas y albúminas) con posterior precipitación isoeléctrica, recuperación de proteínas (mediante la centrifugación), tratamiento térmico (para la eliminación de factores tóxicos y antinutrimientales) y finalmente secado por aspersion. En específico, el tratamiento térmico se llevaba a cabo en una autoclave donde se colocaban una serie de recipientes con un volumen y porcentaje de sólidos determinados, a 121°C durante 2 horas, para que el tratamiento térmico fuera homogéneo. Se pretendía hacer la optimización de estas condiciones, sin embargo debido al tiempo y problemas de disponibilidad de los equipos necesarios en la planta fue necesario modificar el proceso y realizar el tratamiento térmico dentro del reactor, justo después de la precipitación de proteínas. En la Figura 8 se muestra una comparación de los dos procesos.

Figura 8. Modificación del proceso de producción del concentrado de proteína de frijol.



6.3. Tratamiento térmico

El objetivo principal del tratamiento térmico durante la producción es la disminución de la actividad de los inhibidores de tripsina, además de garantizar la inocuidad del concentrado de proteína vegetal. Esta modificación al proceso original se llevó a cabo dentro de un reactor de 120 L (Baldor), después de la precipitación de las proteínas. Para encontrar el tiempo de calentamiento adecuado para la desactivación de los inhibidores de tripsina a 121 °C se muestreó en condiciones estériles durante el tratamiento en los tiempos: 0, 15, 30, 40, 60, 80, 100, 120 y 140 min. Para realizar este experimento se llevaron a cabo dos lotes experimentales.

El tiempo mínimo necesario para disminuir la concentración de los inhibidores de tripsina en la muestra hasta alcanzar los niveles adecuados para el crecimiento de animales de laboratorio (< 31.01 UIT/mg de muestra), fue fijado para la producción de los lotes subsecuentes. Este dato se obtuvo de una muestra de concentrado de proteína de frijol elaborado anteriormente (muestra de referencia) [Salinas, 2014] que fue probado en animales de laboratorio los cuales crecieron adecuadamente

al ser alimentados con el concentrado de proteína de frijol como única fuente proteínica.

6.4. Determinación de inhibidores de tripsina (miniaturización de la técnica)

Para la determinación de la actividad de los inhibidores de tripsina se realizó una miniaturización del método reportado por Kakade [1973] y modificado por Klomklao [2011] lo que permitió disminuir el volumen de reacción y acortar el tiempo de la determinación. El método de Kakade utilizado es una técnica espectrofotométrica, donde se detecta la actividad proteolítica remanente de la tripsina, después de estar en contacto con el extracto de inhibidores de la muestra. Se utiliza un compuesto sintético, BAPNA benzoil-arginina-p-nitroanilida, este compuesto presenta un enlace peptídico que es hidrolizado en condiciones adecuadas, por la tripsina, produciendo p-nitroanilina el cual proporciona coloración a la reacción (Figura 9).

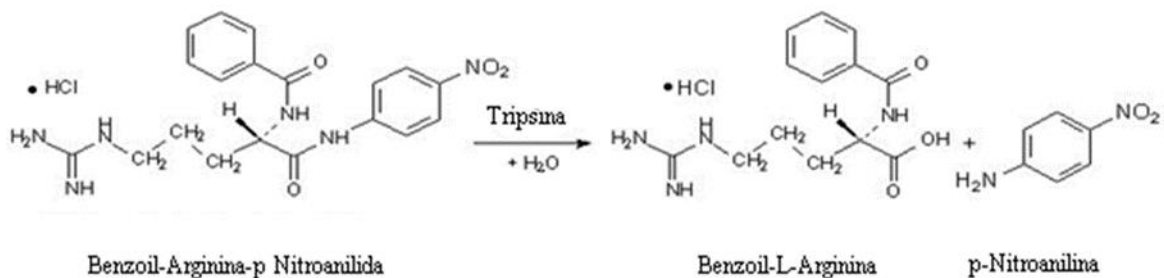


Figura 9. Hidrólisis de BAPNA por acción de la tripsina.

Soluciones

Solución de trabajo. Buffer Tris (0.05M, pH 8.2 contiene 0.02M CaCl₂). Se disolvieron 6.05 g Tris (Hidroximetil aminometano, Sigma-Aldrich) y 2.94 g de CaCl₂ • 2H₂O en 900 mL de agua. Se ajustó el pH a 8.2 y el volumen se lleva a 1 litro con agua.

Solución de BAPNA (Sustrato). Cuatro miligramos de benzoil-D L-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) hidrociorado (Sigma-Aldrich) fueron disueltos en 150 µL de

dimetilsulfóxido y diluidos en 10 mL de buffer Tris previamente calentado a 37°C. La solución se prepara diariamente.

Solución de tripsina. En 200 mL de 0.001 M HCl se disolvieron 4 mg de tripsina de páncreas de bovino (tratada TPCK, libre de sal, polvo liofilizado, $\geq 10,000$ BAEE unidades/mg proteína, Sigma-Aldrich) pesada con precisión. Esta solución se mantuvo en refrigeración por 2 semanas sin una pérdida apreciable de actividad.

Extracción

Se realizaron al menos tres extracciones independientes de cada muestra para ser analizadas. Se tomaron 500 mg de muestra adicionando 25 mL de NaOH 0.01 N a un pH final entre 9.4-9.8 y se incubaron a 200 rpm, 29 °C durante 3 horas. Se tomó y se centrifugó una alícuota de ese volumen a 8500 rpm durante 15 min y se trabajó con la fracción soluble (sobrenadante).

Procedimiento

Se utilizaron placas de 96 pozos con fondo plano y estériles (Corning, USA) en las cuales se colocaron diferentes alícuotas de la dilución idónea de cada muestra (100, 80, 60, 40, 20 y 10 μ L) completando el volumen a 100 μ L con buffer Tris. Después se agregaron 50 μ L de la solución de tripsina bovina y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 50 μ L de la solución de sustrato (BAPNA) en cada pozo y se incubaron a 37 °C durante 15 min. En cada placa se utilizó un blanco de reacción el cual consistió en 50 μ L de buffer Tris-HCl, 50 μ L de ácido acético al 30%, 50 μ L de la solución de tripsina y 50 μ L de BAPNA. Además también se utilizó un estándar de reacción que contenía 100 μ L de buffer Tris-HCl, 50 μ L de la solución de tripsina y 50 μ L de BAPNA, esto para saber cuál era la actividad de la tripsina sin inhibición. Tanto el blanco de reacción como el estándar fueron incubados en las condiciones antes descritas. Se determinó la absorbancia a 410 nm de cada reacción con ayuda de un espectrofotómetro (Epoch, Biotek) para después analizar los datos.

Expresión de resultados

La coloración de la reacción es inversamente proporcional al contenido de inhibidores de la muestra. La unidad para la expresión de actividad de la tripsina es la “unidad de tripsina (UT)”, que se define arbitrariamente como el incremento de 0.01 de la absorbancia a 410 nm por 10 mL de mezcla de reacción [Kakade, 1974].

La actividad inhibitoria de tripsina es expresada en términos de unidades de inhibición de tripsina (UIT) que es definida por la cantidad en la que se inhibe la actividad proteolítica de la tripsina [Klomklao *et al.*, 2011]. El resultado final es expresado como la concentración de unidades de inhibición de tripsina en la muestra (UIT/mg de muestra).

6.5. Producción de lotes utilizando las condiciones adecuadas de tratamiento térmico

Utilizando las condiciones adecuadas de tratamiento térmico, encontradas durante esta investigación, se realizó la producción de siete lotes de concentrado de proteína de frijol. Aquellos lotes que cumplieran con los niveles adecuados de inhibidores de tripsina y además de cumplir con las especificaciones microbiológicas se juntaron para formar solo una muestra, denominada “lote final”, utilizando una mezcladora de pantalón (Blender ®) para posteriormente probar este concentrado como única fuente de proteína en dietas suministradas a animales de laboratorio.

6.6. Análisis microbiológico

Para evaluar la calidad microbiológica del concentrado de proteína, primero se realizaron diluciones seriadas de una muestra representativa del producto, tomadas en condiciones asépticas, conforme lo establecido a la NOM-110-SSA1-1994. Dichas diluciones fueron utilizadas para efectuar las determinaciones mostradas en la Tabla 3, se utilizó la metodología indicada en la normatividad

vigente. Las determinaciones se realizaron por triplicado. En cada determinación se utilizó una caja con medio de cultivo y diluyente sin inóculo como testigo de esterilidad.

Tabla 3. Métodos utilizados para evaluar la calidad microbiológica.

Parámetro	Método de prueba utilizado
Bacterias aerobias	NOM- 092- SSA- 1994
Coliformes totales	NOM-113-SSA-1994
Hongos y levaduras	NOM-111-SSA-1994

Cuantificación de bacterias aerobias

Para la cuantificación de bacterias aerobias, se utilizó la técnica de cuenta en placa descrita en la NOM-092-SSA-1994. Se inoculó 1 mL de cada dilución sobre placas estériles a las que se les adicionaron de 15 a 20 mL de Agar Triptona Extracto de Levadura fundido y enfriado a 45°C, posteriormente se homogeneizaron con movimientos rotatorios e incubaron a 37 °C. La cuenta de microorganismos fue realizada a las 24 y 48 horas para reportarlos de acuerdo a la norma.

Cuantificación de coliformes totales

Para la cuantificación de coliformes totales, se utilizó la técnica de cuenta en placa descrita en la NOM-113-SSA-1994. Se inoculó 1 mL de cada dilución sobre placas estériles a las que se les adicionaron de 15 a 20 mL de Agar Bilis Rojo Violeta fundido y enfriado a 45°C, posteriormente se homogeneizaron con movimientos rotatorios e incubaron a 37 °C. La cuenta de coliformes totales se efectuó a las 24 horas y se reportó según la norma.

