

7
293



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**



**ALTERNATIVAS EN LA PRODUCCION DE TEMPEH
CON DIFERENTES VARIEDADES DE FRIJOL
DE CONSUMO NACIONAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A :

MARIA DE LOS ANGELES CORNEJO VILLEGAS

ASESOR: Q. JOSE LUIS GONZALEZ HERRERA

CUAUTITLAN IZCALLI. EDO. DE MEX.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ALTERNATIVAS EN LA PRODUCCION DE TEMPEH CON DIFERENTES
VARIETADES DE FRIJOL DE CONSUMO NACIONAL.**

OBJETIVOS DE LA TESIS.

1.-Implementar el crecimiento del *Rhizopus oligosporus* en la producción de tempeh empleando sustitutos del frijol de soya por dos variedades de frijol Mexicano de consumo nacional; frijol negro y frijol bayo *Phaseolus vulgaris*.

2.-Evaluar las diferencias en los resultados bromatológicos entre el tempeh y los productos elaborados con frijol negro y bayo.

3.-Estimar el contenido en sus elementos nutritivos de los productos obtenidos en la elaboración de tempeh, que refieren Steinkraus, Hesseltine, Leiner.

4.-Presentar alternativas de preparación del producto fermentado con *Rhizopus oligosporus* acordes a los hábitos alimentarios en México para su posible consumo.

INDICE

RESUMEN.	6
I.- INTRODUCCION.	9
II.- ANTECEDENTES.	11
1.- ORIGEN Y DEFINICION DEL TEMPEH.	11
1.1. FORMA DE CONSUMO.	14
1.2. METODO TRADICIONAL PARA SU PREPARACION.	16
1.3. METODO INDUSTRIAL PARA SU PREPARACION.	26
2.- VARIEDADES DE TEMPEH.	28
2.1. TEMPEH KECIPIR.	29
2.2. TEMPEH GEMBUS.	30
2.3. TEMPEH BENGUK.	31
2.4. TEMPEH LUPIN.	33
2.5. TEMPEH DE CHICHAROS AMARILLOS.	34
2.6. TEMPEH DE DESECHOS SOLIDOS DE ALMIDON DE FRIJOL MUNG.	34
2.7. TEMPEH DE TRIGO.	35
2.8. TEMPEH PRODUCIDOS A PARTIR DE FRIJOLES, CEREALES O MEZCLAS DE ESTOS.	36
2.8.1. TEMPEH DE FRIJOLES CLAROS.	36
2.8.2. TEMPEH DE CHICHARO DE VACA U OJO NEGRO.	37
2.8.3. TEMPEH DE GRANOS DE LEGUMINOSAS O CEREALES O MEZCLA DE ESTOS.	38

2.8.4. TEMPEH DE HARINA DE SOYA.	39
2.9. TEMPEH BONGKREK.	39
2.10. TEMPEH ONCOM.	40
3.- GENERALIDADES DE LA SOYA.	41
3.1. OTROS PRODUCTOS FERMENTADOS DE LA SOYA.	43
4.- GENERALIDADES DEL FRIJOL.	45
5.- GENERALIDADES DEL HONGO <i>Rhizopus oligosporus</i> .	53
5.1. CARACTERISTICAS QUE LE CONFIERE AL PRODUCTO Y CAMBIOS BIOQUIMICOS QUE SE MANIFIESTAN DURANTE LA FERMENTACION.	55
5.1.1. CAMBIOS EN LIPIDOS.	56
5.1.2. CAMBIOS EN CARBOHIDRATOS.	57
5.1.3. CAMBIOS EN AMINOACIDOS.	58
5.1.4. ENZIMAS PRODUCIDAS POR EL HONGO.	58
5.1.5. CAMBIOS EN EL VALOR NUTRITIVO DE LAS PROTEINAS DEL TEMPEH.	59
5.1.6. CAMBIOS EN LAS VITAMINAS Y OTROS FACTORES RELATIVOS A LA NUTRICION.	60
5.1.7. PRODUCCION DE ANTIBIOTICO.	63
5.2. OTRAS ESPECIES UTILIZADAS.	63
III.- OBJETIVOS.	64
IV.- MATERIALES Y METODOS.	65
1.- SELECCION DE LA MATERIA PRIMA.	66
1.1. ALMACENAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA.	66

2.- MANTENIMIENTO DE LA CEPA Y REACTIVACION DEL <i>Rhizopus oligosporus</i> .	67
3.- ADAPTACION DEL METODO DE ELABORACION DE TEMPEH CON FRIJOL DE SOYA.	68
3.1. CONFIRMACION DE LA TECNICA DE ELABORACION.	70
3.2. EVALUACION DE LA FORMACION DEL TEMPEH.	72
4.- ADAPTACION DEL METODO DE ELABORACION DEL TEMPEH CON FRIJOL NEGRO Y BAYO.	73
4.1. CAMBIOS EN LA TECNICA Y CANTIDAD DE INOCULO.	73
5.- TOMA DE MUESTRA.	75
5.1. PREPARACION DE LA MUESTRA.	75
6.- DETERMINACION DE COMPONENTES QUIMICOS A LA MATERIA PRIMA.	77
7.- DETERMINACION DE COMPONENTES QUIMICOS AL TEMPEH DE FRIJOL DE SOYA, FRIJOL NEGRO Y FRIJOL BAYO	78
8.- ESTIMACION NUTRICIONAL.	79
9.- ELABORACION DE LOS PRODUCTOS CON CARACTERISTICAS CULINARIAS DE LA COCINA MEXICANA.	80
9.1. PRUEBA DE ACEPTACION DEL PRODUCTO PARA CONSUMIDORES POTENCIALES.	82
V.- RESULTADOS Y DISCUSION.	84
1.- MANTENIMIENTO DE LA CEPA Y REACTIVACION DEL <i>Rhizopus oligosporus</i> .	84
2.- ADAPTACION DEL METODO DE ELABORACION DEL TEMPEH CON FRIJOL DE SOYA.	84

2.1. TECNICA DE ELABORACION.	87
2.2. EVALUACION DE LA FORMACION DEL TEMPEH.	88
3.- ADAPTACION DEL METODO DE ELABORACION DEL TEMPEH CON FRIJOL NEGRO Y BAYO.	90
3.1. RESULTADOS EN LA ADAPTACION EN LOS FRIJOLES NEGROS Y FRIJOLES BAYOS.	91
4.- DETERMINACION DE COMPONENTES QUIMICOS A LA MATERIA PRIMA.	93
5.- DETERMINACION DE COMPONENTES QUIMICOS AL TEMPEH.	107
6.- ESTIMACION NUTRICIONAL APOYADA EN REFERENCIAS QUE CITAN ALGUNOS AUTORES.	113
7.- ELABORACION DEL PRODUCTO CON CARACTERISTICAS CULINARIAS DE LA COCINA MEXICANA.	118
8.- PRUEBA DE ACEPTACION.	119
VI.- CONCLUSIONES.	121
VII.- BIBLIOGRAFIA.	125
APENDICE 1.	130
APENDICE 2.	131

RESUMEN.

Durante el desarrollo de este proyecto de tesis se pretende implementar la tecnología de elaboración del tempeh en condiciones tales que se permita la realización de éste producto, empleando en sustitución del frijol de soya, frijol bayo y frijol negro, leguminosas que son de producción y de consumo nacional.

El propósito de implementar esta tecnología es de proveer potencialmente de alimentos con constituyentes de la dieta que son fácilmente adquiridos en materias primas simples como el frijol y que pueden enriquecerse con una pequeña transformación.

Así mismo, se estiman los valores proximales de los nutrientes presentes en el tempeh de frijol negro y tempeh de frijol bayo, cuyo componente mayoritario son los carbohidratos principalmente azúcares, pentosas, galactosa, estaquiosa y rafinosa, siendo éstos dos últimos importantes en la nutrición, ya que se verán ampliamente disminuidos en un 50% en el remojo y durante la fermentación la rafinosa se mantienen constante mientras que la estaquiosa disminuye en un 59%.

En el tempeh de frijol de soya, su componente mayoritario son las proteínas, las cuales durante el proceso son degradadas en un 50% en aminoácidos. Como segundo componente en importancia son los lípidos; la soya cruda contiene solo el 1% de ácidos grasos libres del total de la grasa presente, después de la fermentación este valor se incrementará a 55.6% de ácidos grasos libres debido principalmente a la alta actividad lipolítica del hongo.

Esta es la diferencia entre las características finales de los productos elaborados del tempeh con frijol de soya, tempeh con frijol bayo y tempeh con frijol negro.

Por otro lado se discute la posibilidad de considerar que los elementos de transformación en el tempeh de frijol de soya como son: proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, minerales, así como los problemas de flatulencia se interpolen en el tempeh con frijol negro y tempeh con frijol bayo.

Como parte final igualmente se proponen alternativas en la preparación del producto de tempeh con frijol negro y de tempeh con frijol bayo, de tal manera que reúnan ciertos requisitos tales como:

- 1.- Facilidad en su preparación.
- 2.- Una presentación agradable.
- 3.- Presentarse como un producto conocido.
- 4.- Cumplir con ciertas consideraciones culinarias acordes a la comida Mexicana y quedar dentro del grupo de alimentos de consumo popular y de ingestión de elementos propios de la dieta Mexicana.

La importancia que la evaluación sensorial ha adquirido durante los últimos 20 años demuestra su creciente utilidad en círculos industriales académicos y de investigación.

Por lo anteriormente expuesto se considera de suma importancia la realización de la prueba de aceptación del producto por parte de los consumidores potenciales.

I.- INTRODUCCION.

En el campo de los alimentos existen diversos grupos de éstos y variadas formas de consumirse. Las leguminosas son un grupo de alimentos muy importante y una forma de consumirse es en la elaboración de productos fermentados tales como el tempeh; este alimento popular de consumo indonesio es producido a partir del frijol de soya y fermentado con alguna opción de entre las siguientes cepas de *Rhizopus* dentro de las cuales se mencionan: *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus aclamydosporus*, *Rhizopus formosaensis*, *Rhizopus chinesis*, *Rhizopus cohnii*.

El producto fermentado tiene características aceptables de sabor y textura, un alto porcentaje de proteínas y aceites insaturados de fácil digestibilidad.

Durante el proceso de fermentación, los cambios que se presentan, hacen que el producto obtenga características organolépticas satisfactorias y esto permite una gran aceptabilidad.

Los oligosacáridos tales como la estaquirosa y la rafinosa que se encuentran en las leguminosas y son los principales causantes de la flatulencia, se ven disminuidos durante la fermentación y ésta es una de las razones de la buena digestibilidad del tempeh.

De igual manera el tempeh es una buena fuente de vitaminas y minerales. Algunas vitaminas son sintetizadas por el hongo *Rhizopus oligosporus*. En cuanto a minerales el fierro que contiene hace que el tempeh sea una excelente fuente de éste mineral.

II.- ANTECEDENTES.

1.- ORIGEN Y DEFINICION DEL TEMPEH.

Tempeh (Tem-peí) es un delicioso alimento popular, originario de Indonesia producido a partir de frijoles tiernos de soya cocidos, ocasionalmente con otras legumbres, cereales, semillas o una combinación de éstos, unidos por un denso algodón de micelio blanco y aromático, fermentado por el hongo de la especie *Rhizopus oligosporus*. Es un producto que se caracteriza por su buen sabor y textura, así como de un alto porcentaje de proteínas y aceites insaturados de fácil digestibilidad. Por estas razones se considera que el tempeh puede ser el producto que a bajo costo suministre en los países occidentales las proteínas necesarias. (*Goulart F., 1981. Kao C. R., 1978.

*The soyfoods center, 1982 boletín 4593.)

El tempeh fresco contiene 19.5% de proteínas, se considera una proteína completa y contiene todos los aminoácidos esenciales, posee mayor calidad de proteína que cualquier otro alimento derivado de la soya, su calidad es comparable a la carne de res o de pollo.

Es también una de las mas ricas fuentes de origen vegetal de vitamina B₁₂; 100g contienen de 4.0 a 8.8 microgramos, lo cual provee de 133% a 293% de las necesidades diarias de un adulto.

No contiene colesterol y tiene un bajo contenido de grasas, especialmente en grasas saturadas, lo cual hace su fácil digestión. (*The soyfoods center, 1982 boletín 4593.)

El tempeh tuvo su origen hace cientos de años en el Este y Centro de Java, pero lamentablemente no existen documentos. Se hallaron productos similares al tempeh en China y en Nepal, llamados respectivamente touchia ping y kenima, pero no se sabe donde se originaron. El primer documento escrito que se refiere al tempeh apareció en 1895 en un artículo del científico Holandés H.C., Prinsen Geerlings. En 1954 surgió interés por el tempeh en América con los estudios realizados por el médico pediatra , Dr. Paul Georgy. Alrededor de 1960 el Dr. Keith Steinkraus y el Dr. Clifford W. Hesseltine realizaron un estudio intensivo sobre el tempeh y sus publicaciones y esfuerzo personal hicieron que el tempeh fuera mejor conocido en los Estados Unidos. En 1962 fue abierto el primer establecimiento productor en América , en la ciudad de Los Angeles California, es administrado por personal Indonesio-Norteamericano.

En 1975 aparecieron las primeras recetas de tempeh publicadas en inglés en el libro THE FARM VEGETARIAN COOKBOOK por The Farm, una comunidad autosuficiente con 1400 miembros situada en un terreno de 680 hectáreas en Summertown, Tennessee. Desde entonces The Farm ha colaborado mucho para introducir el tempeh en América.

En 1979 fue publicado The Book of Tempeh. En 1980 Tempeh Production. (*Goulart F., 1981. *Martinelli A., Hesseltine W. C., 1964.)

1.1.- FORMAS DE CONSUMO.

En Indonesia el tempeh se consume en todos los niveles socioeconómicos, en los Estados Unidos las comunidades autosuficientes vegetarianas que viven en pequeñas granjas, utilizan el tempeh reemplazando a la carne, como la mejor fuente de proteínas en la dieta.

El tempeh se consume en rebanadas delgadas solas, éstas se pueden sumergir en salsa de soya, salsa de pescado o en salmuera del 5 al 10% y después se frien. Alternativamente las rebanadas de tempeh pueden ser inmersas en un batido hecho de harina de arroz o maíz y leche de coco, para después freírlas, o bien se puede remojar en pulpa de tamarindo diluída con agua caliente.

El tempeh se puede usar en guisados como sustituto de carne con papas y otros vegetales.