Cuantificación de mohos y levaduras

Para la cuantificación de mohos y levaduras, se utilizó la técnica descrita en la NOM-111-SSA-1994. Se inoculó 1 mL de cada dilución sobre placas estériles a las que se les adicionaron de 15 a 20 mL de Agar Papa Dextrosa fundido y enfriado a

45°C, posteriormente se homogeneizaron con movimientos rotatorios e incubaron a 25 ± 1 °C durante el tiempo descrito en la norma para efectuar el conteo de dichas colonias.

6.7. Análisis Químico Proximal (AQP)

Las determinaciones de Análisis Químico Proximal: humedad, proteína cruda, extracto etéreo, cenizas, fibra cruda y extracto libre de nitrógeno; fueron realizadas por el Departamento de Alimentos y Biotecnología, UNAM mediante el Método AOAC Químico Proximal (2005).

6.8. Análisis de almidón total

La determinación de almidón total fue realizada en el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CeProBi) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), Departamento de Desarrollo Tecnológico, mediante el método AACC 76-13.

7. Resultados y discusión

7.1. Análisis de Materia prima

Análisis Químico Proximal

En la Tabla 4 se muestran los resultados del Análisis Químico Proximal de la materia prima: frijol negro variedad “Bola”. El contenido de humedad del frijol analizado se encuentra dentro del intervalo, establecido en la NMX-FF-038-SCFI-2013, el cual es de 8.5-13% de humedad. Hernández-Melgar y Martínez-Hernández en 2016 reportaron diferentes valores de humedad en distintas variedades de frijol negro (Cuarentin 8.24%, El Porvenir 9.75% y Tamazulapa 11.19%), los cuales son muy similares a la muestra analizada en este trabajo. Por otro lado, en el trabajo de Campos-Vega *et al.* (2009) se realizó la comparación de humedad en cuatro variedades comunes de frijol: negro 8025, bayo Madero, pinto Durango, Azufrado Higuera obteniendo humedades de 8.0, 11.0, 10.1 y 7.1%. Como se ha explicado para otras leguminosas (Chaparro-Acuña, 2009), las diferencias en el porcentaje de humedad podrían deberse a las condiciones ambientales de la cosecha y del almacenamiento de la semilla.

Tabla 4. Composición química de frijol negro variedad “Bola”.

Parámetro	Frijol negro Bola
Humedad (g/100 g)	8.71
Cenizas (g/100 g)	3.84
Grasas (g/100 g) (Extracto etéreo)	1.54
Proteínas (g/100g) (Factor 6.25)	21.42
Fibra dietética total (g/100g)	18.54
Carbohidratos (g/100g) (Por diferencia)	45.95

^a Valores: promedio de tres repeticiones con coeficiente de variación menor al 5.0%

En *Phaseolus vulgaris* se han reportado contenidos de proteína de 16 - 33% [Meiners *et al.*, 1976] dependiendo de la variedad, el frijol usado como materia prima está dentro de este intervalo (21.42%). La variación en el porcentaje de proteína depende de los genes que controlan la síntesis y acumulación de una

fracción específica de proteína y de genes que controlan otros factores como el suministro de nutrimentos, vigor de la planta, maduración, tamaño y rendimiento de la semilla, y la acumulación y síntesis de almidón en la semilla [Osborn y Brown, 1988]. Así como otros factores como la composición del suelo donde fueron sembradas, la variedad, el clima, la época de la cosecha y la localización geográfica [Chaparro-Acuña, 2009; Camacho *et. al*, 2010].

Los lípidos son la fracción menos abundante de los macronutrientes presentes en el frijol negro variedad “Bola” (1.54%). Este resultado es comparable con lo reportado por Ulloa *et al.* [2011] donde se indica que el contenido de lípidos en frijol varía entre 1.5% y 6.2%. Lo anterior implica un beneficio durante el proceso de producción de concentrados de proteína, donde se requiere de materia prima con bajos niveles de lípidos para evitar la saponificación de las grasas, debido a que generalmente se presentan condiciones de alcalinidad en estos procesos [Badui-Dergal,2012]. Por ejemplo, la soya es la leguminosa más utilizada para la elaboración de concentrados y aislados de proteína vegetal, pero su contenido de lípidos es mayor a 18%, por lo que es necesario llevar a cabo un pretratamiento del grano y desengrasarlo para obtener harinas con un contenido de grasa de alrededor del 1% [Olvera-Novoa y Olivera-Castillo, 2000]. La materia prima utilizada en este trabajo presenta niveles bajos de lípidos, por lo tanto, no fue necesario desengrasarla para llevar a cabo el proceso de producción del concentrado.

El contenido de cenizas en el frijol negro variedad “Bola” es de 3.84% el cual es relativamente bajo en comparación con los resultados de otros análisis de frijol negro donde reportaron una concentración de cenizas de 3.6% hasta un 7.49% [Vargas *et al.*, 2004a; Grajes-García, 2012; Melgar y Martínez-Hernández, 2016]. Como se puede apreciar, el intervalo de valores para este parámetro es muy grande, ya que depende principalmente de la composición química del suelo donde se cultivó, la fertilización aportada y la variedad del grano [Chaparro-Acuña, 2009].

Los carbohidratos constituyen la fracción principal en los granos de las leguminosas, los más importantes son el almidón, la fibra dietaria y en pequeñas cantidades los oligosacáridos [Bravo *et al.*, 1998]. El almidón es el principal polisacárido de almacenamiento de energía en el grano del frijol, según su biodisponibilidad el almidón se puede clasificar en almidón digestible y almidón resistente. El almidón digestible es aquel que se digiere rápidamente en el intestino delgado porque son susceptibles de ataque enzimático [Miranda-Villa *et al.*, 2012]. El almidón resistente se define como la suma de almidón y productos de degradación/modificación del almidón que no son absorbidos en el intestino delgado en individuos sanos [Asp y Bjorck, 1992; Ciacco *et al.*, 2001; Haenen, *et al.*, 2013], debido a lo anterior en algunas determinaciones (como en este estudio) el almidón resistente se toma en cuenta como parte de la fibra dietética. El frijol negro variedad “Bola” presentó un elevado contenido de fibra dietética (18.54%) en comparación con lo reportado por Lorán-Juárez en el 2013 (2.10% en frijol negro), Hernández-Melgar y Martínez-Hernández en el 2016 (3.99 % en frijol negro) y Kutos y colaboradores en 2003 (2.33% en frijol pinto). Aunque también existen reportes de concentraciones más elevadas de fibra dietética en frijol negro (31.24% [Silva-Cristobal *et al.*, 2010] y 37.6% [Campos-Vega *et al.*, 2009]. Las diferencias en la composición pueden ser debidas a las diferentes variedades, condiciones ambientales y características del suelo [Campos-Vega *et al.*, 2009].

Como el resultado mostrado para la fracción de carbohidratos en este trabajo se determinó por diferencia y es únicamente una aproximación al contenido de almidón en la muestra, podríamos estar sobreestimando o subestimando este valor. Desafortunadamente, durante esta investigación no se logró realizar la determinación de almidón total en la materia prima, pero cuenta con el dato de almidón total del frijol cocido negro Bola ($51.24 \pm 0.43\%$). El frijol sufrió un tratamiento de 121°C por 15 min y después un secado por calor, se ha reportado que diferentes procedimientos de calor no afectan el contenido de almidón en frijoles negros [Landa-Habana *et al.*, 2004]; se espera que lo mismo haya ocurrido con la materia prima. Se observa que el valor de almidón total es mayor en comparación de la aproximación de carbohidratos mostrado en la Tabla 4, se

reafirma la necesidad de llevar a cabo este análisis para poder interpretar estos datos. El contenido de almidón del frijol negro Bola se encuentra por debajo del intervalo de concentración de almidón reportado por Jacinto-Hernández y Campos-Escudero [1993] que oscila entre 59.3 a 64.3%. En cambio, es mayor a la concentración reportada por Landa-Habana y colaboradores [2004] de 38.16%.

Se sugiere realizar una determinación de almidón resistente de las materias primas y en el producto final para poder llevar a cabo un correcto análisis de esta fracción, debido a que el almidón resistente es asociado a diversos beneficios en la salud del consumidor, por ejemplo se ha reportado que el uso de suplementos con almidón resistente mejoran el control de la glucosa después de una comida [Lobley *et al.*, 2013]. También las propiedades fisicoquímicas de la fibra soluble (en la que se incluye el almidón resistente) pueden ejercer modificaciones importantes en el volumen, hinchamiento y viscosidad en el lumen del intestino, en el cual se alteran las vías metabólicas del colesterol hepático y el metabolismo de las lipoproteínas, resultando en la reducción del colesterol de baja densidad (LDL) [Campos-Vega *et al.*, 2009].

Determinación de Inhibidores de tripsina

La concentración de inhibidores de tripsina en el frijol negro crudo variedad "Bola" fue de 104.91 ± 7.36 UIT/mg de muestra. Este dato es inferior a los reportados para *Phaseolus vulgaris* por Antunes y Sgarbieri en 1980 en donde el contenido de IT es de 163.0 UIT/mg, y por Ortiz-Chacón y Dary-Mansilla [1999] quienes reportaron una actividad de 122.5 UIT/mg. Por otro lado, el resultado cae en el intervalo del análisis de 10 variedades de *Phaseolus vulgaris* reportado por Trugo *et al.* [1990] (71-160 UIT/mg). Todas estas determinaciones utilizan la misma técnica propuesta por Kakade *et al.* [1974].