En Indonesia, la Universidad reporta que se utilizaron 75,000 toneladas de frijol de soya para fabricar el tempeh en 1976. El consumo de tempeh fresco en la provincia de Lampung fue de 18.3 g a 20.1 g y en Jogjakarta fue de 4.6 g per capita por día.

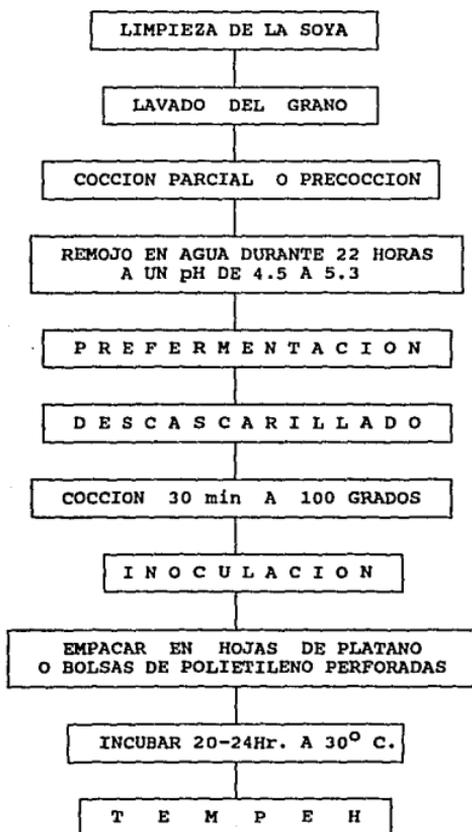
En 1964 Kao estima que el 10% de los 100,000,000 de habitantes Indonesios comen en promedio 100 g de tempeh por persona por día.

Actualmente se consume como tempeh crocante, hamburguesas de tempeh, tempeh en salsa de jitomate y hierbas, tacos de tempeh, tempeh con arroz frito y omelette de tempeh entre otras formas, cada persona lo sazona y guisa a su gusto.

(*Hesseltine C. W., 1965, Shurfleff W. A.S.A., Smith A. K. et. al. 1964.)

1.2.- METODO TRADICIONAL PARA SU PREPARACION.

DIAGRAMA PARA LA PRODUCCION DE TEMPEH



Fuente: Keith H. Steinkraus, 1985 pag 14.

LIMPIEZA Y DESCASCARILLADO.

Los frijoles deben limpiarse para remover el polvo, piedras, semillas de diferente especie, frijoles posiblemente dañados y alguna otra materia extraña. El hongo no es capaz de crecer en los frijoles enteros, el descascarillado es esencial en la producción de tempeh, sin embargo no siempre la cascarilla es separada completamente de los frijoles que se van a fermentar, esto no permite un buen crecimiento y hace que sea de mala calidad y por lo tanto que se tenga que bajar su costo. (*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

PRECOCCION.

Se realiza de 15 a 30 minutos en agua a ebullición con la finalidad de facilitar el descascarillado, la hidratación y eliminar bacterias y hongos no deseables que pueden estar presentes en el frijol de remojo. (*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

REMOJO.

Este tiene como finalidad reducir el tiempo de cocimiento, estimula la prefermentación con la presencia de algunas bacterias como son *Bacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*, además de solubilizar los carbohidratos responsables del sabor desagradable del frijol de soya y de la producción de flatulencia como son la estaquiosa y la rafinosa. (*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

DESCASCARILLADO.**DESCASCARILLADO SECO.**

Este se realiza antes del procedimiento de hidratación y es un método eficiente y deseable, se utiliza un equipo mecánico. Los cotiledones de la soya son ligeramente arrugados o aplastados para facilitar la remoción de la cascarilla, esto puede ser acompañado por aire caliente a 104°C por 10 minutos o en el sol por 1 a 2 horas. Los frijoles se pasan a través de un molino de grano para romper la cascarilla. Los Indonecios tienen una adaptación de un molino de piedra Chino para este propósito, el cual permite realizar un pequeño ajuste si se tiene alguna variación del grano. La cascarilla se quiebra permaneciendo intactos los cotiledones, esto es ideal pero si los granos

son demasiado pequeños pasan intactos, por el contrario si son demasiado largos estos se rompen. Después continua la limpieza del descascarillado, esta puede ser separada de los cotiledones mediante el uso de un aspirador o un separador por gravedad o por un proceso de entresacado. Los cotiledones descascarillados y secos pueden ser guardados hasta que sean ocupados para hacer el tempeh.

DESCASCARILLADO HUMEDO.

Este siempre se ejecuta después del proceso de remojo y no requiere de otro recurso mas que el de las manos frotando los cotiledones y supliendo con agua para que floten las cáscaras. Las máquinas que se utilizan son como la del descascarillado en seco y esto es efectivo si primeramente se ajusta. Adicionalmente los frijoles hidratados pueden pasar a través de peladoras de vegetales o rebanadora de carne que rompen la cascarilla. Naturalmente las máquinas aceleran el proceso, pero éste se vuelve laborioso cuando no se cuenta con el equipo mecanizado y se tiene que hacer en forma manual.

(*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

PREFERMENTACION (HIDRATACION Y FERMENTACION ACIDA).

Bajo condiciones naturales en los trópicos, durante la producción del tempeh ocurren dos distintas fermentaciones. La primera se manifiesta durante el remojo provocada por las bacterias y da como resultado una acidificación en los frijoles. La segunda fermentación es del hongo y da como resultado un mejor crecimiento del micelio en los cotiledones del frijol. El moho no es capaz de crecer en los frijoles si no son deshollejados e hidratados. La hidratación es el proceso en el cual los frijoles se remojan en un exceso de agua lo cual les permite absorber aproximadamente el doble de su peso original. Durante la fermentación ácida por las bacterias el pH baja a un rango de <4.5 a 5.3>. Esto no afecta el crecimiento del hongo, y es benéfico ya que inhibe el crecimiento de bacterias no deseables y que pueden competir con el hongo.

La fermentación ácida no ocurre normalmente cuando los frijoles son remojados toda la noche a temperatura ambiente, por lo tanto es conveniente acidificar el medio en forma artificial mediante la adición de ácido acético durante el remojo y la cocción. Las bacterias durante el remojo fermentan la estaquiosa y la rafinosa que son los primeros componentes en la producción de flatulencia cuando los frijoles son consumidos.

Otra razón para recurrir a la acidificación artificial en los frijoles es que el hongo tiene alta actividad proteolítica; la desaminación seguida de la hidrólisis libera amoníaco causando que el pH se incremente alrededor de pH 7.0, como consecuencia suficiente amoníaco libre mata al hongo, por lo que un pH inicial bajo alarga el tiempo de la fermentación antes que el amoníaco sea liberado.

Hesseltine et. al., 1963 encontró que los frijolés de soya contienen componentes estables que se hacen solubles y que pueden inhibir el crecimiento del *Rhizopus oligosporus* y esta misma fracción puede inhibir a las enzimas proteolíticas en el hongo.

Estos hallazgos sugieren que los frijoles deben remojar sin descartar este paso ya que es esencial para la obtención del tempeh. La hidratación generalmente involucra 1 o 2 períodos de remojo o varios espaciados de 2 a 24 hr y puede incluir el paso de la precocción, puesto que los tiempos de remojo varían desde 1 hr a ebullición en agua a 2 hr a 70°C. La hidratación más común es de 12 a 15 hr (toda la noche) a temperatura ambiente, ocurriendo así la fermentación ácida por las bacterias. (*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

COCCION.

Los frijoles son parcialmente cocidos para:

- 1.- Destruir la contaminación por bacterias que pueden interferir en la subsecuente fermentación.
- 2.- Destruir el inhibidor de tripsina.
- 3.- Liberar algunos nutrientes requeridos para el crecimiento del *Rhizopus oligosporus*.

Tradicionalmente se cuecen en tiempos que varían de 10 min a 3 horas a ebullición. (*Steinkraus K. H., 1985. Shurffleff W., Aoyagi A., 1979.)

INOCULACION.

El inóculo puede ser obtenido de las siguientes fuentes.

- 1.- Esporas del tempeh.
- 2.- Tempeh secado al sol y pulverizado.
- 3.- Hojas secas de *Hibiscus tiliaceus* donde crece el hongo.
- 4.- Pastel seco de tempeh ragi.
- 5.- *Rhizopus oligosporus* especie NRRL-2710 U.S.A.
- 6.- *Rhizopus oligosporus* CBS-338.62 Holanda.

Generalmente de 1 a 3 gramos de tempeh seco y pulverizado son usados para inocular 1000 gramos de soya precocida remojada y deshollejada, el inóculo debe ser completamente distribuido sobre la superficie de los frijoles. El polvo seco de tempeh o las hojas secas de *Hibiscus tiliaceus* se espolvorean sobre la superficie de los cotiledones y después se mezclan completamente para distribuir las esporas del hongo sobre la superficie de todos los frijoles. Si la torta fresca de tempeh desmenuzada es utilizada como inóculo se debe cuidar que ésta entre en contacto con el mayor número posible de cotiledones. (*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

ENVASES PARA LA FERMENTACION.

Hojas de plátano *Musa sapientum* o algunas otras hojas largas como *Dellinia indica*, hojas de *Baccaurea motiyana* son excelentes empaques para fermentar el tempeh. Algunos investigadores utilizan bolsas de polietileno perforadas, otros emplean recipientes de acero inoxidable y de vidrio, los cuales permiten una buena formación del pastel de tempeh. Las formas de los empaques pueden ser redondas o cuadradas y el espesor de los pasteles de tempeh es aproximadamente de 1 cm.

En suma cualquier empaque ya sea de plástico, vidrio, hojas, o el acero inoxidable pueden ser utilizados para la fermentación porque:

- 1.- Permiten el acceso de suficiente oxígeno para el crecimiento del hongo.
- 2.- Si el acceso de oxígeno no es suficiente se promueve la esporulación y el oscurecimiento del micelio.
- 3.- Puede ser controlada la temperatura.
- 4.- Los frijoles retienen la humedad en el transcurso de la fermentación.
- 5.- No hay agua libre en contacto con los frijoles no favoreciendo el desarrollo de bacterias que lo contaminan.
- 6.- La fermentación se mantiene limpia, intacta y salobre.
(*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

TEMPERATURA DE INCUBACION.

La incubación puede realizarse a intervalos de temperatura que van de 25°C-37°C, la más alta temperatura permite mayor crecimiento del hongo particularmente *Rhizopus oligosporus*. Martinelli y Hesseltine (1964), reportaron que se requerían 80 horas a 25°C y 26 horas a 28°C, y que se requieren de 22 a 24 hr. a una temperatura de 31°C a 37°C. Las temperaturas mayores de 30°C promueven en los frijoles un mejor crecimiento del micelio dando un producto compacto entre 18 y 24 hr. Se debe cuidar que la temperatura no vaya mas allá de 37°C porque causa daño en el crecimiento del hongo.

Se tienen dos importantes razones para no aumentar demasiado la temperatura ya que se favorece el desarrollo de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas cocovenenans*.

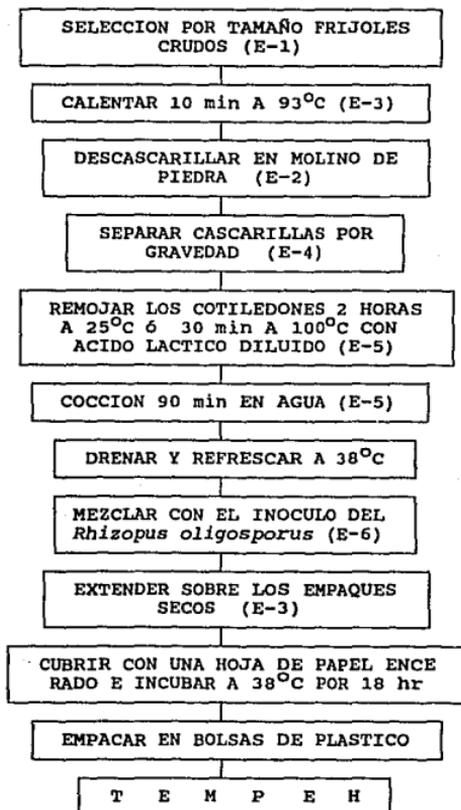
Por lo tanto se deben tomar en consideración las medidas necesarias para llevar a cabo la incubación del tempeh, manteniendo constantes las condiciones de humedad, oxígeno y temperatura para el buen desarrollo del hongo. Bajas concentraciones de oxígeno inhiben el crecimiento y altas concentraciones provoca una esporulación prematura en el producto, temperaturas inferiores al intervalo señalado da como resultado un lento crecimiento del hongo, por consiguiente un incremento en la temperatura provoca una inhibición en el crecimiento. (*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

CONSERVACION.

Se puede conservar durante las primeras 24 hr. a temperatura ambiente si se desea conservar por un período mayor se debe refrigerar, es factible el poderlo conservar ya cocinado en refrigeración, deshidratado y congelado. (*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

1.3 .- METODO INDUSTRIAL.

DIAGRAMA PARA LA PRODUCCION DE TEMPEH



EQUIPOS PARA LA PRODUCCION DE TEMPEH.

E-1. Seleccionadora cortadora de semillas modelo 297-AS con capacidad de 110 Kg/hr.

E-2. Molino de 8 pulgadas modelo 148-2.

E-3. Gabinete de circulación de aire caliente con controles de temperatura de bulbo húmedo, velocidad del aire y recirculación. (14 X 32 X 11/2").

E-4. Separador gravitatorio modelo 5-A con capacidad de 90 Kg/hr.

E-5. Marmita enchaquetada de 20 galones con capacidad de 14 Kg de frijoles hidratados.

E-6. Mezclador modelo H-600T con capacidad de 14 Kg de frijoles hidratados.

Este es el método que se utiliza a nivel industrial para la elaboración de Tempeh en Indonesia. (*Steinkraus K. H., 1985. Smith, A. K. et al 1965.)

2.- VARIEDADES DE TEMPEH.

Desde los principios de la fermentación del Tempeh ha habido un gran número de variedades de frijoles y cereales o mezcla de granos, que se han sustituido por el sustrato de la soya, adicionando otros ingredientes para la Industria de los Alimentos. Como ejemplo se tiene que el residuo de la leche cuajada de la soya puede producir Okara (se puede usar un mejor sustrato o algún otro ingrediente en la manufactura de nuevos tipos de Tempeh). Similarmente los residuos de la extracción de leche de coco o tortas de coco después de extraerles el aceite pueden ser usadas para hacer Tempeh Bongkrek que ha sido consumido por muchos años en Indonesia. Alternativamente en reemplazo del hongo del género *Rhizopus*, puede estar compitiendo el hongo del género *Neurospora* que puede sustituir y producir Tempeh Ontjom, cuando la torta de cacahuete es utilizada como sustrato.