7.2. Determinación de inhibidores de tripsina (miniaturización de la técnica)

Al realizar la miniaturización de la técnica de Kakade et al. [1974] para la determinación de la actividad de inhibidores de tripsina se logró disminuir considerablemente el tiempo de la determinación, lo cual representa una gran ventaja al permitir analizar un número mayor de muestras en menos tiempo. Además la disminución de reactivos y desechos generados en cada una de las determinaciones fue de más del 95%. El volumen final de reacción de 10 mL utilizado en la técnica original [Kakade *et al.*, 1974] se disminuyó a tan solo 200 μ L, es decir solo se utilizaron un 2% de los reactivos que en la metodología original.

Para comprobar que los resultados de la miniaturización de la metodología original fueran iguales a los resultados obtenidos anteriormente, fue necesario conocer si existía diferencia significativa con los datos obtenidos con ambas técnicas, utilizando una muestra de referencia analizada por Salinas [2014], donde se realizaron las determinaciones con otra técnica [Welhan y Domoney, 2000] similar la cual utiliza el mismo fundamento a la propuesta en este trabajo. Salinas [2014] reportó que el concentrado de proteínas obtenido y utilizado con el cual los animales del laboratorio crecieron de manera adecuada presentaba un valor de 32.77 UIT/ mg de muestra. Durante este trabajo se obtuvo un valor de 31.01 ± 1.81 UIT/ mg de muestra para la misma muestra de referencia ya con la técnica miniaturizada. Se realizó una prueba de *t*-student ($\alpha= 0.05$) con la cual se concluyó que no existía diferencia significativa entre los valores obtenidos de entre las dos técnicas utilizadas para ambas determinaciones. Con esta información se puede establecer un antecedente para poder utilizar la miniaturización de la técnica de Kakade *et al.* (1974) contribuyendo con un ahorro en reactivos y tiempo de dichas determinaciones para cuantificar la actividad del inhibidor de tripsina.

7.3. Tratamiento térmico

Como ya se mencionó en los antecedentes, y en la justificación, se contaba con un tratamiento térmico, sin embargo no se habían establecido las condiciones precisas para disminuir dicha actividad a un nivel adecuado para el crecimiento de animales de laboratorio. Se pretendía llevar a cabo una optimización del tratamiento térmico realizando un análisis factorial. En dicho análisis se iba a modificar el volumen y la concentración del producto en los recipientes utilizados durante el tratamiento térmico en la autoclave, sin embargo, el tiempo necesario para la realización de dicho experimento era mayor al que se tenía pensado, debido a la cantidad de suspensiones que se pretendía realizar. En consecuencia se ponía en riesgo la disponibilidad de algunos equipos de la planta y la realización del experimento. Por lo tanto, se optó por modificar la secuencia de algunas operaciones unitarias (Figura 8) y así llevar a cabo el tratamiento térmico dentro del reactor. Dicha modificación permitió el monitoreo de la desactivación de los inhibidores de tripsina y diseñar un experimento que cumpliera con el objetivo principal de esta tesis con la ventaja de la reducción del número de lotes experimentales necesarios, de seis a tan solo dos.

En la Figura 10 se muestran los resultados del muestreo a diferentes tiempos para la determinación de la actividad de los inhibidores de tripsina (UIT/mg de muestra) durante el tratamiento térmico (121°C) aplicado a los lotes de prueba. Como se esperaba, la actividad de los inhibidores de tripsina va disminuyendo conforme aumenta el tiempo de tratamiento térmico. Los inhibidores presentes en el frijol son competitivos y pueden unirse a los sitios activos de la tripsina del mismo modo que lo haría el sustrato de la enzima, resultando en la hidrólisis del enlace peptídico entre los aminoácidos del sitio activo del inhibidor. El inhibidor difiere de la proteína sustrato en los residuos del sitio activo, los cuales están unidos por puentes disulfuro. Después de la hidrólisis, el inhibidor mantiene la misma conformación debido a los puentes disulfuro. Esto genera un complejo estable enzima-inhibidor. Sin embargo, por su propia naturaleza proteínica, los inhibidores, pueden sufrir desnaturalización [Bilbao-Reboredo *et al.*, 2000]

perdiendo los enlaces disulfuro que mantienen su conformación y por consiguiente su actividad.

A pesar de la exposición al tratamiento térmico, persistió una actividad residual de los inhibidores de tripsina, lo cual concuerda con estudios de diferentes leguminosas en donde se menciona que durante algún tratamiento térmico, principalmente la cocción, se puede reducir significativamente la actividad inhibitoria, pero no se logra eliminarla por completo. Dicha actividad residual se pudo deber a la presencia de factores termoestables. [Gómez, 1990; Morrison *et al.*, 2007; López-Barrera, 2011]. Los inhibidores tipo Bowman-Birk podrían haber sido uno de estos factores termoestables, estudios muestran que es un inhibidor de tripsina más termorresistente que el inhibidor de Kunitz, ambos presentes en el frijol [Norioka *et al.*, 1988; Cabrera-Orozco *et al.*, 2013]. La termorresistencia del inhibidor de Bowman-Birk se debe a la configuración de su sitio activo, el cual está estabilizado por la presencia de siete puentes disulfuro que estabilizan su estructura incluso en presencia de temperaturas altas, mientras que el inhibidor de Kunitz solo posee dos, por lo cual son más sensibles a estas condiciones [Mansilla, 2011].

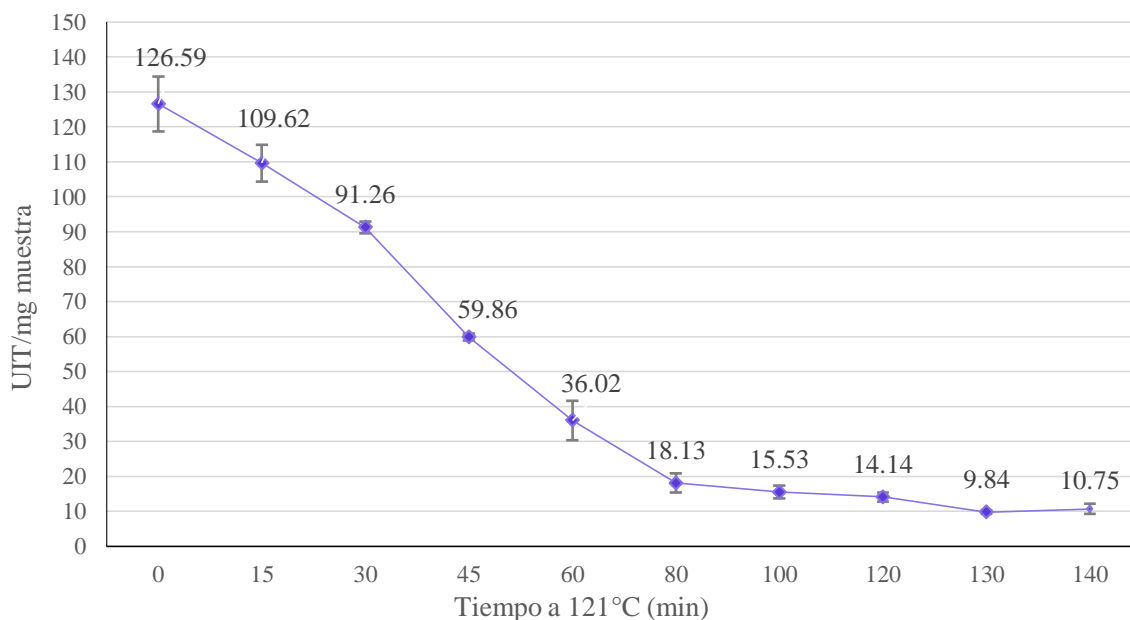


Figura 10. Monitoreo del tratamiento térmico durante la producción del concentrado de proteína de frijol negro.

Al hacer una comparación entre la actividad de los inhibidores de tripsina de la materia prima (104.91 ± 7.36 UIT/mg) y del concentrado de proteína en el min 0 de tratamiento térmico (126.59 ± 7.84 UIT/mg) se observa una mayor actividad en la segunda muestra, esto es consecuencia del proceso de extracción y precipitación de proteínas, el cual aumenta aproximadamente tres veces la cantidad de proteína por gramo de muestra. Debido a que los inhibidores de tripsina son de naturaleza proteínica también aumentó su concentración. Una consecuencia observada debido a este aumento en la concentración de los inhibidores de tripsina fue el incremento en la energía necesaria para poder disminuir la actividad inhibitoria, mientras que Bilbao-Reboredo y colaboradores [2000] reportaron una desactivación total de la actividad inhibitoria de tripsina en *Phaseolus vulgaris*, mediante un tratamiento térmico ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 40 min, el cual es menor el tiempo de exposición al ocupado en este trabajo para poder lograr una reducción de la actividad del 80 %.

Se realizó un análisis de varianza ($p < 0.05$) [Anexo I], haciendo la comparación de medias entre tratamiento, por el método de Tukey. Los resultados muestran que a partir del minuto 80 no hubo diferencia significativa entre los valores de UIT/mg de muestra para los tiempos de tratamiento, a excepción de la diferencia entre los tiempos 80 y 130 donde sí se encontró diferencia significativa. Sin embargo se descartó este último (130 min) debido a que llevar a cabo un tratamiento térmico tan largo implicaría un gasto energético y económico excesivos, porque a partir del minuto 80 se logró disminuir la actividad de los inhibidores de tripsina a un nivel adecuado para el crecimiento de animales de laboratorio, es decir menor a la muestra de referencia (31.01 UIT/mg de muestra). En conclusión, las condiciones de tratamiento térmico elegidas para este proceso fueron 80 min para la producción de los lotes subsecuentes en el reactor Baldor de 100L.

En comparación con el proceso que se ocupó anteriormente [Salinas, 2014] se pudo realizar el tratamiento térmico dentro del reactor donde se precipitaron las proteínas, lo cual implicó una reducción considerable en el tiempo del proceso en general. Dentro de la autoclave las muestras se encontraban estáticas lo que se

traducía en una transferencia de calor más lenta, mientras que en el reactor se realizó bajo condiciones de agitación (aprox. 60 rpm) durante el tratamiento térmico, lo cual mejoró la transferencia de calor en toda la muestra. Otro factor que posiblemente haya tenido efecto en la disminución del tiempo, pero en menor medida, fue la concentración de sólidos, durante este trabajo el tratamiento térmico se utilizó a una concentración de sólidos de aproximadamente 5% (dentro del reactor) mientras que para realizar el tratamiento dentro de la autoclave se utilizaban concentraciones mayores a 9%, a mayor concentración de sólidos la eficiencia en la conducción dentro de la solución disminuye.

Durante el monitoreo del tratamiento térmico también se pudo observar la presencia de compuestos polifenólicos, los cuales son los compuestos responsables de impartir la coloración al frijol [Salinas, 2014]. Los principales compuestos polifenólicos son flavonoides como antocianinas y taninos condensados (proantocianidinas) [Guevara-González y Torres-Pacheco, 2006]. Debido a la estructura química, los cuales presentan diversos grupos hidroxifenólicos y a su capacidad de quelación de metales se les considera como agentes antioxidantes [Quiñones, 2010]. Sin embargo, se ha reportado que estos compuestos son inestables en tiempos prolongados a altas temperaturas [Martínez-Preciado, *et al.* 2003] y probablemente después del tratamiento térmico al cual se someten en este proceso, la capacidad antioxidante de los compuestos polifenólicos esté en niveles muy bajos y se tendría que realizar la determinación para conocer el porcentaje exacto de disminución de la capacidad antioxidante con respecto al frijol crudo. En la Figura 11 se aprecian dos muestras de los tiempo 0 min (a) y 80 min (b) de tratamiento térmico, la coloración rosa de la muestra a 0 min de tratamiento térmico se puede deber a la previa acidificación de la muestra (pH=4) durante la precipitación de las proteínas, a estas condiciones se encuentra presente el catión flavilio, una antocianina de color rojo intenso [Garzón, 2008]. El cambio de coloración del concentrado podría indicar este compuesto sufrió una modificación durante el tratamiento térmico aplicado.

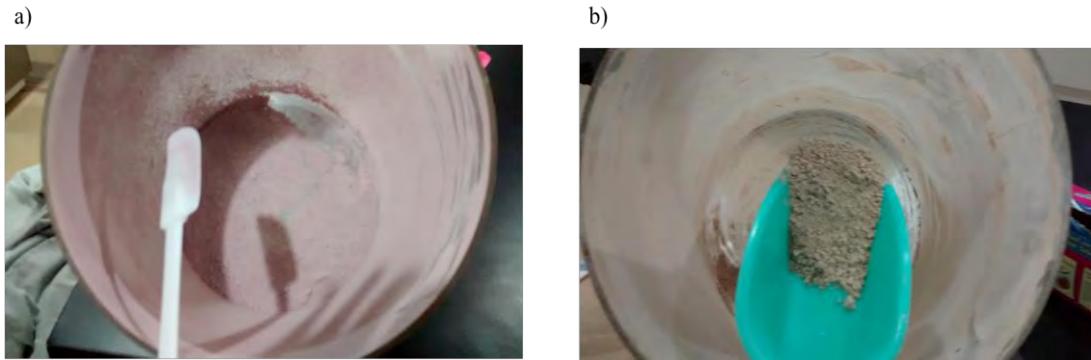


Figura 11. Diferencias en la coloración de las muestras: (a) 0min y (b) 80 min de tratamiento térmico.

7.4. Producción de lotes utilizando las condiciones adecuadas de tratamiento térmico

Con los resultados anteriores se fijó el tiempo de 80 min para el tratamiento térmico aplicado para la producción del concentrado de proteínas. Ya con este parámetro establecido se obtuvieron 6.5 kg de concentrado de proteína de frijol, que cumplieron con tener un valor para la actividad de los inhibidores de tripsina menor a 31.01 UIT/mg de muestra [muestra de referencia. Salinas, 2014].

Modificaciones del proceso

Al realizar la modificación de la secuencia de algunas operaciones unitarias, se logró mejorar la continuidad del proceso y consecuentemente disminuir el tiempo del tratamiento térmico, lo cual podría implicar un menor costo en la manufactura del producto.

Tabla 5. Comparación entre procesos para la obtención del concentrado de proteínas de frijol negro.

	Proceso original (Salinas, 2014)	Actual estudio
Variedad de frijol negro	INIFAP 8025	Bola
Cantidad inicial de materia prima (g) (Frijol molido)	12 000	10 000
Concentrado de proteína obtenido (g)	1 824 ± 44	953 ± 32
Rendimiento neto en masa (%)	15.20 ± 0.37	9.53 ± 0.32
Rendimiento obtención de proteínas (%)	58.38 ± 1.4	28.15 ± 0.94
Tiempo total de proceso (h)	19	15

Durante las extracciones por solubilidad de las proteínas al utilizar 12 kg de frijol molido se superaba la capacidad del reactor (120 L), por lo tanto fue necesario disminuir la cantidad de materia prima utilizada inicialmente a 10 kg y no se esperaba que el rendimiento del proceso disminuyera. Sin embargo se observa que el rendimiento neto en masa y el rendimiento de obtención de proteínas disminuyeron drásticamente en comparación con el proceso original. Las modificaciones realizadas al proceso fue la secuencia de las operaciones unitarias y la materia prima, como la primera no debería de afectar en gran medida el rendimiento se dedujo que la diferencia en la composición de la materia prima fue la responsable de esta disminución en el rendimiento. Como se observa en la Figura 12, a pesar de que el frijol Bola tiene una concentración mayor de proteínas el rendimiento fue menor, por lo tanto se supuso que la concentración de proteínas no es el único factor determinante en el rendimiento del proceso. La diferencia más notoria entre las materias primas es el contenido de fibra, el frijol Bola presenta cinco veces más fibra que el INIFAP 8025, debido a que se utiliza el método de solubilización para la extracción de proteínas, la fibra soluble podría haber competido durante esta etapa con las proteínas, se profundizará en este tema y en la comparación de materias primas más adelante.

Análisis Químico Proximal (AQP)

Los resultados del análisis químico proximal y almidón total del lote final se encuentran en las Tablas 6 y 7, respectivamente. Donde también se presentan de la materia prima.

Tabla 6. Análisis Químico Proximal del lote final de concentrado de proteína de frijol negro Bola

Parámetro	Frijol negro Bola	Concentrado de proteína
Humedad (g/100 g)	8.71	2.77
Cenizas (g/100 g)	3.84	4.59
Grasas (g/100 g) (Extracto etéreo)	1.54	2.43
Proteínas (g/100g) (Factor 6.25)	21.42	63.27
Fibra dietética total (g/100g)	18.54	23.74

^aValores: promedio de tres repeticiones con coeficiente de variación menor al 5.0%

Tabla 7. Almidón resistente del lote final de concentrado de proteína de frijol negro Bola

Parámetro	Frijol negro Bola	Concentrado de proteína
Almidón resistente (g/100 g)	51.24 ± 0.43	11.01 ± 0.27

^aValores en base seca

La humedad en el producto es una característica crucial, pues a humedad baja (<10%) se evita la proliferación de microorganismos y junto con las medidas adecuadas de almacenamiento con respecto a la humedad relativa y temperatura se lograría prolongar considerablemente la vida de anaquel del producto. Respecto a las cenizas y a la grasa se observa un aumento en la concentración, debido a la disminución de la humedad de la muestra y por consiguiente un aumento en la concentración de los demás componentes de producto. Respecto a las cenizas, algunos compuestos añadidos durante el proceso como cloruro de sodio, hidróxido de sodio y ácido fosfórico pudieron haber contribuido al aumento de estos micronutrientes.

El almidón representa la mayor parte de los carbohidratos presentes en el frijol (22 a 45%) [Campos-Vega *et al.*, 2009], sin embargo la solubilidad del almidón en agua a temperatura ambiente es limitada, se ha reportado que la solubilidad del almidón del frijol Zaragoza (*P. lunatus L.*) es de 8.3 % a 90°C [Miranda-Villa *et al.*, 2013]. Por lo tanto, se esperaba la mayor parte de los carbohidratos se desecharan junto con los subproductos sólidos. Debido a lo anterior y a que en el frijol se encuentra una pequeña cantidad de oligosacáridos [Silva-Cristobal *et al.*, 2010] que pueden ser solubles en agua, el concentrado presenta un bajo contenido de carbohidratos.

Se esperaba que sucediera lo mismo con la fibra dietética, porque únicamente una fracción de este componente es soluble en agua. Campos-Vega y colaboradores [2009] reportaron que el frijol variedad negro que 4.2 % de la fibra dietética era soluble, mientras que en otra investigación [Silva-Cristobal *et al.*, 2010] el contenido de fibra dietética soluble es de 18%. Sin embargo este componente es el segundo en proporción del concentrado de proteína de frijol. Tomando en cuenta la elevada concentración de fibra y el bajo rendimiento en la obtención de proteínas, a pesar de que se observa que en el concentrado de proteína hay tres veces la concentración de este componente que en el frijol, se propuso que la proporción de estos dos componentes es determinante para el rendimiento del proceso.