Estos productos son relativamente ricos en proteínas, pueden ser fritos o cortados en rodajas y utilizados en sopas. Naturalmente el sabor del producto varía con el sustrato y el hongo empleado. (*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

2.1.- TEMPEH KECIPIR.

En Indonesia los frijoles nadantes son popularmente conocidos como Kecipir, otro nombre local es Kaceper, Jaat y Bator. Las vainas jóvenes y las hojas son utilizadas como vegetales y el grano maduro es tostado o cocinado y consumido como refrigerio o merienda; esta planta es nutricionalmente mejor que la soya porque todas las partes se pueden consumir. Los granos tienen un contenido de proteína que va de 27.4% a 29.8%, grasa de 15% a 20.4% y carbohidratos de 28% a 31.6% en peso fresco.

Para fabricarlo se toman los granos, se lavan se cuecen por 60 min, se les remueve la cáscara, los cotiledones son remojuados por 24 horas en exceso de agua, se cortan en pequeñas partes y esterilizan por 30 min., a 121°C.

Generalmente el *Rhizopus oligosporus* es la especie que crece en los cotiledones del grano para formar un pastel de Tempeh en un periodo que va de 24 a 30 horas a 30°C. (*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

2.2.- TEMPEH GEMBUS.

Durante la segunda guerra mundial cuando la comida escaseó la gente en Java utilizó el desperdicio del Tahu, cuajada de leche de soya. Las fábricas a través del proceso de fermentación elaboraron un producto que es conocido como Tempeh Gembus que tuvo gran aceptabilidad por la gente.

Este producto puede ser encontrado en todos los mercados del Centro y Este de Java con un precio bajo de tal manera que la gente de bajos ingresos lo puede adquirir y regularmente se consume acompañado con arroz.

La preparación de Tempeh Gembus es simple, los desechos de fabricación de Tahu son prensados para eliminar el exceso de agua, vaporizados se ponen en un lugar fresco y se inoculan con Tempeh Ragi, se envuelven en hojas de plátano y se ponen en un lugar oscuro por dos días. Este producto tiene un alto contenido de fibra, calcio y tiene gran aceptabilidad en la comunidad vegetariana. (*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

2.3.- TEMPEH BENGUK.

Una de las leguminosas menos conocida en Indonesia Centro y Este de Java es *Mucuna pruriens* D.C., esta leguminosa crece en terreno poco fértil y en climas extremos, el costo de la *Mucuna* es aproximadamente la mitad del precio de los frijoles de soya, por lo tanto el Tempeh Benguk es de mucho menor costo que el Tempeh Kedele y más accesible a la gente pobre. Este se consume como sale de la fermentación.

Los granos maduros y secos de *Mucuna pruriens* tiene un contenido de proteína relativamente alto en comparación con otras leguminosas en Indonesia. Tradicionalmente el Tempeh Benguk es preparado como sigue: los granos son hervidos antes de cocerlos durante 30 a 45 min., ocasionalmente con la adición de algunas cenizas, después se remueve la cáscara; los cotiledones, son remojados en exceso de agua durante dos o tres días cambiando el agua dos o tres veces al día, esto con el propósito de remover los alcaloides. Los cotiledones hinchados son lavados, cortados en pequeñas piezas y vaporizados por una hora. Cuando se han enfriado los cotiledones, son inoculados con Tempeh Ragi, se envuelven en hojas de plátano formando empaques de 4 X 7 X 1 cm.

Los empaques son incubados en la oscuridad y frecuentemente cubiertos con un costal de yute, después de dos días el Tempeh esta listo para consumirse. El producto fermentado tiene un color entre gris y blanco con unas luces violetas y con un aroma específico como a arroz fermentado.

Rhizopus achlamydosporus y *Rhizopus oryzae* producen mejores pasteles de Tempeh Benguk.

Tempeh Ragi, le llaman al inóculo sobre todo en los países de Malang y Sukakarta.

Tempeh Kedele, le llaman al tempeh tradicional de Indonesia y Malasia. (*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

2.4.- TEMPEH LUPIN.

El lupin (*Lupinus angustifolius*) es similar en apariencia a la soya (*Glycine max*). En estado no fermentado el frijol Lupin es más sabroso y apetitoso que la soya, los granos son parecidos en color a la soya pero cuando es separada la cáscara de ambos, Lupin es ligeramente más oscuro.

La fermentación se lleva a cabo de la siguiente manera: se remueve la cascarilla con un molino, se ponen a remojar los granos durante toda la noche, después son calentados en exceso de agua durante 30 minutos, se escurren los frijoles y se extienden para que se evapore la humedad de la superficie. Los frijoles frescos son completamente mezclados con una suspensión de esporas, se incuba durante 24 horas a 32°C. La torta fermentada puede ser rápidamente secada para bajar el contenido de humedad y preservarlo por largo tiempo. Esto es conveniente ya que el Lupinus tiene un amplio rango de contenido de humedad (53-71%) lo que puede provocar una contaminación por bacterias; se recomienda emplear bolsas de plástico con un espesor no mayor a 2 cm. para obtener un producto satisfactorio. (*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

2.5.- TEMPEH DE CHICHAROS AMARILLOS.

Anderson et. al. en 1977 elaboraron el Tempeh utilizando chícharos amarillos *Pisum sativum* l como sustrato, usaron 4 horas para el remojo y calentaron por 15 min., el tiempo para la fermentación fue 40 horas a 29°C. Durante la incubación se incrementa de 26% a 34% el contenido de proteínas, los lípidos van de 2.3% a 3.9% en el producto terminado. El sabor es tan bueno como el Tempeh de soya.

(*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

2.6.- TEMPEH DE DESECHOS SOLIDOS DE ALMIDON DE FRIJOL MUNG.

Hunkue es un tipo de almidón extraído con agua del frijol mung. El proceso de extracción es el siguiente.

Los frijoles mung son triturados y el agua es adicionada para producir una suspensión la cual se pasa a través de un filtro para remover las partículas gruesas. El filtrado se pone en un recipiente por varias horas para permitir al almidón sedimentar y el sobrenadante es generalmente desechado. El precipitado blanco es el almidón puro Hunkue. La proteína siempre queda en los frijoles y en las partículas gruesas del sobrenadante.

Gandjar et. al. en 1977 desarrollaron el proceso en el cual el desecho sólido de Hunkue es fermentado como un producto similar al tempeh Gembus. El producto puede ser consumido con arroz. El sustrato, fue colocado en cajas de petri, inoculados con *Rhizopus oryzae* R-128 e incubado a 30°C por 24 horas. El sustrato permitió el crecimiento del micelio formando una torta compacta.

Después de 30 horas, el micelio se puso menos denso y las esporas negras aparecieron. Es recomendable que el Tempeh se consuma antes de 24 horas de fermentación. El proceso de fermentación termina cuando el sustrato está completamente cubierto por el micelio, el producto tiene un aroma y sabor a nuez. (*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

2.7.- TEMPEH DE TRIGO.

El cultivo puro fermentado es colocado en cajas de petri; una porción de 35g de trigo rojo duro y elástico es puesto en una coladera de alambre y lavado totalmente con agua corriente, el trigo limpio se coloca en un recipiente con agua en exceso y es calentado por 12 min.

Los granos escurridos son puestos en un cuarto fresco antes de inocularlos con suspensión de esporas del género *Rhizopus*. La suspensión es preparada adicionando 2 ml. de agua destilada estéril, y para inocular esta muestra se utilizaron 0.5 ml. de suspensión de esporas. Los granos son empacados en cajas petri y se incuban a 31°C durante 20 horas. *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 es utilizada porque da el producto más satisfactorio. (*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

2.8.- TEMPEH PRODUCIDO A PARTIR DE FRIJOLES, CEREALES O DE LAS MEZCLAS DE ESTOS.

El objeto de éstas investigaciones fue elaborar Tempeh utilizando frijoles que crecen en Africa y que proveen de valor nutricional al producto. A continuación se mencionan algunas de éstas investigaciones.

2.8.1. TEMPEH DE FRIJOLES CLAROS *Vicia faba*.

Estos frijoles son aparentemente originarios en el área mediterránea o en Asia. En el norte de Africa éstos crecen y se cosechan en invierno. La variedad utilizada para el Tempeh fue Kleine thuringer.

Los frijoles descascarillados son primeramente remojados y después calentados por 10 min., añadiendo 0.1% de cloruro de calcio, esto se hace para prevenir que los frijoles que están calentándose se separen quedando libres los granos de almidón que pudieran hidratarse y gelatinizar. La hidratación previa al calentamiento es esencial para evitar la gelatinización.

Rhizopus oryzae y *Rhizopus oligosporus* son indispensables para el buen crecimiento en los frijoles claros, el período de incubación con el producto más aceptable fue a 31°C durante 30 horas. (*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

2.8.2. TEMPEH DE CHICHARO DE VACA U OJO NEGRO *Vigna sinensis*.

Los frijoles son remojados toda la noche, descascarillados y calentados por 20 min., escurriéndolos al final, cuando la temperatura esta a 30°C aprox., 30 a 40 g son inoculados individualmente con 1 ml. de suspensión de esporas que se obtienen de la mezcla de *R. oligosporus*, *R. oryzae* y *R. arrhizus*, la muestra se pone en cajas de petri a 31°C durante 30 a 40 horas. El pH inexplicablemente cae a 5.3 dando un sabor ácido en el producto. (*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

2.8.3 TEMPEH DE GRANOS DE LEGUMINOSAS O CEREAL O MEZCLAS DE ESTOS.

Cuando se hace Tempeh de mezcla de leguminosas y granos de cereal, se ha encontrado que es necesario cocerlos por separado y darles un tratamiento diferente después del calentamiento. Los frijoles son lavados y después calentados por 10 min en exceso de agua con 0.1% de cloruro de calcio y descascarillados antes de cocerlos.

Los cereales son calentados por 30 min., en exceso de agua y después se aplastan completamente con un mortero, pero sin lograr un descascarillado completo. Se prepara la mezcla de cereal y frijol añadiendo 2 ml. de suspensión de esporas por cada 50 g de mezcla. Posteriormente se incuba la mezcla en cajas de petri ó en bolsas de plástico perforadas. El *Rhizopus arrhizus* se utiliza para el inóculo y creciendo muy bien en frijoles y aceptablemente en cereales después de 40 horas a 31°C. (*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

2.8.4. TEMPEH DE HARINA DE SOYA.

Se utiliza harina de soya desgrasada (3.93%) y el *Rhizopus oligosporus* para la fermentación. El producto final es un pastel sólido cubierto por el micelio blanco con el sabor y la textura típica. (*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

2.9.- TEMPEH BONGKREK.

Este se hace a partir de los desechos sólidos de la producción de leche de coco y es frecuentemente mezclado con cacahuete.

La torta de coco es remojada durante algunas horas, ajustándose el pH alrededor de 4.5 a 5.0 con vinagre. El residuo es prensado y secado al sol por unas horas, después se cocce con vapor y se inocula con *Rhizopus oligosporus*.

Las tortas inoculadas se ponen en hojas de plátano o bolsas de plástico en un cuarto oscuro por 2 días a una temperatura de 37°C, para prevenir el desarrollo de *Pseudomona cocovenenans* que produce la toxina bongkrek.

El hongo penetra en el sustrato y se entreteje en las partículas dando una torta menos firme que la de Tempeh Kedele. El Tempeh bongkrek nunca debe ser consumido si el hongo no creció en forma abundante en la torta. (*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

2.10.- TEMPEH ONCOM.

Oncom es un agradable producto fermentado utilizando como materia prima el cacahuete. Dependiendo del género del hongo se tienen 2 productos:

Oncom hitam (Oncom negro) si se utiliza *Rhizopus oligosporus*, y Oncom merah (Oncom rojo) si se utiliza alguna especie de *Neurospora*.

El proceso es parecido a Tempeh Bongkrek, las tortas se cubren con hojas de plátano y se incuban de 25°C a 30°C por un periodo que va de 36 a 48 horas. (*Steinkraus K. H., 1985. Shurfleff W., Aoyagi A., 1979.)

3.- GENERALIDADES DE LA SOYA *Glycine max.*

La soya es una hierba anual de verano originaria del sureste de Asia en la provincia de Manchuria , semejante al frijol de semilla comestible y muy nutritiva. Se conoce en China desde hace 4000 años y fue llevada a Europa hace 1600 años; existen más de 100 variedades que se cultivan para diversos usos como son; alimentos para el hombre, forraje para el ganado, productos industriales y otros.

Pertenece a la familia de las leguminosas, a la subfamilia de las Papilionoidae y su género es *Glycine max*, generalmente es erecta y su altura varia de 30 a 120 cm., la planta entera esta cubierta de pelos muy finos de color castaño o gris. Las hojas trifoliadas alternadas varían mucho de tamaño y forma, generalmente caen cuando las semillas maduran. Las flores inconspicuas de color blanco o púrpura brotan en la axila de las hojas y son de 6 a 7 cm. de largo, las vainas contienen de 1 a 4 semillas que varía en color desde amarillo, verde, castaño, negras o manchadas.

La mayoría de las semillas son casi esféricas y pesan entre 120 y 180 miligramos, los cotiledones son verdes antes de madurar llegando a ser amarillos cuando la semilla madura, el hilum incluye colores desde negro, café, gris y amarillo. La duración del día y la noche es el factor principal que regula la floración y maduración de la soya.

Cada variedad presenta requisitos específicos en foto periodos para poder florecer, razón por la que las variedades están adaptadas a diferentes latitudes.

Se desarrolla y rinde mejor en suelos fértiles y bien drenados así como en veranos cálidos (no demasiado calurosos), sin embargo en climas de regiones templadas y subtempladas, zonas tropicales y subtropicales, se obtiene una buena cosecha. Puede vegetar en la mayoría de los suelos aunque sean pobres pero que tengan potasio, fósforo y calcio, ya que la soya requiere grandes cantidades de éstos elementos. Es necesario un pH de 6.0 aproximadamente, por lo que en la primera siembra el suelo debe estar bien nitrogenado y subsecuentemente los nódulos que se forman en la planta de soya, se encargan del intercambio del nitrógeno a la tierra.