Se hizo una comparación de la composición química entre la materia prima del trabajo de Salinas (2014) y el presente trabajo (Figura 12), suponiendo que la diferencia entre materias primas fue la principal causa del bajo rendimiento de obtención de proteínas. La principal diferencia entre las dos variedades es el porcentaje de fibra, el frijol variedad "Bola" contiene cinco veces más fibra que la variedad INIFAP 8025. Lo anterior es considerable porque se ha utilizado un método de extracción de proteínas basado en la solubilización de las mismas, por lo tanto la fracción soluble de fibra dietética de la materia prima, que se compone principalmente de pectinas, pudiera competir durante dicho proceso porque las pectinas son solubles en agua y soluciones salinas diluidas [García-Palma, 2009],

ambos solventes fueron utilizados en el proceso de extracción de proteínas. Sin embargo no se puede concluir que se ha extraído fibra en lugar de proteínas porque el bajo rendimiento neto en masa del proceso indica que, aunque se esté recuperando una gran cantidad de la fibra soluble en el frijol, existe una fracción de proteínas considerable que no se ha logrado solubilizar.

Una explicación a esta situación podría ser que el frijol negro variedad "Bola" presentaba un defecto conocido como endurecimiento. El grano endurecido es aquel frijol cuyo tiempo de cocción se ha incrementado significativamente, por efecto del envejecimiento o del almacenamiento del grano bajo condiciones de humedad relativa alta o la combinación de ésta y temperaturas elevadas [NMX-FF-038-SCFI-2002]. El mecanismo de endurecimiento de los granos de *P. vulgaris* no está bien elucidado pues existe poca investigación al respecto, pero la hipótesis para explicar dicho mecanismo apoya la existencia de un mecanismo múltiple y complejo que abarca diversas estructuras y compuestos del grano, tales como matriz proteica, los gránulos de almidón y la laminilla media de las células de los cotiledones [Mujica *et al.*, 2015]. Además con base en los resultados de otra investigación [de León *et al.*, 1990] se infiere que en el frijol pueden ocurrir dos tipos de endurecimiento: uno a nivel de la cáscara y otro a nivel del cotiledón.

El almacenamiento a temperatura y humedad relativa elevadas incrementa la actividad de proteasas endógenas y consecuentemente la hidrólisis de la proteína del frijol [Segura-Campos, *et al.* 2014]. Bajo estas condiciones la mayor parte de la proteína se vuelve insoluble en agua de acuerdo con los autores [Mujica *et al.*, 2015]. Lo que podría explicar la baja solubilidad de las proteínas durante la extracción. Además la hidrólisis de las proteínas también causa un incremento en las interacciones con compuestos fenólicos, como taninos de alto peso molecular, los cuales son 1.64 veces más grandes en granos endurecidos [Segura-Campos, *et al.* 2014]. En los alimentos existe una compleja interacción de los compuestos fenólicos con los demás componentes, principalmente con el complejo grupo de polisacáridos que forman la fibra dietética que puede actuar atrapando compuestos fenólicos o bien formando interacciones químicas entre ellos [Quirós-

Sauceda, *et al.* 2011]. Además los compuestos fenólicos son moléculas anfipáticas, pues poseen anillos aromáticos y grupos hidroxilo lo cual les da la capacidad de enlazar a las proteínas en la superficie de la pared celular. Por lo tanto, se cree que los efectos del endurecimiento y el elevado contenido de fibra, disminuyeron la solubilidad de las proteínas del frijol, utilizado y como consecuencia disminuyeron el rendimiento durante el proceso de producción del concentrado de proteínas. Se sugiere que en futuros trabajos se realicen análisis de tiempos de cocción a la materia prima utilizada, además de evitar que ésta presente un elevado contenido de fibra dietética porque estos dos parámetros son determinantes en el rendimiento de obtención de proteínas. *Inhibidores de tripsina*

La actividad inhibitoria del lote final fue de 20.87 ± 1.82 UIT/mg, menor a la muestra de referencia [Salinas, 2014], por lo tanto podemos asegurar que el producto es adecuado para el crecimiento de animales de laboratorio. Sin embargo, la actividad de los inhibidores de tripsina es mayor en comparación con aislados de proteína de soya comerciales reportados por Kakade *et al.* (1974) donde se reportó actividades de 8.5 y 19.8 UIT/mg de muestra. Sin embargo, debido a la falta de normatividad que regule el contenido de inhibidores de tripsina en concentrados de proteína vegetal, no se puede tener una idea clara del nivel máximo permisible de actividad inhibitoria de tripsina en el concentrado de proteína de frijol, pero con el tratamiento diseñado en este estudio se asegura que los valores de UIT/mg de muestra son apropiados para la alimentación y el desarrollo de animales de laboratorio.

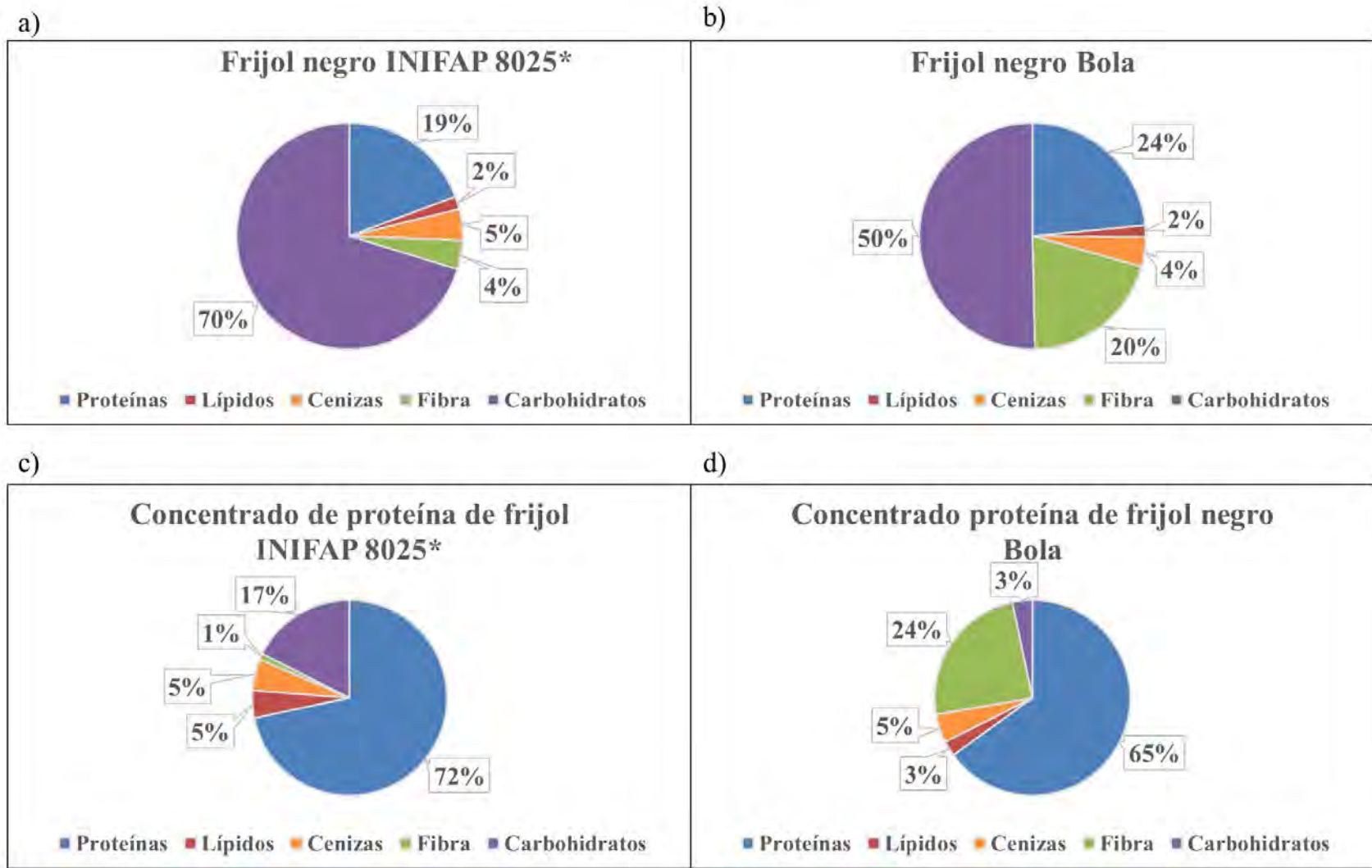


Figura 12. Comparación de la composición en base seca de materias primas (INIFAP 8025 y Bola) y sus concentrados de proteína. *Salinas, 2014.

7.5. Análisis microbiológico

Los resultados del análisis microbiológico del frijol negro Bola y de su concentrado de proteína se encuentran en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados del análisis microbiológico.

Parámetro	Frijol negro Bola	Concentrado proteínico
Mesófilos aerobios	500 000 UFC/g	62 000 UFC/g
Coliformes totales	< 100** UFC/g	< 100** UFC/g
Hongos y levaduras	< 10* UFC/g	< 10* UFC/g
*Valor estimado (NOM-111-SSA1-1994)		
**Valor estimado (NOM-113-SSA1-1994)		

Se puede observar que la carga microbiana de la materia prima se logró disminuir, debido al tratamiento térmico al que fue sometido. Se esperaba que la cuenta de mesófilos aerobios del concentrado fuera menor, debido a que el producto fue sometido a condiciones térmicas. Sin embargo durante el proceso de producción, después del tratamiento térmico no se lograron mantener las condiciones de esterilidad por falta de infraestructura dentro de la planta piloto. Además, un inconveniente debido a las modificaciones del proceso era necesario suspender los sólidos recuperados, después del tratamiento térmico, para llevar a cabo el secado. Al llevar a cabo la suspensión de los sólidos se formaba una plasta de concentrado que era imposible de suspender utilizando una propela, por lo tanto era necesario disolverlos manualmente, lo que probablemente aumentó la carga microbiológica. Es posible disminuir la cuenta de mesófilos del producto si se toman medidas de higiene más estrictas o se utiliza infraestructura adecuada. Por otro lado, es importante destacar que, a pesar de la elevada cuenta de mesófilos, la cuenta de coliformes y hongos está por debajo de los límites de detección de la prueba, lo que indica que no existió contaminación de estos microorganismos después del tratamiento térmico.