La producción más satisfactoria normalmente proviene de utilizar aquellas variedades que utilicen todo el período vegetativo de la región, pero que se maduren antes de la primera helada. Se siembra durante mayo y junio en surcos separados de 90 a 105 cm., con una densidad de siembra de una semilla viable por cada 2.5 cm. de distancia, lo cual equivale de 44 a 66 kilómetros/hectárea. En el momento de la cosecha la humedad en el grano debe estar entre 10% y 14%. Las plagas que más atacan a la semilla son: angululosis, bacteriosis y antracnosis. (*Aduke J., 1981. Djien K., Hesseltine C. W., 1961.)

3.1.- OTROS PRODUCTOS FERMENTADOS DE LA SOYA.

Los productos fermentados forman parte muy importante dentro de la dieta de los países orientales, los productos fermentados de la soya y de pescado son fuente principal de proteínas en su dieta. Se piensa que se empezó a desarrollar la fermentación de soya por los integrantes de la religión budista quienes dentro de su alimento diario no podían consumir ningún tipo de carne y requerían de alimentos nutritivos.

No se sabe como fue preparado por primera vez el frijol de soya, sin embargo se cree que se tostaba y se hervía en agua, pero este proceso además de implicar largos periodos de cocimiento, no eliminaba el sabor típico desagradable del frijol de soya y quizás esta es la razón por lo que los Chinos desarrollaron la fermentación de la soya.

La fermentación de la soya es uno de los caminos más sencillos y más prácticos para la utilización directa de la soya en la alimentación humana.

En la siguiente tabla No. 1 se muestran algunos alimentos fermentados tradicionales en los países orientales.

De los alimentos fermentados de soya, quizás el más importante es el tempeh debido a su aceptable sabor y a su valor nutricional, es el producto que más se ha investigado y desarrollado en los países occidentales en los últimos tiempos. (*Aduke J., 1981. Djien K., Hesseltine C. W., 1961.)

T A B L A No. 1

PRODUCTOS FERMENTADOS DE LA SOYA

PRODUCTO	HECHO DE	MICROORGANISMO UTILIZADO	SABOR
SHOYU	TRIGO Y SOYA	<i>Aspergillus oryzae</i> Levadura Y <i>Lactobacillus</i> .	SALADO A CALDO
MISO	ARROZ Y SOYA	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Saccharomices rouxi</i>	SALADO
NATTO	SOYA	<i>Bacillus subtilis</i>	AÑEJADO
TEMPEH	TRIGO Y SOYA	<i>Rhizopus oligoporus</i>	SUAVE
SUFU	SOYA	<i>Aspergillus oryzae</i>	VARIABLE
HAMANATO	SOYA	<i>Aspergillus oryzae</i>	DULCE
ONTJOM	SOYA	neurosporas	ALMENDRA

Fuente: Hesseltine C. W., 1964 pag 123.

4.- GENERALIDADES DEL FRIJOL *Phaseolus vulgaris*.

Dentro del grupo de las leguminosas el frijol es el que se consume en mayor cantidad en el mundo. Este producto es de importancia en el Centro y Sur de América en donde la dieta tradicional se ha basado por milenios en el frijol y el maíz.

El frijol es una planta anual, herbácea, cultivada intensamente desde el trópico hasta las zonas templadas, aunque es una especie terófila, no soporta las heladas.

El frijol se cultiva esencialmente para obtener las semillas, las cuales tienen un contenido de proteínas, alrededor de un 20% y más. Desde el punto de vista taxonómico, es el prototipo del género *Phaseolus* y su nombre científico completo es *Phaseolus vulgaris*.

La semilla del frijol es hexalbuminosa, puede tener varias formas; cilíndrica, de riñón, esférica u otros.

Los cotiledones exhiben una estructura altamente organizada, contienen células parenquimatosas unidas por una pared celular distinta y la lamella media. Estas células contienen gránulos de almidón elípticos embebidos en una matriz proteínica consistente de cuerpos proteínicos esféricos y relativamente menores que los gránulos de almidón y están rodeados por una membrana lipoproteica.

La composición promedio aproximada del frijol se muestra en la tabla No. 2.

TABLA No. 2

COMPOSICION PROMEDIO DEL FRIJOL

COMPONENTE	PORCENTAJE
HUMEDAD	10.4
PROTEINA	22.6
GRASA	1.5
FIBRA	4.2
MINERALES	3.7
CHOS	57.6

Fuente: Aduke James, 1981. pag 196.

PROTEINAS: Las leguminosas no solo tienen relativamente grandes cantidades de proteína, también contienen un patrón de aminoácidos esenciales que complementan a los del maíz y otros granos de cereales. (*Leiner Irving E., 1977.)

LIPIDOS: La mayor fracción la representan los triglicéridos neutros y los principales ácidos grasos saturados presentes en el grano son: palmítico, esteárico, araquidónico y los ácidos grasos insaturados comunes son el oleico, linoleico y linolénico. (*Leiner Irving E., 1977.)

CARBOHIDRATOS: Estos son el mayor constituyente del frijol y en general en todas las leguminosas. Su composición varía desde azúcares simples a heteropolisacáridos complejos.

En la práctica del análisis químico que se hace con ellos, por diferencia restando a 100% la suma de los demás constituyentes (humedad, proteínas, lípidos, fibra y cenizas), que también incluye otras sustancias tales como ácidos orgánicos y lignina que no corresponden estructuralmente a este grupo, pero se los incluye debido a que forman parte de la pared celular.

Los carbohidratos de leguminosas, especialmente los monosacáridos, glucosa y fructuosa son fuentes de energía. Solamente una pequeña cantidad de los monosacáridos están presentes en forma libre y el resto se encuentra como componente de glucósidos o como unidades en varios oligosacáridos o polisacáridos. La D-glucosa, D-manosa, D-galactosa y D-fructuosa, son los monosacáridos más ampliamente distribuidos.

La glucosa es el más común y se encuentra tanto en forma libre como combinada con sustancias tales como oligosacáridos (sacarosa y rafinosa) y polisacáridos tales como almidón, celulosa y otros glucósidos importantes.

(*Leiner Irving E., 1977.)

Oligosacáridos: son polímeros de azúcar con menos de diez monosacáridos en su molécula, pueden ser reductores o no-reductores. Los oligosacáridos no reductores más abundantes son la rafinosa, estaquiosa, verbascosa y sacarosa. Estos azúcares son responsables de la producción de flatulencia en el hombre.

La celulosa es el polisacárido estructural que le imparte mayor rigidez y fuerza al grano. (*K.U. Shun et al. A.S.A. Num. 2.)

El grano es rico en calcio, alrededor de 100 mg por cada 100 g y esto varía un poco con cada especie, también contienen hierro en una cantidad equivalente a 7 mg por 100 g, sin embargo dicha leguminosa presenta también cantidades considerables de ácido fítico que pueden afectar la absorción y el aprovechamiento del calcio, mediante la precipitación de sales insolubles en el estómago y duodeno, pero aun cuando se tenga en cuenta este hecho, una ingestión diaria de 50 gramos de frijol, pueden dar una contribución

útil a las necesidades de estos elementos. Además la enzima fitasa puede contrarrestar la cantidad de este ácido cuando el frijol se somete a remojo toda la noche previa a su proceso de cocción. (*Leiner Irving E., 1977.)

FACTORES POSITIVOS PARA LA NUTRICION:

- Alto contenido de proteína.
- Alto contenido de lisina.
- Excelente proteína suplementaria para granos de cereales.

FACTORES LIMITANTES PARA LA NUTRICION:

- Factores antifisiológicos.
- Inhibidores de tripsina.
- Hemaglutininas.
- Compuestos polifenólicos.
- Factores que causan flatulencia.
- Acido fítico.

FACTORES NUTRICIONALES:

- Deficiencia en aminoácidos azufrados.
- Baja digestibilidad de proteínas.

Como ya se ha referido, las leguminosas crudas se caracterizan por la presencia de factores tóxicos llamados antinutricionales, antimetabólicos, que al darles a los animales, afectan su crecimiento e incrementan su mortalidad, los factores más conocidos son:

- Inhibidor de tripsina.
- Hemaglutininas.
- Isoflavinas.
- Saponinas.
- Glucósidos cianogénicos.
- Compuestos que producen flatulencia.
- Otros.

Los dos primeros son moléculas proteicas y se eliminan por el proceso normal de cocción, no así las demás que están formadas por estructuras químicas características, que probablemente persisten en su cocción después del cocimiento. (*Baker R.C., 1972.)

INHIBIDOR DE TRIPSINA: Es una proteína rica en cisteína y baja en metionina, de una sola cadena polipeptídica cuyo peso molecular es de 25,000 y por cada molécula de inhibidor de tripsina se bloquean 2 de tripsina, se sabe que en la soya el inhibidor de tripsina se compone de cuatro fracciones con actividad. El inhibidor de tripsina bloquea el crecimiento en ratas, baja la energía metabolizable, reduce la absorción de grasas y la digestibilidad de proteínas lo cual resulta de una baja absorción de aminoácidos y de nitrógeno. Causa hipertrofia pancreática y estimula la secreción de jugos biliares. (*Leiner Irving E., 1977.)

HEMAGLUTININAS: Son sustancias termolábiles capaces de aglutinar los glóbulos rojos de la sangre llamados fitohemaglutininas los efectos son semejantes a los del inhibidor de tripsina. (*Leiner Irving E., 1977.)

ISOFLAVONAS: Presentan actividad antitiamina, al parecer solo la parte aglicona es la que causa los efectos, no así la isoflavona glucósido. (*Leiner Irving E., 1977.)

SAPONINAS: Estas presentan efecto antinutricional solo si son consumidas a un nivel que sea tres veces mayor que la cantidad que normalmente se encuentra en el alimento. Son hidrolizadas por la microflora fecal pero nunca se introducen al torrente sanguíneo y su efecto inhibitorio de enzimas parece ser por la presencia de la parte aglicona de la saponina. (*Leiner Irving E., 1977.)

GLUCOSIDOS CIANOGENICOS: Algunas leguminosas contienen compuestos cianogénicos en forma de glucósidos que por hidrólisis ácida o enzimática, liberan ácido cianhídrico. La toxicidad de estos compuestos esta relacionada a la cantidad de ácido cianhídrico liberada. Este es eliminado con el vapor en la ebullición y las enzimas que provocan la hidrólisis son destruidas por un adecuado cocimiento. (*Leiner Irving E., 1977.)

COMPUESTOS QUE PRODUCEN FLATULENCIA: La flatulencia es uno de los principales problemas causados por las oleaginosas y leguminosas que no pueden ser digeridos por nuestro organismo ya que carecemos de la enzima alfa-galactosidasa. Que es la responsable de metabolizar estos compuestos que entran y se depositan en la parte baja del tracto intestinal, donde son atacados por bacterias que los metabolizan y forman grandes cantidades de CO₂ e hidrógeno. (*Leiner Irving E., 1977.)

5.- GENERALIDADES DEL HONGO (*Rhizopus oligosporus*).

El microorganismo esencial en la fermentación del tempeh es el hongo que pertenece al género *Rhizopus*. El número de especies que pueden completar el paso esencial para dejar a punto la soya formando una torta o pastel firme por el crecimiento del micelio, incluyen:

Rhizopus oligosporus, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus oryzae* y *Rhizopus arrhizus*. El mejor de todos ellos es el *Rhizopus oligosporus* NRRL raza 2710. (*Hesseltine C. W. 1963. Steinkraus Keith 1985.)

Las características del *R. oligosporus* son las siguientes:

1.- Habilidad para crecer rápidamente a temperaturas que van de 30°C a 42°C. El crecimiento del micelio sobre la soya es visible a las 12 horas de incubación y frecuentemente se completa entre 18 y 20 hr. Pocos hongos crecen a altas temperaturas como lo hace el *Rhizopus oligosporus*.

2.- Incapaz para fermentar sacarosa.

3.- Debe tener una alta actividad enzimática proteolítica que de como resultado la liberación de nitrógeno libre dentro de las 48 a 72 hr de haber iniciado la fermentación.

4.- Alta actividad lipolítica.

5.- Producción de un fuerte antioxidante (factor 2).

6.- Capacidad de producción de la torta típica de tempeh con las características de aroma y sabor deseadas.

7.- Capacidad para crecer en trigo o en otro cereal como sustrato sin producir una cantidad perceptible de ácidos orgánicos que pudieran causar al producto rancidez. (*Hesseltine C. W. 1963. Steinkraus Keith 1985.)

Si el tempeh se utiliza como fuente esencial de vitamina B₁₂ en la dieta vegetariana, se debe tener presente a la bacteria *Klebsiella pneumoniae* para que exista la fermentación, éste microorganismo se ha encontrado como predominante en todos los tempehs que se han estudiado y es el único por las siguientes razones:

a.- No estropea el tempeh.

b.- La bacteria crece en un rango de temperatura de 15°C a 45°C, temperatura óptima para la máxima producción de vitamina B₁₂ aparentemente 37°C.

c.- El crecimiento de la bacteria no interfiere aparentemente con el crecimiento del hongo *Rhizopus oligosporus*.

d.- La bacteria crece a un pH por abajo de 3.5, ésta acidificación en la soya antes de la fermentación ocurre en forma natural durante el remojo o puede agregarse algún ácido al medio y no interfiere con el desarrollo del hongo o de la bacteria.

e.- La bacteria produce como máximo 150 mg de vitamina B₁₂ por gramo de soya como sustrato.

(*Hesseltine C. W. 1963. y Steinkraus Keith 1985.)

5.1.- CARACTERISTICAS QUE LE CONFIERE AL PRODUCTO Y CAMBIOS BIOQUIMICOS QUE SE MANIFIESTAN DURANTE LA FERMENTACION.

El hongo crece rápidamente durante la fermentación del tempeh; la temperatura de la masa fermentada generalmente aumenta de 5°C a 7°C sobre la temperatura de la incubadora.

Los sólidos solubles totales se incrementan aproximadamente de 13% a 28% durante 72 hr de fermentación. El nitrógeno soluble se incrementa desde 0.5% a 2.5% en tanto que el nitrógeno total permanece relativamente constante. El pH al inicio es alrededor de 5.0 en el remojo, cuando se cuecen los frijoles se incrementa progresivamente hasta 7.0 y el amoniaco libre se nota en las siguientes etapas de fermentación. (*Steinkraus Keith 1985.)

Durante la fermentación, el hongo digiere la matriz entre las células de la soya, esto consiste en que los cotiledones de los frijoles se van uniendo entre si por el micelio que el hongo produce haciéndolos más resistentes a la fractura. Cuando es sometido a un tratamiento mecánico por el batido o mezclado las células quedan intactas mientras que las células de los frijoles crudos son fácilmente susceptibles a la fractura. (*Steinkraus Keith 1985.)