Tabla 9. Resultados del concentrado de proteína con los límites permitidos en diversos productos.

Producto	Mesófilos aerobios (UFC/g)	Coliformes totales (UFC/g)	Hongos (UFC/g)
Concentrado de proteína de frijol (este trabajo)	62 000	<100	<10
Harina de trigo*	50 000	NA	300
Harina de maíz*	100 000	100	1000
Harina de maíz nixtamalizada*	50 000	100	1000
Pasteles panqués y pays)*	10 000	20	ND
Galletas*	3 000	<10	ND
Pan dulce*	5 000	20	ND
NA: No aplica; ND: No disponible ; NOM-247-SSA1-2008;			

No existe normatividad que regule la carga microbiana en concentrados de proteína vegetal y solamente podemos comparar los resultados obtenidos con una materia prima similar. Como se ha utilizado el concentrado de proteína para la fabricación de panques y galletas horneadas de maíz y frijol, se comparará con la materia prima principal de estos productos harina de trigo, harina de maíz y harina de maíz nixtamalizada (Tabla 9). Al hacer la comparación se observa que la cuenta de mesófilos aerobios de nuestro producto es elevado en comparación con la harina de trigo y la harina de maíz nixtamalizado, pero está por debajo de la cuenta en harina de maíz. Aunque el concentrado de proteína de frijol presenta baja humedad (<10%) y eso evitaría un proliferación de microorganismos y no afectar la vida de anaquel del producto. El concentrado de proteína de frijol es una materia prima con buen potencial en el uso de los productos mostrados en la Tabla 9, por lo tanto mantener baja la carga microbiana de este producto contribuirá a su posterior aceptación en el mercado.

8. Conclusiones

- La modificación al proceso resultó ser eficaz para poder obtener un concentrado de proteínas de frijol con una actividad antitripsina <30.1 UIT/mg, adecuada para el crecimiento de animales de laboratorio
- Las condiciones adecuadas de tratamiento térmico fueron 80 min a 121°C .
- El lote final tuvo un valor de la actividad del inhibidor de tripsina de 20.87 ± 1.82 UIT/mg de muestra.
- El cambio de la materia prima (Frijol negro variedad "Bola") utilizada en este trabajo disminuyó el rendimiento del proceso en aproximadamente 40%.
- El endurecimiento del frijol y un elevado contenido de fibra afectan en el rendimiento de extracción de las proteínas por solubilidad diferencial, debido a los cambios estructurales que ocurren en el frijol. Para mejorar el rendimiento la selección de materia prima es de gran importancia.
- La miniaturización de la técnica de Kakade *et al.* [1974] para la determinación de la actividad inhibitoria de tripsina mejoró considerablemente el tiempo del análisis y la cantidad de reactivos utilizados y de desechos producidos.

9. Perspectiva

El mejoramiento al proceso realizado en este trabajo permitirá continuar con las investigaciones sobre los beneficios nutricionales del frijol, así como el efecto de su consumo en relación con afecciones crónicas, como lo es la diabetes, mediante la experimentación con animales de laboratorio. La información generada en las siguientes investigaciones será sustento para revalorizar a este producto tan importante en la dieta del mexicano, el frijol.

Además, los resultados obtenidos durante este proyecto son un antecedente para implementar una metodología para la selección de materia prima, lo cual mejoraría el rendimiento final del concentrado de proteína y por consiguiente poder disminuir el costo de producción, así se lograría un avance en el desarrollo del producto y un acercamiento a su posible comercialización. La introducción al mercado de este producto implicaría un beneficio para la población al proporcionar un producto con grandes beneficios nutricionales; además permitiría elevar la demanda de frijol generando beneficios a lo largo de toda la cadena de valor.

10. Bibliografía

1. AACC International. Approved Methods of Analysis, 11th Ed. Method 76-13.01 Total Starch Assay Procedure (Megazyme Amyloglucosidase/alpha-Amylase Method). AACC International, St. Paul, MN, U.S.A. <http://dx.doi.org/10.1094/AACCIntMethod-76-12.01>
2. AACC International. Approved Methods of Analysis, 11th Ed. Method 32-49.01 Total Starch Assay Procedure (Megazyme Amyloglucosidase/alpha-Amylase Method). AACC International, St. Paul, MN, U.S.A. <http://dx.doi.org/10.1094/AACCIntMethod-76-12.01>
3. Alizadeh, H., Leung, D. W. M. y Edwards, Y. (2012) Changes in trypsin inhibitory activity of developing seed parts and pod of red kidney bean. *Agronomy New Zealand* 42(2012), 171-180.
4. Antunes, P. L. y Sgarbieri, V. C. (1980) Effect of heat treatment on the toxicity and nutritive value of dry beans (*Phaseolus vulgaris* var. Rosinha G2) proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1980 (28), 935-938.
5. Aparicio-Fernández X. y Espinosa L. G. (2015) *El consumo de leguminosas y sus efectos sobre la salud*. Recuperado de: http://congresos.cio.mx/memorias_congreso_mujer/archivos/extensos/sesion4/S4-DIV03.pdf
6. Asp N. & Bjorck I., (1992). Resistant starch, *Trends Food Science Technology* (3), 4-13.
7. Badui-Dergal, S. (2012) Soya. En Badui-Dergal, S. *Química de alimentos* (641-657). México. Pearson Educación de México.
8. Basso Los, F. G., Ferreira Zielinski, A. A., Wojeicchowski, Nogueira, A. y mottin Demiate, I. (2018) Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): whole seeds with complex chemical composition. *Current Opinion in Food Science*, 19, 63-71.
9. Bilbao, T., Hampe, S., Addae, R., Puerta, F. y Ledesma, L. (2000) Ocurrencia de tóxicos naturales en frijol colorado (*Phaseolus vulgaris*) y arveja (*Pisum sativum*). Efecto del tiempo de almacenamiento y los tratamientos caseros. *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 53(1), 901-912.
10. Bilbao-Reboredo, T., Hampe-Amador, S., Smith R. A., Puerta-García, F. y Ledesma-Rivero, L. (2000) Ocurrencia de Tóxicos naturales en frijol colorado (*Phaseolus vulgaris*) y arveja (*Pisum sativum*). Efecto del tiempo de almacenamiento y los tratamientos caseros. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 53(1), 901-912.
11. Bravo, L., Siddhuraju, P., & Saura-Calixto, F. (1998) Effect of various processing methods on the in vitro starch digestibility and resistant starch content on Indian pulses. *Food Chemistry*, (46), 4664-4674.

12. Bravo, L., Siddhuraju, P., & Saura-Calixto, F. (1999) Composition of underexploited Indian pulses. Comparison with common legumes. *Food Chemistry*, 64. 185–192.
13. Cabrera-Orozco, A., Jiménez-Martínez C. y Dávila-Ortiz, G. (2013) Soybean: Non-Nutritional Factors and Their Biological Functionality, Soybean - Bio-Active Compounds, Prof. Hany El-Shemy (Ed.), *InTech 10*, 389-410. Recuperado el 10 de octubre 2016 de:
 - a. www.intechopen.com/books/soybean-bio-active-compounds/soybean-non-nutritional-factors-and-their-biological-functionality
14. Camacho, M. K., Peinado, L. I., López, J. A., Valdez, A., Salinas, R. A., Moreno, C. G. y Medina, S. (2010). Caracterización proteómica de granos de frijol azufrado (*Phaseolus vulgaris*) cultivados en el estado de Sinaloa. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable Ra Ximhai* 6(1), 23-36.
15. Champ, M. M. J. (2002) Non-nutrient bioactive substances of pulses. *British Journal of Nutrition* 88(3), 307-319.
16. Chaparro-Acuña, S. P. (2009) *Efecto de diferentes procesos fisicoquímicos en la reducción de factores antinutricionales de la semilla de vitabosa (Mucuna deeringiana)* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. Colombia
17. CIAT (1984) *Morfología de la planta de frijol común; guía de estudio para ser usada como complemento de la Unidad Audiotutorial sobre el mismo tema*. Cali, Colombia: CIAT.
18. Ciacco, C.F., Queiroz T.D. & Vieira, M.A., (2001). Almidón resistente. En: Fibra dietética en Iberoamérica: *Tecnología y Salud*. 129-142.
19. CODEX STAN 174-1989. Norma del Codex para productos proteínicos vegetales. Codex Alimentarius.
20. CODEX STAN 175-1989. Norma del Codex para productos proteínicos de soja. Codex Alimentarius.
21. Coultate, T. P. (1984) *Food. The chemistry of its components*. Burling House, London. The Royal Society of Chemistry, p. 231.
22. De Lange, C. F. M, Nyachoti, C. M. y Verstegen, M. W. A. (2000) The significance of antinutritional factors in feedstuffs for monogastric animals. *Feed Evaluation Principles and Practice*, 169 – 188.
23. de León, L. F., Bressani, R. y Elías L. G. (1990) Efecto de la cáscara sobre el mecanismo de endurecimiento del frijol común (*Phaseolus vulgaris*): resultados preliminares. *Agronomía mesoamericana* 1, 87-91.
24. De Luna-Jiménez, A. (2007) Composición y procesamiento de la soya para consumo humano. *Investigación y ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes* 37, 35- 44.