5.1.1. CAMBIOS EN LIPIDOS:

El frijol de soya crudo contiene solo el 1% de ácidos grasos libres del total de la grasa que contiene. En el tempeh después de 48 hr de fermentación el 30% del total de la grasa neutra son ácidos grasos libres, esto se debe a la gran cantidad de enzimas lipolíticas que el hongo produce durante la fermentación.

La grasa neutra de la soya se compone de ácido palmítico, esteárico, oléico, linoléico y linolénico, predominando el linoléico, encontrándose linoléico y linolénico ausentes en forma libre al principio de la fermentación. (*Steinkraus Keith 1985.)

5.1.2. CAMBIOS EN CARBOHIDRATOS:

El frijol de soya contiene 34% de carbohidratos, los cuales principalmente son almidones y azúcares, siendo la sacarosa la de mayor concentración seguido por estaquiosa, pentosas, galactosa y rafinosa.

En el proceso de remojo y cocimiento durante la elaboración del tempeh, la rafinosa es reducida en un 52%, la estaquiosa en un 49% y la sacarosa en un 59%.

Durante las primeras 48 hr de la fermentación la rafinosa se mantiene constante, sin embargo la estaquiosa disminuye en otro 59%. El decremento de los oligosacáridos son una de las razones de la buena digestibilidad del tempeh, con la consecuencia de la eliminación de los problemas de flatulencia que existen en el frijol de soya crudo.

(*Steinkraus Keith 1985.)

5.1.3. CAMBIOS EN AMINOACIDOS:

La lisina y metionina disponibles demostraron un decremento durante el curso de la fermentación de tempeh; lisina decrece 10% y llega hasta 25% después de la fermentación por 36 hr y 60 hr respectivamente y metionina decrece del 3% al 10% con el mismo tiempo de fermentación. Triptófano y alanina se incrementan alrededor de 20% y fenilalanina decrece alrededor del 20%. La cantidad de aminoácidos libres se incrementa a medida que progresa la fermentación, este cambio en los aminoácidos esenciales no se manifiesta completamente a 24 hr de fermentación.

(*Steinkraus Keith 1985.)

5.1.4. ENZIMAS PRODUCIDAS POR EL HONGO

Rhizopus oligosporus.

La especie *Rhizopus oligosporus* produce dos sistemas de enzimas proteolíticas y lipolíticas una con la actividad óptima a un pH=3.0, (proteasa) y la otra con un pH=5.5 (lipasa), pero tiene máxima actividad a temperaturas de 50°C a 55°C. La máxima actividad proteolítica es lograda de 72 hr a 96 hr a 32°C. La producción de proteasa ácida por el *R. oligosporus* se obtiene en salvado de trigo a 25°C durante 4 días con una humedad del 50% en el sustrato.

*Steinkraus Keith 1985.

5.1.5. CAMBIOS EN EL VALOR NUTRITIVO DE LAS PROTEINAS DEL TEMPEH.

Gyorgy (1961) reportó que el valor nutritivo de un lote de tempeh de frijol de soya sénéca secado y congelado, fue equivalente a la leche descremada y mucho más alta que a la soya no fermentada. Desafortunadamente la soya sénéca no está disponible comercialmente y este estudio no se repitió.

Tempeh preparado de frijol de soya clark a diferentes tiempos de fermentación 0, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 hr se les dio a las ratas (tempeh con 10% de soya); se vio que tenían un buen desarrollo, pero a medida que el tiempo de la fermentación era muy prolongado, las ratas lo encontraron menos apetecible y se demostró por la cantidad de alimento consumido. Examinado por el promedio de peso ganado diario sugiere que el valor nutritivo del tempeh se fue reduciendo con el incremento del tiempo de la fermentación.

Zamora y Veum(1979), reportaron un incremento en el promedio en peso diario de las ratas alimentadas con soya fermentada con el *Rhizopus oligosporus*, comparado con el peso diario ganado por las ratas cuya dieta fue soya a la cual se le dio el mismo tratamiento térmico (121°C por 30 minutos), pero no se fermentó.

La soya fermentada tiene un mayor valor biológico en la utilización neta de la proteína, en comparación con la soya no fermentada. Si se somete el tempeh a un freído por 5 min a 196°C se causa un decremento en la calidad de la proteína.

(*Steinkraus Keith 1985.)

5.1.6. CAMBIOS EN LAS VITAMINAS Y OTROS FACTORES RELATIVOS A LA NUTRICION.

Ensayos microbiológicos indicaron que el contenido de vitamina en el tempeh es alto en comparación con el inicio de la fermentación, en ciertos casos y bajos en otros.

La riboflavina se incrementa al doble, la niacina se incrementa 7 veces y la cantidad de la vitamina B₁₂ se incrementa 33 veces. La tiamina desafortunadamente decrece, el ácido pantoténico fue reportado sin cambio, la piridoxina se incrementa de 4 a 14 veces y la niacina de 2 a 5 veces en tempeh secado al sol, como se muestra en la tabla No. 3.

Biotina y folato se incrementan 2.3 y 4.5 veces respectivamente. El incremento en riboflavina, niacina, piridoxina y vitamina B₁₂ es considerado nutricionalmente importante. En el mundo el consumidor busca la vitamina B₁₂ en leche y carnes en tanto que los vegetarianos usualmente buscan alternativas en las fuentes de vitamina B₁₂, o frecuentemente la vitamina en cápsula. El tempeh no solo cumple como un sustituto de la carne por su alto contenido de proteína si no que también como una fuente potencial de vitamina B₁₂.

TABLA No. 3

CAMBIOS EN LAS VITAMINAS EN EL TEMPEH

VITAMINA	EN FRIJOL DE SOYA POR GRAMO	EN EL TEMPEH POR GRAMO
Riboflavina	3.0 mg	7.0 mg
Ac. pantoténico	4.6 mg	3.3 mg
Tiamina	10.0 mg	4.0 mg
Niacina	9.0 mg	60.0 mg
B ₁₂	0.15 ng	5.0 ng

Fuente: *Steinkraus Keith H., 1985 pag 40.

Los valores de peróxidos encontrados en los lípidos extraídos por el método soxhlet en el tempeh de frijol de soya fueron muy bajos de 0% a 1.1%, sin embargo en las muestras de soya almacenada en las mismas condiciones que el tempeh (deshidratado, pulverizado, a temperatura ambiente) el rango de peróxidos encontrado fue altísimo entre 18.3% y 201.9%. (*Steinkraus Keith 1985.)

Los antioxidantes producidos durante la fermentación del tempeh por el hongo es un atributo que le imparte valor nutritivo ya que estabiliza los aceites. Los tempehs almacenados no desarrollan rancidez por el contenido de 6,7,4,-trihidroxy-isoflavina (factor2) que es el que produce el hongo. El antioxidante no es efectivo en la prevención de la autooxidación de aceite de soya y harina de soya. (*Gyorgy P. K., Murata. 1974.)

5.1.7. PRODUCCION DE ANTIBIOTICO POR (*Rhizopus oligosporus*).

Wang et al (1969) reportaron que el *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 produce un antibiótico activo contra bacterias gram + incluyendo *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. El único microorganismo insensible al antibiótico es el gram - *Klebsiella pneumoniae*, que se encuentra en todos los tempers comerciales y es la responsable de la actividad de la vitamina B₁₂, y no existe evidencia de inhibición del hongo por parte de ésta bacteria. (*Steinkraus Keith., 1985. Hesseltine C. W., 1963. Murata Sugimoto Y., 1974.)

5.2 OTRAS ESPECIES UTILIZADAS.

Rhizopus achlamidosporus.

Rhizopus formosaensis.

Rhizopus chinesis.

Rhizopus cohnii.

III.- OBJETIVOS.

1.-Implementar el crecimiento del *Rhizopus oligosporus* en la producción de tempeh empleando sustitutos del frijol de soya por dos variedades de frijol Mexicano de consumo nacional; frijol negro y frijol bayo *Phaseolus vulgaris*.

2.-Evaluar las diferencias en los resultados bromatológicos entre el tempeh y los productos elaborados con frijol negro y bayo.

3.-Estimar el contenido en sus elementos nutritivos de los productos obtenidos en la elaboración de tempeh, que refieren Steinkraus, Hesseltine, Leiner.

4.-Presentar alternativas de preparación del producto fermentado con *Rhizopus oligosporus* acordes a los hábitos alimentarios en México para su posible consumo.

IV.- MATERIALES Y METODOS.

1.- SELECCION DE LA MATERIA PRIMA.

Se compró 10 kilogramos de cada grano que se manejó: frijol negro, frijol bayo y frijol de soya. De un mismo lote, se procedió a limpiarlo, eliminando impurezas constituidas básicamente por grano picado, grano con manchas y grano con alteraciones en el color sobre la superficie del grano; también se eliminaron materiales extraños como piedras, polvo basura y otros granos procurando que fuesen de igual tamaño dando como resultado granos aptos para la fermentación, es decir sin daño mecánico, con la misma forma (ovalada para los frijoles y redonda para la soya) así como con la superficie lisa y el embrión blanco. Todo esto se realizó en forma manual con ayuda de cribas.

1.1.- ALMACENAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA:

Una vez seleccionado el grano se procedió a almacenarlo en recipientes de plástico herméticamente sellados conservándolos en condiciones frescas y secas a temperatura ambiente para evitar infestaciones por insectos y alteraciones en el grano.

La cepa de *Rhizopus oligosporus* fue adquirida en el cepario del CINVESTAV del I.P.N.

2.- MANTENIMIENTO DE LA CEPA Y REACTIVACION DEL *Rhizopus oligosporus*.

La cepa de *Rhizopus oligosporus* se resembró en agar papa dextrosa, para prepararlo se siguieron las indicaciones que se sugieren en la etiqueta del frasco: Agregar 39 g en 1 litro de agua recién destilada completamente desmineralizada; primero se deja rehidratar el agar durante 15 minutos y después se pasa por el mechero con agitación constante hasta disolverlo y que quede completamente transparente.

Después se vierten 10 ml. del agar en cada tubo; se esterilizan a 121°C durante 15 minutos, y se cierran perfectamente bien. Los tubos se ponen sobre una superficie inclinada para que solidifique el medio, una vez ocurrido esto se procede a la resiembra, tomando con una aza previamente esterilizada una muestra de *Rhizopus oligosporus* y sembrándola en cada tubo en forma individual del cultivo original.

Los tubos se incuban a 32°C durante 3 o 4 días dependiendo del crecimiento del *Rhizopus oligosporus* y después se conservan en refrigeración a 7°C.

Esto se repite cada 3 meses.

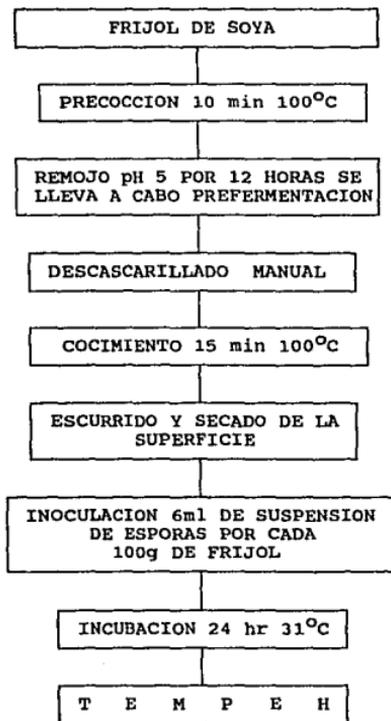
3.- ADAPTACION DEL METODO DE ELABORACION DE TEMPEH DE SOYA

- Probar la técnica de elaboración
- Confirmar la técnica de elaboración
- Evaluación de la formación del tempeh

Para ésta etapa se propone trabajar con el método que sugiere Steinkraus Keith H., 1985. Probando la técnica de elaboración y confirmándola, y en caso necesario hacer los ajustes pertinentes. Finalmente se evaluará la calidad del tempeh con respecto a la formación de la torta. (Compacta y unida por el micelio del moho).

DIAGRAMA No. 1

IMPLEMENTACION PARA EL LABORATORIO



Fuente: modificación e implementación en el laboratorio
F.E.S.- Cuautitlán. Keith H Steinkraus, 1985 pag 14.

3.1. CONFIRMACION DE LA TECNICA DE ELABORACION.

Durante el desarrollo del tempeh, Steinkraus propone algunos rangos en las variables que se pueden manejar para la elaboración de este, sobre los cuales se tuvieron que implementar algunos para obtener mejores resultados.

Lo primero que se hizo fue evaluar el proceso de precocción durante la elaboración del tempeh, Steinkraus sugiere que se realice en un tiempo que va de 15 a 30 minutos, desafortunadamente el tiempo empleado en la precocción era muy elevado ya que después del remojo quedaba demasiado blando el tejido y el embrión se desprendía con mucha facilidad durante el descascarillado, por lo tanto se experimentaron tiempos de precocción que fueron de 5, 10 y 15 minutos. Hasta establecer el tiempo que brindo mejores resultados en el descascarillado

Después, con el propósito de obtener una torta mejor formada, lo que significa que el microorganismo se desarrolla óptimamente en la superficie de los cotiledones dando además un aspecto homogéneo al producto final, se manejaron tres valores de pH que fueron 4.5, 5.0 y 5.3.

En lo que se refiere al tiempo de remojo, Steinkraus sugiere que se haga toda la noche sin dar un tiempo exacto. Para el caso de su implementación en el laboratorio se procedió a evaluar diferentes tiempos que fueron 10 hr, 12 hr y 14 hr, . Tomando en cuenta el tiempo que favoreciera mas la formación de la torta compacta y unida por el micelio del hongo.

Con lo que respecta al tiempo de cocción Steinkraus refiere que se realice durante 30 minutos a 100°C, pero la apariencia del frijol es mala ya que éstos quedan completamente deshechos, por tal razón se decidió disminuir el tiempo de cocción trabajando con 3 tiempos que fueron: 10 min, 15 min y 20 min., de tal manera que los cotiledones queden enteros y le den una mejor apariencia al producto final.

Para el caso de la inoculación se utilizó una suspensión de esporas que se preparó del cultivo original con agua desmineralizada y esterilizada, se utilizaron 6 ml por cada 100 g de frijol precocado, remojado y deshollejado obteniéndose muy buenos resultados en la formación del tempeh.

En el período de incubación Steinkraus sugiere que sea de 20 a 24 hr a una temperatura que va desde 25°C hasta 37°C. En la implementación que se realizó a nivel laboratorio el tiempo que se utilizó fue de 24 hrs a una temperatura de 31°C dando resultados satisfactorios. Para llevar a cabo esta etapa fue necesario cubrir los cotiledones ya inoculados con hojas de plátano o simplemente introducirlos en bolsas de polietileno previamente perforadas para que se formasen los pasteles de tempeh. En este caso particular se utilizaron las bolsas de polietileno.

3.2. EVALUACION DE LA FORMACION DEL TEMPEH.

En cuanto a la formación de la torta del tempeh, esta debe ser compacta y unida por el micelio del hongo, con un aspecto blanco y algodonoso que produce el hongo, nunca debe ser floja y quebradiza ya que produce un tempeh de mala calidad. El color del micelio debe ser blanco y de ser posible sin puntos negros ya que éstos indican la presencia de esporas, dando un mal aspecto al producto, sin embargo esto se puede controlar con el envase que se utilice ya que si el acceso de oxígeno no es suficiente se obtiene un mal desarrollo del hongo dando como resultado una torta quebradiza por falta de micelio entre los frijoles, por el contrario si la entrada de oxígeno es demasiada se promueve la formación de esporas y el oscurecimiento del micelio en el producto.

4.- ADAPTACION DEL METODO DE ELABORACION DE TEMPEH EN EL FRIJOL NEGRO Y FRIJOL BAYO.

4.1. -CAMBIOS EN LA TECNICA Y CANTIDAD DE INOCULO.

Una vez confirmada la técnica de la elaboración del tempeh en el frijol de soya se procede a trabajar con el frijol negro y frijol bayo (Diagrama-2), para estimar si existen cambios en la técnica de elaboración, así como si la cantidad de inóculo (6 ml de esporas en suspensión por cada 100 g de frijoles deshollejados y remojados), es suficiente tomando en cuenta que se trata de otra materia prima y que se está implementando en la elaboración del tempeh.

Se realizaron también otras pruebas incrementando la cantidad de inóculo, pero los resultados mostraron que no era necesario agregar una mayor cantidad de esporas en suspensión.

DIAGRAMA No. 2

IMPLEMENTACION PARA EL LABORATORIO



Fuente: Modificación e implementación en el laboratorio F.E.S.- Cuautitlán. Keith H. Steinkraus, 1985 pag 14.

5.- TOMA DE MUESTRA:

Una vez acondicionada la materia prima se procede a tomar una muestra al azar del lote, mediante un cuarteo, 200 g de cada frijol para realizar los análisis bromatológicos y 250 gr para la elaboración del tempeh de frijol de soya por cada evento, 250 g de frijol negro y 250 g de frijol bayo para la elaboración del tempeh.

5.1.- PREPARACION DE LA MUESTRA:

5.1.1.- MUESTRA PARA EL ANALISIS DE LABORATORIO:

El análisis de la materia prima se realizó para cada uno de los frijoles con cáscara y sin cáscara, esto debido a que el producto se elabora solo con los cotiledones y la cáscara es eliminada, se tomaron 200 g de cada grano se molieron perfectamente bien en un molino de cuchillas, y se guardaron en frascos de vidrio perfectamente sellados, para poder tomar posteriormente la muestra para cada uno de los análisis.

Para la realización de los análisis de la materia prima sin cáscara se tomaron 200 g de cada una de las muestras de frijol, se remojaron en exceso de agua a las condiciones que establece el proceso de elaboración del tempeh como son: pH=5.0 durante 12 horas, al cabo de éstas se procedió a un descascarillado manual, posteriormente se secaron los cotiledones en la estufa a 40°C durante 36 horas hasta una humedad del 8%, finalmente se molieron en un molino de cuchillas hasta un tamaño de partícula de malla 40, se guardaron en un frasco de vidrio perfectamente sellado.

Para analizar las muestras de tempeh de frijol de soya, tempeh de frijol negro y tempeh de frijol bayo, una vez obtenidos éstos, se pusieron a secar en la estufa a 40°C durante 36 horas hasta una humedad del 8%, posteriormente se redujeron de tamaño en un molino de cuchillas hasta un tamaño de partícula de malla 40 y se guardaron cada una de las muestras por separado en frascos de vidrio herméticamente sellados.

6.- DETERMINACION DE COMPONENTES QUIMICOS A LA MATERIA PRIMA.

FRIJOL DE SOYA, FRIJOL NEGRO Y FRIJOL BAYO.

Pruebas de:

*Humedad.

*Proteínas.

*Grasa.

*fibra cruda.

*Minerales. Y

*CHOS.

**Ver apéndice 2.

Se realizaron las determinaciones a la materia prima entera y sin cáscara respectivamente. El producto se elabora a partir de materia prima sin cáscara. Los análisis se realizaron por triplicado.

7.- DETERMINACION DE COMPONENTES QUIMICOS

**AL TEMPEH DE FRIJOL DE SOYA, TEMPEH DE FRIJOL NEGRO
Y TEMPEH DE FRIJOL BAYO.**

Pruebas de:

*Humedad.

*Proteínas.

*Grasa.

*Fibra cruda.

*Minerales. Y

*CHOS.

****Ver apéndice 2.**

La determinación de los componentes se realizaron para tempeh de frijol de soya, tempeh de frijol negro y tempeh de frijol bayo, por triplicado.

8.- ESTIMACION NUTRICIONAL QUE PERMITAN ACLARAR LOS SIGUIENTES PUNTOS.

- *Proteínas.
- *Peróxidos.
- *Carbohidratos.
- *Grasa.
- *Vitaminas.
- *Antioxidantes.
- *Antibiótico.

Se realizó una revisión en base a los siguientes autores Baker R. C., Gyorgy P. K. Murata., Haytowitz D., Hesseltine C. W., Murata y Sugimoto., Shurfleff W. A., y Steinkraus K. H. con la finalidad de fortalecer con principios las manifestaciones positivas que se observan en el tempeh de frijol de soya, y que también puedan suponerse y manifestarse en el tempeh elaborado con frijoles negros y frijoles bayos.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

9.- ELABORACION DE PRODUCTOS CON CARACTERISTICAS CULINARIAS
DE LA COCINA MEXICANA

Se elaboraron distintos productos en base a las características culinarias de la población para hacer más factible su consumo ya que el producto es de uso potencial y así tener otra alternativa de consumo del frijol.

Estas variantes se lograron incorporando en el tempeh de frijol negro y tempeh de frijol bayo los diferentes condimentos en forma de salsa, una de chile guajillo y otra de chile pasilla, en la cual se dejaron en reposo los diferentes temphehs.

Así se obtuvieron cuatro productos:

Tempeh de frijoles negros con chile guajillo.

Tempeh de frijoles negros con chile pasilla.

Tempeh de frijoles bayos con chile guajillo.

Tempeh de frijoles bayos con chile pasilla.

Empleandose para tal efecto las siguientes formulaciones:

Producto Tempeh en Salsa

Tempeh (de frijol negro o frijol bayo).

Salsa de chile guajillo o

Salsa de chile pasilla.

Aceite vegetal.

Salsa de chile guajillo y/o pasilla.

100 g chile guajillo o pasilla.

20 g de ajo.

25 g de sal.

40 g de cebolla.

Procedimiento.

Elaboración de la Salsa

Cocer durante 10 minutos a ebullición el chile en 200 ml de agua, licuar todos los ingredientes juntos.

Procedimiento.

Elaboración de Tempeh en Salsa

Se coloca en un recipiente la salsa, se sumergen los tempes en ésta, dejándolos reposar durante 5 - 10 minutos. Freír durante 3 minutos a 120°C.

**9.1.- PRUEBA DE ACEPTACION DEL PRODUCTO PARA CONSUMIDORES
POTENCIALES.**

Se procedió a realizar la prueba de aceptación por parte de los consumidores potenciales del producto, es decir por parte el público en general.

Esta prueba se realizó con gente de un mercado local así como también gente de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán no importando el sexo ni la edad de los jueces. Esta prueba consistió en evaluar de acuerdo con un criterio subjetivo-personal, si la muestra presentada es aceptable o rechazable para su consumo.

Para tal efecto se elaboró la siguiente hoja de respuestas en donde cada sujeto responderá de acuerdo con su criterio personal.

La prueba se llevó a cabo con 50 personas.

PRUEBA DE ACEPTACION DEL TEMPEH

HOJA DE RESPUESTAS:

Nombre: _____ Fecha: _____.

INSTRUCCIONES: Indique con una cruz (X) su aceptación al probar cada muestra de tempeh presentada.

MUESTRA	ACEPTA	SI	NO
246		_____	_____
462		_____	_____
836		_____	_____
683		_____	_____

La muestra 246 se refiere al tempeh elaborado con frijol bayo y condimentado con chile guajillo.

La muestra 462 se refiere al tempeh elaborado con frijol bayo y condimentado con chile pasilla.

La muestra 836 se refiere al tempeh elaborado con frijol negro y condimentado con chile guajillo.

La muestra 683 se refiere al tempeh elaborado con frijol negro y condimentado con chile pasilla.

V.- RESULTADOS Y DISCUSION.

1.- MANTENIMIENTO DE LA CEPA Y REACTIVACION DEL

Rhizopus oligosporus.

Como resultado de la resiembra del microorganismo se obtuvo que éste se desarrolla uniformemente y de manera satisfactoria sobre la superficie del agar dentro del tiempo que se señala en la técnica de 4 días a temperatura de 32°C, después se mantuvo en refrigeración a 7°C durante 3 meses al final de los cuales se procedió nuevamente a resembrarse.

2.- ADAPTACION DEL METODO DE ELABORACION DE TEMPEH DE SOYA.

Para la elaboración del tempeh de soya se trabajó a nivel laboratorio con el procedimiento que propone Keith H.Steinkraus 1985, método tradicional que se sigue en la elaboración del tempeh. El resultado Corroboró que fue posible que se obtuviera el tempeh.

Los cambios que se presentaron como resultado del trabajo fueron los siguientes:

Como resultado para el tiempo de precocción se encontró que fue de 10 minutos a 100°C , ya que éste brindo mejores resultados en el descascarillado obteniendose los cotiledones enteros sin el desprendimiento del embrión.

Después, con el propósito de obtener una torta mejor formada, lo que significa que el microorganismo se desarrolla óptimamente en la superficie de los cotiledones dando además un aspecto homogéneo al producto final, resultó mejor el producto a un $\text{pH}=5.0$, en comparación con los otros valores de pH en donde el producto es mas bien quebradizo y con una consistencia en la torta poco firme en contrastación con la que se obtuvo a $\text{pH}=5.0$ debido al mal desarrollo del *Rhizopus*.

En lo que se refiere al tiempo de remojo, los resultados fueron satisfactorios para el tiempo de 12 hr, ya que se pudo eliminar perfectamente bien la cascarilla del frijol. En el experimento con 10 hrs, estas no fueron suficientes ya que se dificultó un poco mas el desprendimiento de la cascarilla. Para el caso del remojo a 14 hrs, al eliminar la cascarilla esta queda demasiado suave y el embrión se desprende conjuntamente.

Para el caso del tiempo de cocción con 10 minutos no se tuvo una buena formación del tempeh ya que había zonas en donde no había crecido el *Rhizopus oligosporus*. Con 15 minutos el tempeh se desarrolló con un buen crecimiento por parte del microorganismo, finalmente para 20 minutos éste tenía una apariencia en el frijol muy similar al de 30 minutos en donde los cotiledones quedan completamente deshechos y por lo tanto se descarto el de 20 minutos.

Para el caso de la inoculación se utilizó una suspensión de esporas que se preparó del cultivo original con agua desmineralizada y esterilizada, se utilizaron 6 ml por cada 100 g de frijol precocido, remojado y deshollejado obteniéndose muy buenos resultados en la formación del tempeh.

En el período de incubación en la implementación que se realizó a nivel laboratorio el tiempo que se utilizó fue de 24 hrs a una temperatura de 31°C dando resultados satisfactorios. Para llevar a cabo esta etapa fue necesario introducir los cotiledones ya inoculados en bolsas de polietileno previamente perforadas para que se formasen los pasteles de tempeh.

Como resultado final éstos cambios propiciaron que el hongo se desarrollara lo suficientemente bien sobre la superficie de los frijoles de soya, lo que implica que el método es reproducible y factible de poder elaborar tempeh.

2.1.- TECNICA DE ELABORACION.

El procedimiento se muestra en el diagrama 1 de implementación para el laboratorio, ya con las condiciones necesarias que se manejaron durante la adaptación del método de elaboración de tempeh de frijol de soya, y con las correcciones necesarias que en conjunto fueron:

- precocción 10 min a 100°C,
- remojo a un pH=5.0 durante 12 horas,
- cocimiento durante 15 min a 100°C,
- inoculación con 6 ml de esporas en suspensión, por cada 100 g de frijol precocido, remojado y deshollejado.
- incubación 24 hr a 31°C en envases de polietileno.

Para llegar a estos resultados se realizaron varios experimentos hasta obtener el tempeh con las características deseadas, tal y como se menciona durante la etapa de adaptación del método.

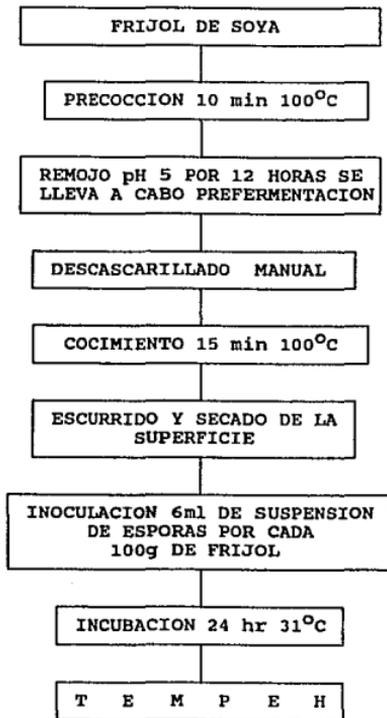
2.2.- EVALUACION DE LA FORMACION DEL TEMPEH.

En la evaluación de la formación del tempeh, Steinkraus sugiere que sea por apreciación en cuanto a la formación de la torta, y no incluyen cuadros ni gráficas de calidad.

Como resultado final después de la etapa de adaptación se obtuvieron tempehs con un buen crecimiento del hongo sobre la superficie de los cotiledones, siempre compactos y con un aspecto blanco y algodonoso del micelio, sin puntos negros que indican la presencia de esporas.