25. Domoney, C. y Welham, T. (1992) Trypsin inhibitors in Pisum: variation in amount and pattern of accumulation in developing seed. *Seed Science Research* 2, 147-154.
26. Dueñas, M., Sarmiento, T., Aguilera Y., Benitez V., Mollá E., Esteban R. M., Martín-Cabrejas M. A. (2016) Impact of cooking and germination on phenolic composition and dietary fibre fractions in dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and lentils (*Lens culinaris* L.). *LWT Food Science and Technology*, 66,72–78
27. Duranti, M. (2006) Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia* 77, 67-82.
28. Elizalde, A. de D., Porrilla, Y. P. y Chaparro, D. C. (2009) Factores antinutricionales de las semillas. *Facultad de ciencias Agropecuarias* 7(1), 45-54.
29. FAO (1993) *Manual de manejo poscosecha de granos a nivel rural*. [Figura] Recuperado el 4 mayo de 2016 de: <http://www.fao.org/docrep/x5027s/x5027S0S.GIF>
30. FAO (2014) *Food Outlook: Biannual report on global food markets*. FAO. Roma, Italia. Recuperado el 8 mayo de 2016 de: <http://www.fao.org/3/a-i3751e.pdf>
31. FAO (2016a) *Tendencias en la producción, consumo y comercio mundial de legumbres*. FAO. Roma, Italia. Recuperado el 4 mayo de 2016 de: <http://www.fao.org/pulses-2016/news/news-detail/es/c/381567/>
32. FAO (2016b) *Pulses contribute to food security*. Fact sheets. FAO. Rome, Italy. Recuperado el 4 de mayo de 2016 de: <http://www.fao.org/3/a-i5387e.pdf>
33. FAOSTAT (2015a) Browse Data. FAO. Rome, Italy. Recuperado el 8 de mayo de 2016 de: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>
34. Financiera Rural (2011) *Monografía del frijol*. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial Dirección Ejecutiva de Análisis Sectorial. México.
35. FIRA (2011) *Panorama Agroalimentario: Frijol, 2011/12*. Dirección de Investigaciones Evaluación Económica y Sectorial. México. Recuperado el 17 de agosto de 2016 de: <http://www.fira.gob.mx/InfEspDtoXML/abrirArchivo.jsp?abreArc=4021>
36. FIRA (2015) *Panorama Agroalimentario: Frijol, 2015*. Dirección de Investigaciones Evaluación Económica y Sectorial. México. Recuperado el 17 de agosto de 2016 de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/61950/Panorama_Agroalimentario_Frijol_2015.pdf

37. Fraile, M. E., García-Suárez, M. D., Martínez-Bernal, A. y Slomianski, R. (2007) Nutritivas y apreciables: conozca de leguminosas comestibles. Parte I. Hojas, vainas y semillas. *ContactoS* 66, 27-35.
38. García-Palma, J. I. (2009) *Evaluación del rendimiento de extracción de pectinas en aguas miles del beneficiado de café procedentes de desmucilaginado mecánico*. (Tesis de licenciatura). Universidad de El Salvador. El Salvador.
39. Garzón, G. A. (2008) Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta biológica de Colombia*, 13(3), 27-36.
40. Gálvez, A. y Salinas G. (2015) El papel del frijol en la salud nutrimental de la población mexicana. *Revista Universitaria*, 16(2). Recuperada el 17 de febrero de 2018 de: <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num2/art12/>
41. Gómez, A. (1990) *Efectos de tratamientos físicos y químicos sobre factores antinutricionales presentes en las semillas de *Canavalia ensiformis*. Digestibilidad in vivo e in vitro* (Tesis de Postgrado). Universidad Central de Venezuela. Venezuela.
42. González de Mejía, E. G., Guzmán-Maldonado, S. H., Acosta-Gallegos, J. A., Reynoso-Camacho, R., Ramírez-Rodríguez, E., Pons-Hernández, J. L., González-Chavira, M. M., Castellanos J. Z. y Kelly, J. D. (2003) Effect of cultivar and growing location on the trypsin inhibitors, tannins, and lectins of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in the semiarid highlands of Mexico. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003(51), 5962-5966.
43. Girón-Calle, J., Pedroche, J., Rodríguez-Patino, J. y Millán, F. (Eds.) (2003) *Proteína alimentarias coloides de interés industrial*. Sevilla, España: Universidad de Sevilla.
44. Grajes-García, E. M., Osorio-Díaz, P., Goñi, I., Hervert-Hernández, D., Guzmán-Maldonado, S. H. y Bello-Pérez, Luis A. (2012). Chemical composition, starch digestibility and antioxidant capacity of tortilla made with a blend of quality protein maize and black bean. *International Journal of Molecular Sciences* 13. 286-301.
45. Guevara-González, R.G. y Torres-Pacheco, I. (Eds.) (2006) Biactive components in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), *Advances in agricultural and Food Biotechnology*, 377/661(2), 217-236.
46. Haenen, D., Zhang, J, Souza da Silva, C., Bosch, G., van der Meer, I. M., van Arkel, J., van den Borne, J. J. G. C., Pérez Gutiérrez, O., Smidt, H., Kemp, B., Müller, M y Hooiveld, G. J. E. J. (2013) A diet high in resistant starch modulates microbiota composition, SCFA concentrations, and gene expression in pig intestine. *The Journal of Nutrition. Genomics, Proteomics and Metabolics* 1(3), 274-283.
47. Hartl, M. Giri, A. P., Kaur, H. y Baldwin, I. T. (2010) Serine protease inhibitors specifically defend *Solanum nigrum* against generalist herbivores

- but do not influence plant growth and development. *The Plant Cell* 22, 4158-4175.
48. Hernández-Melgar, M. A. y Martínez-Hernández E. G. (2016) *Determinación del análisis bromatológico proximal y calidad culinaria de Phaseolus vulgaris L. (Frijol común) grano negro criollo cultivado en la zona occidental de El Salvador*. (Tesis de licenciatura). Universidad de El Salvador. El Salvador.
 49. Jacinto-Hernández, C. y Campos-Escudero, A. (1993) Efecto de la cocción sobre algunas características nutricionales del frijol. *Agronomía Mesoamericana* 4, 42-43.
 50. Jaffe', W. G. (1960) Studies on phytotoxins in beans. *Arzneimittel Forschung*, 10, 1012.
 51. Kakade M. L., Rackis, J. J., McGhee, J. E. y Puski, G. (1974) Determination of Trypsin Inhibitor Activity of Soy Products: A Collaborative Analysis of an Improved Procedure, *American Association of Cereal Chemists* 51, 376-381.
 52. Klomkiao, S., Banjakul, S., Kishimura, H. y Chaijan, M. (2011) Extraction, purification and properties of trypsin inhibitor from Thai mungbean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek), *Food Chemistry* 2011(129), 1349-1354.
 53. Kutos, T., Golob, T. Kac, M., y Plestenjak, A. (2003) Dietary fiber content of dry and processed beans. *Food Chemistry*, 80. 231-235.
 54. Landa-Habana, L. Piña-Hernández, A., Agama-Acevedo, E, Tovar, J. y Bello-Pérez, L. (2004) Effect of cooking procedures and Storage on Starch Bioavailability in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plants Foods for Human Nutrition* 59, 133-136.
 55. Lestari L. A., Huriyati E., Marsono Y. (2017) The development of low glycemic index cookie bars from foxtail millet (*Setaria italica*), arrowroot (*Maranta arundinacea*) flour, and kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Food Science and Technology*, 54, 1406-1413.
 56. Loble, G. E., Holtrop, G., Bremner, D. M., Calder A. G., Milne, E. y Johnstone A. M. (2013). Impact of short term consumption of diets high in either non-starch polysaccharides or resistant starch in comparison with moderate weight loss on indices of insulin sensitivity in subjects with metabolic syndrome. *Nutrients*. 5, 2144-2172.
 57. López-Barrera, D. M. (2011) *Efecto del proceso de extrusión sobre los inhibidores de tripsina y actividad ureásica en frijol común (Phaseolus vulgaris L.)* (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Querétaro. México.
 58. Loran-Juárez, R. (2013) *Evaluación de la calidad nutrimental de la harina de frijol negro (Phaseolus vulgaris) adicionada con hierro y calcio* (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. México.