DIAGRAMA No. 1

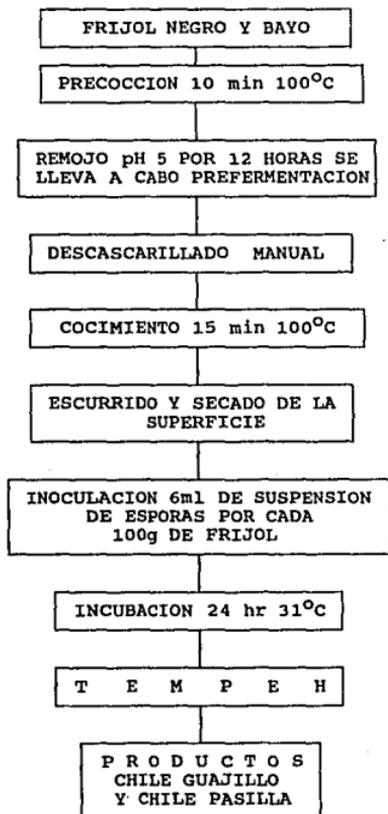
IMPLEMENTACION PARA EL LABORATORIO



3.- ADAPTACION DEL METODO DE ELABORACION DEL TEMPEH CON
FRIJOL NEGRO Y FRIJOL BAYO.

DIAGRAMA No. 2

IMPLEMENTACION PARA EL LABORATORIO



3.1.- RESULTADOS DE LA ADAPTACION EN LOS FRIJOLES NEGRO Y FRIJOLES BAYOS.

Como resultado de la implementación en el tempeh soya una vez ya producido se procedió a la implementación de la elaboración del tempeh con frijoles negros y al tempeh con frijoles bayos. Para esta etapa se trabajo con el diagrama 2 en donde se muestra la técnica empleada, trabajándose las mismas condiciones que para el caso del frijol de soya, diagrama 1, y así de esa manera estimar la posibilidad de elaborar el tempeh con éstos frijoles como una alternativa de producto reemplazando al frijol de soya. Como resultado el tempeh de frijol negro y el tempeh de frijol bayo se elaboraron bajo las mismas condiciones de proceso manifestándose los mismos atributos que se tenían para el frijol de soya:

Estos atributos fueron los siguientes:

- Torta compacta, unidos los cotiledones por el micelio del hongo.
- El color del micelio fue blanco, con aspecto algodonoso.
- Y poseían cualidades de textura iguales al tempeh frijol de soya.

En cuanto a los cambios en la técnica éstos no fueron necesarios ya que el método es reproducible dando como resultado un crecimiento del *Rhizopus oligosporus* sobre la superficie de los frijoles negros y frijoles bayos similar al del tempeh de frijol de soya.

En lo que respecta a la cantidad de inóculo, les fue agregada la misma cantidad que en el caso del frijol de soya 6 ml de suspensión de esporas por cada 100 g de frijoles precocidos, remojados y deshollejados ya que ésta es la que recomienda Steinkraus, sin ser necesario realizar algún cambio, dado que se obtuvieron buenos resultados en cuanto a la formación del micelio sobre los cotiledones durante el mismo tiempo y temperatura de incubación. En caso contrario, de no haber sido suficiente la cantidad de inóculo, se habrían obtenido partes en donde no hubiera desarrollado el hongo dando una apariencia quebradiza al producto.

Se realizaron también otras pruebas incrementando la cantidad de inóculo, pero los resultados mostraron que no era necesario agregar una mayor cantidad de esporas en suspensión.

4.- DETERMINACION DE COMPONENTES QUIMICOS A LA MATERIA PRIMA.

COMPOSICION EN % (g DE NUTRIENTE/100 g DE ALIMENTO).

CUADRO 1

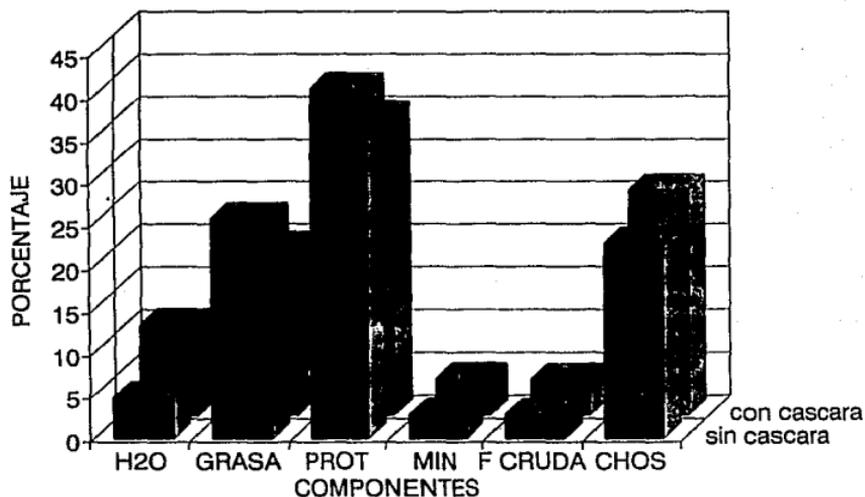
SOYA CON CASCARA	BASE HUMEDA	BASE SECA
HUMEDAD	10.6	0
GRASA CRUDA	19.6	21.9
PROTEINAS	35	38.2
CENIZAS	4.3	4.8
FIBRA CRUDA	4.2	4.7
CARBOHIDRATOS	26.3	30.3

CUADRO 2

SOYA SIN CASCARA	BASE HUMEDA	BASE SECA
HUMEDAD	4.8	0
GRASA CRUDA	25.7	27
PROTEINAS	41	43
CENIZAS	2.8	3
FIBRA CRUDA	2.8	3
CARBOHIDRATOS	22.9	24

GRAFICA No. 1

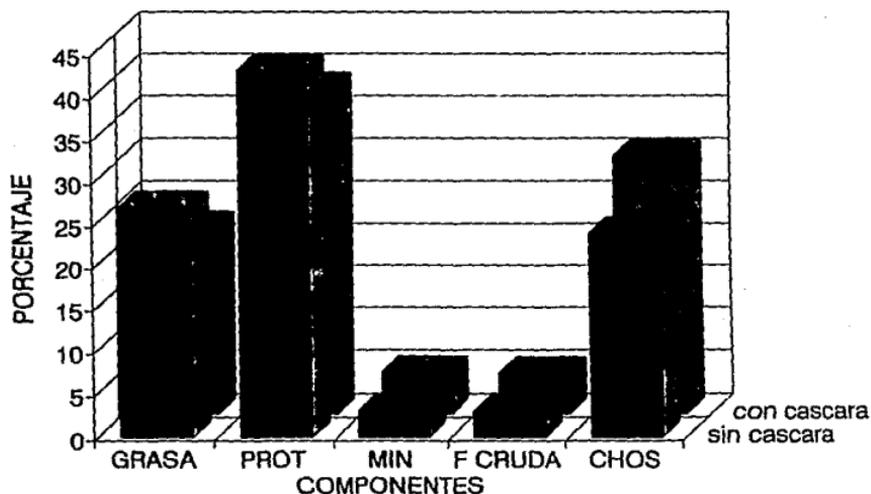
ANALISIS BROMATOLOGICO FRIJOL DE SOYA BASE HUMEDA



TESIS TEMPEH F.E.S.-CUAUTITLAN 1993.

GRAFICA No. 2

ANALISIS BROMATOLOGICO FRIJOL DE SOYA BASE SECA



TESIS TEMPEH F.E.S.-CUAUTITLAN 1993.

DETERMINACION DE COMPONENTES QUIMICOS DEL FRIJOL BAYO.

CUADRO 3

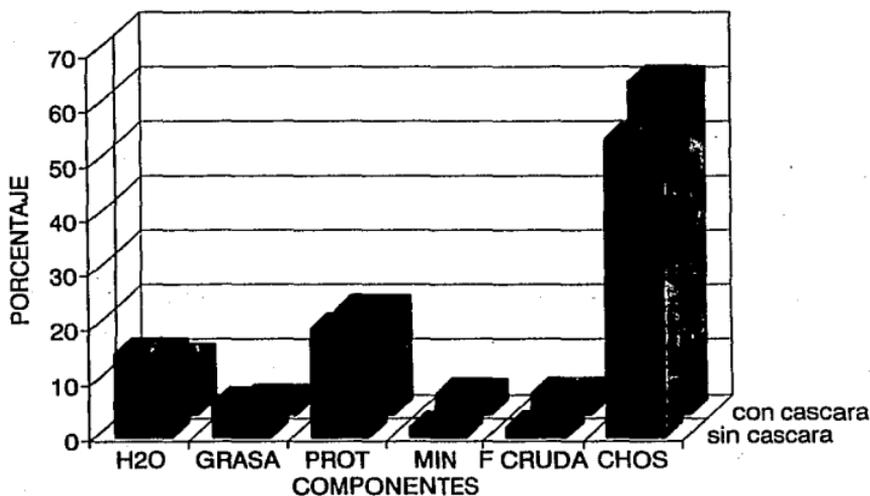
FRIJOL BAYO CON CASCARA	BASE HUMEDA	BASE SECA
HUMEDAD	10	0
GRASA CRUDA	2.6	2.8
PROTEINAS	18.94	21.1
CENIZAS	3.7	4.11
FIBRA CRUDA	3.93	4.4
CARBOHIDRATOS	60.83	67.6

CUADRO 4

FRIJOL BAYO SIN CASCARA	BASE HUMEDA	BASE SECA
HUMEDAD	15.28	0
GRASA CRUDA	6.37	7.5
PROTEINAS	19.85	23.4
CENIZAS	1.98	2.3
FIBRA CRUDA	1.94	2.2
CARBOHIDRATOS	54.57	64.4

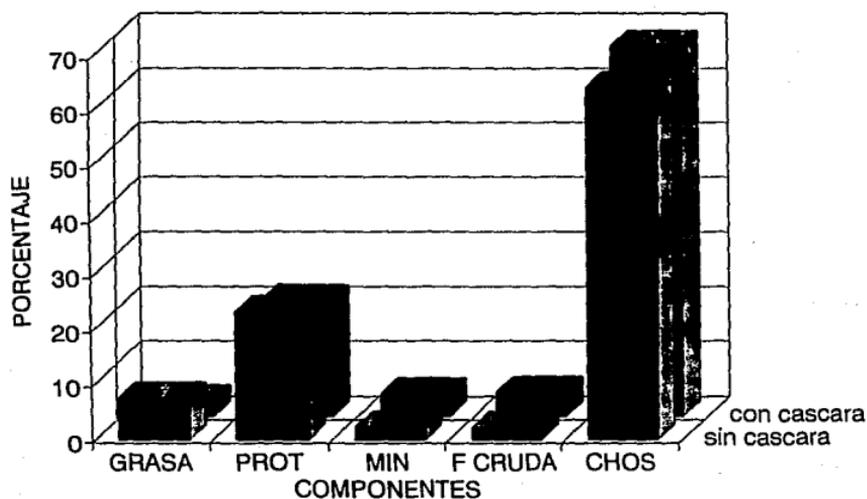
GRAFICA No. 3

ANALISIS BROMATOLOGICO FRIJOL BAYO BASE HUMEDA



GRAFICA No. 4

ANALISIS BROMATOLOGICO FRIJOL BAYO BASE SECA



DETERMINACION DE COMPONENTES QUIMICOS AL FRIJOL NEGRO.

CUADRO 5

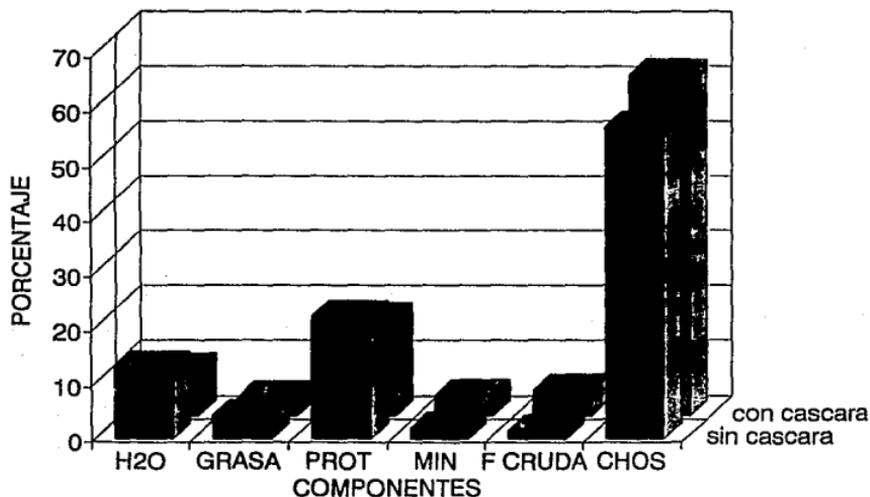
FRIJOL NEGRO CON CASCARA	BASE HUMEDA	BASE SECA
HUMEDAD	8.5	0
GRASA CRUDA	3.4	3.7
PROTEINAS	17.85	19.9
CENIZAS	3.89	4
FIBRA CRUDA	4.72	5.1
CARBOHIDRATOS	62.04	67.8

CUADRO 6

FRIJOL NEGRO SIN CASCARA	BASE HUMEDA	BASE SECA
HUMEDAD	13.07	0
GRASA CRUDA	4.39	6.1
PROTEINAS	22.7	25.6
CENIZAS	3.7	2.3
FIBRA CRUDA	1.55	1.8
CARBOHIDRATOS	53.75	65.3