59. Martínez-Preciado, A. H., Naranjo-Figeroa, A. y Nungaray-Arellano, J. (2003) *Antocianinas, flavonoides y ácidos fenólicos presente en frijol negro Querétaro y Mayocoba y su estabilidad durante el cocimiento industrial*. Puerto Vallarta, México. X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.
60. Mansilla, A. Y. (2011) *Estudio Estructural y Funcional del Inhibidor de Serina-Proteasa tipo Germina presente en plantas de Trigo* (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Mar del Plata. Argentina.
61. Menezes, W. E., MELO, A.T., Lima, G.H. y Lajolo, F.M. (2004). Measurement of carbohydrate components and their impact on energy value of foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 331-338.
62. Meiners, C. R., Derise, M. C., Lau, H.C., Ritchey, S. J. y Murphy, E. W. (1976) The content of nine mineral elements in raw and cooked mature dry legumens. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 24(6), 1126-30.
63. Miranda-Villa, P. P., Marrugo-Ligardo, Y. A. y Montero-Castillo, P. M. (2013) Caracterización funcional del almidón de frijol Zaragoza (*Phaseolus Lunatus L.*) y cuantificación de su almidón resistente. *Tecnológicas* 2013(30), 17-32.
64. Morrison S. C., Savage, G. P., Monton, J. D. y Russel, A. C. (2005) Identification and stability of trypsin inhibitor isoforms in pea (*Pisum sativum L.*) cultivars grown in New Zealand. *Food Chemistry* 2007(100), 1-7.
65. Mujica M. V., Granito, M. y Soto N. (2012) Variación de los compuestos fenólicos de *Phaseolus vulgaris* L. durante el almacenamiento y su relación con el endurecimiento. *Bioagro* 24(3), 163-174.
66. Mujica M. V., Granito, M. y Soto N. (2015) Cambios microestructurales en los granos de *Phaseolu vulgaris* endurecidos. *Archivos Latinoamericanos de nutrición* 65(2), 110-118.
67. Muzquiz, M., Pedrosa, M. M., Varela, E. A. J., Guillamón, E., Goyoaga, C., Cuadrado, C. y Burbano, C. Factores no-nutritivos en Fuentes Proteicas de Origen Vegetal. Su Implicación en Nutrición y Salud. *Brazilian Journal of Food Technology III*, 87-98.
68. NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa. Dirección General de Normas. México.
69. NOM-110-SSA1-1994. Bienes y Servicio. Preparación y Dilución de Muestras de alimentos para su Análisis Microbiológico. Dirección General de Normas. México.
70. NOM-111-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la Cuenta de Mohos y Levaduras en Alimentos. Dirección General de Normas. México.
71. NOM-113-SSA1-1994. Bienes y Servicio. Métodos para la Cuenta de Microorganismos Coliformes Totales en Placa. Dirección General de Normas. México.

72. NORMA Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba. Dirección General de Normas. México.
73. Noriega da Silva L., Corteza A. P y Essi L. (2013) Leguminosas campestres da Universidade Federal de Santa Maria. *Revista Brasileira de Biociencias*, 11(2), 256-262.
74. Norioka, N., Hara, S., Ikenaka, T. y Abe, J. (1988) Distribution of Kunitz and the Bowman –Birk family proteinase inhibitors in leguminous sedes. *Agricultural and Biological Chemistry* 52(5), 1245-1252.
75. NMX-FF-038-SCFI-2013. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano-fabáceas-frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Especificaciones y métodos de prueba (cancela a la NMX-FF-038-SCFI-2002).
76. Olvera-Novoa, M. A. y Olivera-Castillo, L. (2000) Potncialidad del uso de las leguminosas como fuente proteica en alimentos para peces. *Avances en Nutrición Acuícola iv. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición. Noviembre* 15(18), 327-348.
77. Olmedilla, B., Farré, R., Asensio C. y Pedrosa M. M. (2010) Papel de las leguminosas en la alimentación actual. *Actividad Dietética*, 14(2), 72-76.
78. Ortiz-Chacón, J. E. y Dary-Mansilla, O. (1999) Aislamiento y Temoestabilidad de Iso inhibidores de tripsina del frijol negro (*P. vulgaris*). *Revista Científica de la Universidad de San Carlos Guatemala*, 11(1999), 6-10.
79. Ortiz-Huidrobo, R., Márquez-Mota, C, Quiñones-Peña, A., Tovar-López, E., Gálvez-Mariscal, A.; Tovar, A. y Torres, N. (2012). Fasting and refeeding regulate in different manner SNAT 2, SREBP-1 and 2, mTOR, serum insulin in animals fed different types of protein. *The FASEB Journal*, 26(1).
80. Osborn, T. C., y Brown, J.W.S. (1988) Genetic control of bean seed protein. *Critical Reviews in Plant Science* 7(1), 93-116.
81. Pratap A. y Jitendra K. (2011) *Biology and Breeding of Food Legumes*. Croydon,UK: CPI Group.
82. Quiñones, M. A. (2010) *Obtención de un concentrado de proteína de frijol negro, caracterización fisicoquímica y efecto en la concentración de insulina y expresión génica de SREBP-1* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
83. Quirós-Sauceda, A. E., Palafox, H., Robles-Sánchez, R. M. y González Aguilar, G. (2012) Interacción de compuestos fenólicos y fibra dietética:

- capacidad antioxidante y biodisponibilidad. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud XII* (3), 3-11.
84. Rebello C. J., Greenway F. L., Finley J. W. (2014) A review of the nutritional value of legumes and their effects on obesity and its related co-morbidities. *Obesity Review*, 15, 392–407
 85. Rodríguez-Licea, G., García-Salazar, J. A., Rebollar-Rebollar, S. y Cruz-Contreras, A. C. (2010) Preferencias del consumidor de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México: factores y características que influyen en la decisión de compra diferenciada por tipo y variedad. *Paradigma* 2(1), 121-145.
 86. Ruiz-Ruiz, J. C., Dávila-Ortíz, G., Chel-Guerrero, L. A. y Betancur-Ancona, D. A. (2012) Wet fractionation of hard-to cook bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds and characterization of protein, starch and fiber fractions. *Food Bioprocess Technology*, 5, 1531-1540.
 87. SAGARPA. Frijol. (2015) [Figura] Recuperado el 4 mayo de 2016 de: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/Paginas/Galeria%20de%20im%C3%A1genes/Frijol.aspx>
 88. Salinas, G. Y. (2014) *Caracterización funcional de un aislado de proteínas de frijol negro (Phaseolus vulgaris) variedad INIFAP-8025 y su aplicación en formulaciones de alimentos* (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
 89. Saura-Calixto, F., García-Alonso, A., Goñi, I., & Bravo, L. (2000) In vitro determination of the indigestible fraction in foods: An alternative to dietary fiber analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48. 3342–3347.
 90. Savón L. y Scull I. (2006) Avances en los métodos para disminuir el efecto de factores antinutrientales en los alimentos para especies monogástricas. *Revista Computarizada de Producción Porcina* 13(1), 25-29.
 91. SE (2012) Análisis de cadena de valor del frijol. Dirección General de Industrias Básicas. México. Recuperado el 8 de mayo de 2016 de: http://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/analisis_cadena_valor_frijol.pdf
 92. Segura-Campos, M. R., Cruz-Salas, J., Chel-Guerrero, L. y Bentancur-Ancona, D. (2014) Chemical and functional properties of Hard-to-Cook bean (*Phaseolus vulgaris*) protein concentrate. *Food and Nutrition Science* 5, 2081-2088.
 93. SIAP (2015) *Atlas Agroalimentario 2015*. SIAP. CDMX, México. Recuperado el 8 de mayo de 2016 de: http://nube.siap.gob.mx/publicaciones_siap/pag/2015/Atlas-Agroalimentario-2015
 94. Siddiq, M., Butt; M. S. y Sultan M. T. (2011) Dry Beans: Production, Processing and Nutrition. En N. K. Sinha (eds.), *Handbook of Vegetables*

- and Vegetable Processing* (pp. 545-565). Singapore, India: Blackwell Publishing.
95. Silva-Cristobal, L., Osorio-Díaz, P., Tovar, J. y Bello-Pérez, L.A. (2010) Chemical composition, carbohydrate digestibility, and antioxidant capacity of cooked black bean, chickpea, and lentil Mexican varieties. *Journal of Food*, 8(1). 7-14.
 96. Smallwood, N. J. (2000) *Producción de aceite crudo, pasta y harina de soya*. Editado por ASA, México, D.F.
 97. Sun, S. M., y Hall, T. C. (1975) Solubility characteristics of globulins from *Phaseolus vulgaris* in regard to their isolation and characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 23(2),184-189.
 98. Tenorio, P. *Phaseolus vulgaris* L. (2000) [Figura] Recuperado el 4 mayo de 2016 de: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/phaseolus-vulgaris/fichas/pagina1.htm>
 99. Tovar, J., Granfeldt, Y., & Björck, I. M. (1992a) Effect of processing on blood glucose and insulin responses to starch in legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40. 1846–1851
 100. Tovar, J., Björck, I., & Asp, N.G. (1992b) Incomplete digestion of legume starches in rats: A study of precooked flours containing retrograded and physically inaccessible starch fractions. *Journal of Nutrition*, 122.1500–1507.
 101. Tovar, A. y Torres, N. (2010) The role of dietary protein on lipotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1801(3), 367-371.
 102. Trugo, L. C., Ramos, L. A., Trugo, N. M. F., & Souza, M. C. P. (1990) Oligosaccharide composition and trypsin inhibitor activity of *P. vulgaris* and the effect of germination on the α -galactoside composition and fermentation in the human colon. *Food Chemistry*, 36, 53–61.
 103. Ulloa, J. A., Rosas-Ulloa P., Ramírez-Ramírez J. C. y Ulloa-Rangel, B. E. (2011) El frijol *Phaseolus vulgaris*: su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Fuente* 2011(8), 5-9.
 104. Vargas-Torres, A., Osorio-Díaz, P., Tovar, J.; Paredes-López, O., Ruales, J., Bello-Pérez L.A. (2004a) Chemical composition, starch bioavailability and indigestible fraction of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Starch Stärke*, 56. 74–78
 105. Vargas-Torres, A., Osorio-Díaz, P., Tovar, J.; Paredes-López, O., Ruales, J., Bello-Pérez L.A. (2004b) Starch digestibility of five cooked black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 605-612.
 106. Vibrans, H. (Ed.) (2009) *Malezas de México*. CONABIO. México. Recuperado el 4 de mayo de 2016 de:

<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/phaseolus-vulgaris/fichas/ficha.htm>

107. Yadav B. S., Sharma A., Yadav R. B. (2010) Effect of storage on resistant starch content and in vitro starch digestibility of some pressure-cooked cereals and legumes commonly used in India. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, 2449–2455.
108. Welhan, T. y Domoney, C. (2000). Temporal and spatial activity of a promoter from a pea enzyme inhibitor gene and its exploitation for seed quality improvement. *Plant Sci.* 159: 289-299.