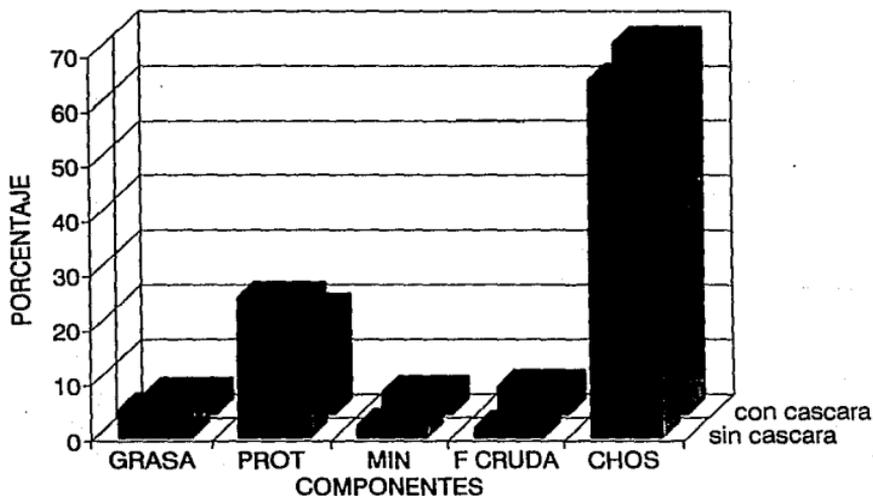
GRAFICA No. 5

ANALISIS BROMATOLOGICO FRIJOL NEGRO BASE HUMEDA



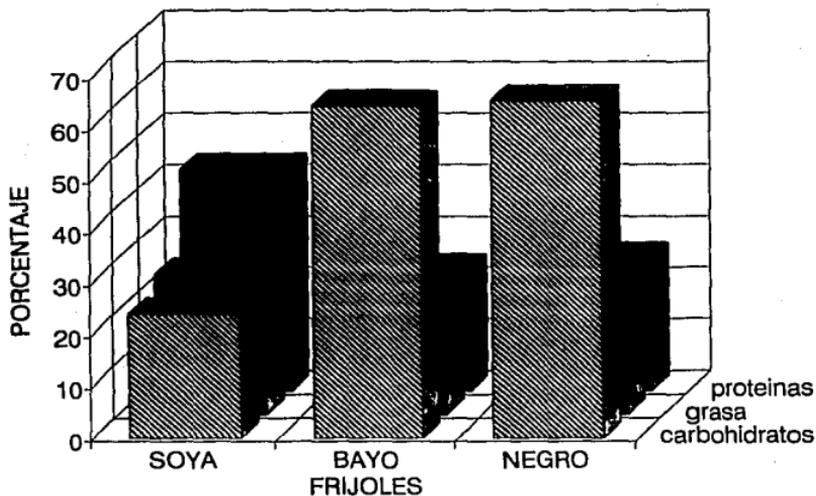
GRAFICA No. 6

ANALISIS BROMATOLOGICO FRIJOL NEGRO BASE SECA



GRAFICA No. 7

ANALISIS BROMATOLOGICO SOYA NEGRO BAYO BASE SECA



4.- DETERMINACION DE COMPONENTES QUIMICOS A LA MATERIA PRIMA

Los valores en los cuadros de resultados están expresados en % de cada componente por cada 100 gramos de alimento.

Los resultados de la materia prima se presentan en el cuadro 1 y en las gráficas 1 y 2, frijol de soya con cáscara, se puede notar que el valor mas alto es para proteínas seguido de carbohidratos.

Lo que corresponde con la bibliografía consultada.

Comparando estos valores con los del cuadro 2, ambos en base seca, se ve un aumento en proteína y grasa cruda, disminuyendo en carbohidratos, fibra cruda y minerales; estos cambios son debido principalmente a que en la cáscara del frijol de soya se encuentran parte de estos componentes y al ser eliminada estos se ven disminuídos.

Este mismo fenómeno se puede observar en las gráfica 2 donde se nota claramente la tendencia de lo anteriormente expuesto. La pérdida en carbohidratos es del 20%, y para minerales y fibra cruda de un 37%.

Como resultado de los análisis efectuados para el frijol bayo, ver cuadros 3 y 4, tanto para los casos; con cáscara y sin cáscara.

Al realizar la comparación con los datos bibliográficos se puede observar que concuerdan con éstos.

En el frijol bayo el componente mas alto son los carbohidratos, así lo muestra el cuadro 4 seguido por las proteínas y grasa. Comparado ambos cuadros de resultados, 3 y 4, se nota que al someter al proceso de descascarillado el frijol se incrementan los porcentajes de grasa cruda y proteínas y disminuyen los carbohidratos, fibra cruda y minerales. Aquí se manifiesta de nuevo el mismo comportamiento que para el caso del frijol de soya. En este caso los carbohidratos bajan en un 4.7%, y la fibra cruda y minerales en un 47%.

Las gráficas 3 y 4, muestran con mayor claridad el incremento y descenso de estos componentes.

Finalmente para el caso del frijol negro se mencionan los resultados analíticos en los cuadros 5 y 6, en donde podemos observar que el componente de mayor valor en base seca son los carbohidratos seguido por el valor de proteínas, comparando estos resultados después del descascarillado vemos que se manifiesta un aumento en proteínas y grasa cruda, sin embargo se tiene un decremento en los valores de carbohidratos en un 3.6% y de un 55% en fibra cruda y minerales.

Si se observan las gráficas 5 y 6, se ve claramente lo que esta ocurriendo.

Si observamos la gráfica 7 en donde se muestran conjuntamente las tendencias de proteína, grasa cruda y carbohidratos para los tres tipos de frijol, vemos que hay una gran diferencia en dos de ellos con respecto a la soya, materia prima con la que se elabora tradicionalmente el tempeh, de ahí la importancia de su implementación en la elaboración del tempeh con los otros frijoles y estimar la factibilidad de la producción del tempeh sustituyendo al frijol de soya como materia prima. Como puede notarse en la gráfica el porcentaje de proteína para el frijol de soya es dos veces mayor comparado con los frijoles bayos y frijoles negros; en lo que respecta a la grasa cruda se observa que es tres veces mayor en comparación con los frijoles bayos y negros; finalmente los carbohidratos del frijol de soya se encuentran en un 50% por abajo del valor del frijol bayo y frijol negro.

Cabe mencionar que debido a la alta capacidad lipolítica y proteolítica del hongo, era de esperarse que se tuvieran algunos problemas en su crecimiento sobre este nuevo sustrato, pero los resultados mostraron un buen crecimiento y desarrollo del hongo dando una nueva alternativa en la producción del tempeh utilizando para tal efecto otro tipo de materias primas.

Como parte final de todo este análisis podemos decir que se tienen cambios en algunos de los componentes del frijol, por ejemplo en la etapa de remojo es en donde se pueden estar solubilizando algunos de estos componentes como serían algunos carbohidratos y minerales, también durante el proceso de descascarillado por la separación de la cascarilla. En el caso de frijol de soya se manifiesta una pérdida mayor en cuanto al contenido de fibra cruda y minerales, aunque también lo tienen los frijoles bayos y negros y en lo que respecta a carbohidratos se ve que esta pérdida es un poco mayor para el caso de el frijol de soya.

5.- DETERMINACION DE COMPONENTES QUIMICOS AL TEMPEH
COMPOSICION EN % (g DE NUTRIENTE/100 g DE ALIMENTO).

CUADRO 7

TEMPEH FRIJOL SOYA	BASE HUMEDA	BASE SECA
HUMEDAD	9.4	0
GRASA CRUDA	27.7	30
PROTEINAS	46	50.8
CENIZAS	2.6	2.9
FIBRA CRUDA	2.9	3.2
CARBOHIDRATOS	11.7	12.8

CUADRO 8

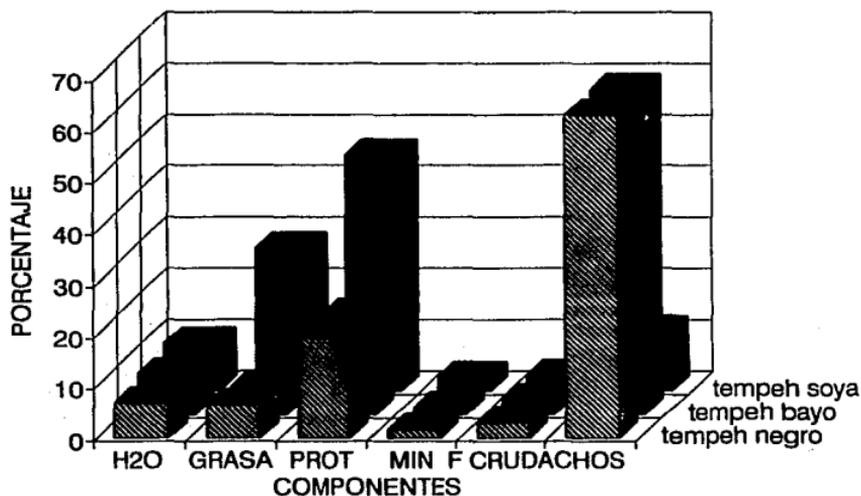
TEMPEH FRIJOL NEGRO	BASE HUMEDA	BASE SECA
HUMEDAD	7.79	0
GRASA CRUDA	5.27	5.71
PROTEINAS	18.52	21.16
CENIZAS	1.29	1.39
FIBRA CRUDA	2.72	2.94
CARBOHIDRATOS	63.41	68.7

DETERMINACION DE COMPONENTES QUIMICOS AL TEMPEH.**CUADRO 9**

TEMPEH FRIJOL BAYO	BASE HUMEDA	BASE SECA
HUMEDAD	6.74	0
GRASA CRUDA	6.33	6.78
PROTEINAS	19.44	20.84
CENIZAS	1.65	1.76
FIBRA CRUDA	2.9	3.1
CARBOHIDRATOS	82.94	67

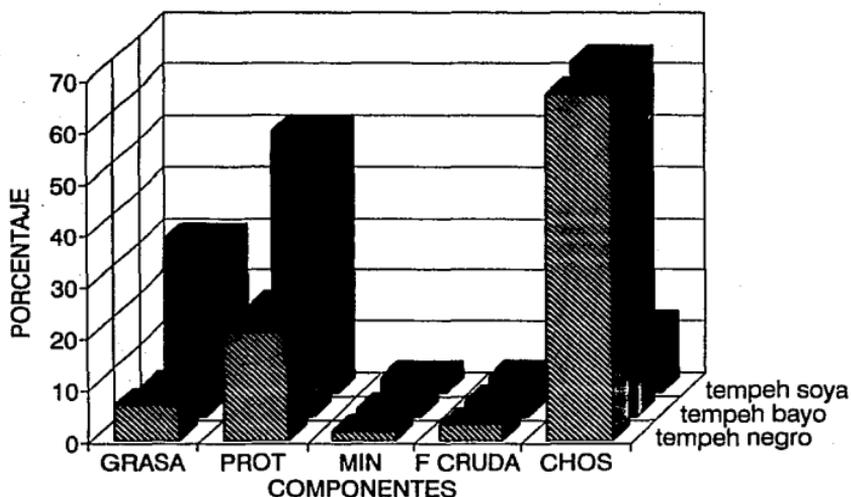
GRAFICA No. 8

ANALISIS BROMATOLOGICO TEMPEH BASE HUMEDA



GRAFICA No. 9

ANALISIS BROMATOLOGICO TEMPEH BASE SECA



5.- DETERMINACION DE COMPONENTES QUIMICOS AL TEMPEH.

Los resultados de los análisis realizados al tempeh de frijol de soya, tempeh de frijol negro y tempeh de frijol bayo se encuentran expresados en los cuadros 7, 8 y 9 así como en las gráficas 8 y 9 respectivamente: si se observan y se comparan se ve claramente que en el tempeh de frijol de soya su componente mayoritario serían las proteínas seguido por la grasa cruda y finalmente por los carbohidratos. Este mismo hecho se presenta los tempehs de frijol bayo y frijol negro con la excepción de que los carbohidratos en éstos son superiores en cinco veces al contenido en el tempeh de soya. Los valores en fibra cruda y minerales son similares.

Debido al alto contenido en proteína el tempeh de soya, es un alimento nutritivo bajo en colesterol, el contenido de grasa es altamente insaturada y finalmente por el contenido tan bajo en carbohidratos lo hace un alimento ideal para las personas diabéticas.

Comparativamente los tempehs elaborados con frijol bayo y frijol negro respectivamente también son mayoritarios en proteínas y grasa pero después del contenido en carbohidratos, lo que lo hace diferente del tempeh de soya que es meramente proteico de estos otros tempehs que pudiesen considerarse alimentos altamente energéticos.

Esto puede vislumbrarse claramente en las gráficas 8 y 9 que nos ayudan a tener una mejor apreciación de la variación de los componentes en los tempers.

6.- ESTIMACION NUTRICIONAL APOYADA EN REFERENCIAS
QUE CITAN ALGUNOS AUTORES.

Se considera que los cambios ocurridos en el tempeh con frijol de soya también deban manifestarse en el tempeh con frijoles negros y bayos.

Durante la fermentación ocurren una serie de cambios bioquímicos en el sustrato como son:

-Steinkraus et al. 1960 dicen que generalmente la temperatura de la masa aumenta de 5 a 7°C sobre la temperatura de la incubadora.

-El total de sólidos solubles se incrementa aproximadamente de 13% a 28% durante las primeras 72 horas de fermentación.

-El nitrógeno soluble se incrementa de 0.5 a 2.5% en tanto que el nitrógeno total permanece relativamente constante.

-pH. En la etapa del remojo tiene un valor cercano a 5.0 así mismo durante la precocción, y progresivamente se acerca a 7.0.

-Durante la fermentación el hongo fabrica una red entre las células de los frijoles. El hongo libera a su alrededor material que lo ayuda a ser muy resistente a la fractura, cuando es sacudido o mezclado los frijoles permanecen intactos, mientras que cuando están crudos las células de los frijoles son fácilmente accesibles a las fracturas.

-El hongo posee una alta actividad lipolítica hidrolizando sobre un tercio de la grasa neutra durante 72 horas de fermentación a 37°C. y aquí predomina el ácido linoleico y linolénico no manifestándose alguna aparente preferencia por la utilización de algún ácido graso en particular.

-Los principales azúcares son la sacarosa, estaquiosa y rafinosa; durante la fermentación los principales cambios son una rápida eliminación de hexosas y una pequeña hidrólisis de la estaquiosa. Hesseltine y Sorensen, 1966.

-Lisina y metionina disponible en una prueba microbiológica demuestran un decremento durante el curso de la fermentación del tempeh. La lisina decrece de 10% a 25% después de la fermentación por 36 y 60 hr, respectivamente, mientras tanto la metionina decrece entre 3% y 10% respectivamente. Steinkraus et. al., 1960, 1961.

Sin embargo se tiene que el triptófano y alanina se incrementan alrededor de un 20%; fenilalanina decrece alrededor de un 20%. La cantidad de aminoácidos libres se incrementa a medida que la fermentación progresa y no hay cambios en los aminoácidos esenciales a través de 24 horas de fermentación.

-Hesseltine y Wang en 1965 reportaron que el *Rhizopus oligosporus*, produce dos sistemas de enzimas proteolíticas, una con una actividad óptima a pH 3.0 y la otra con un óptimo de pH 5.5. Sin embargo posee una máxima actividad a temperaturas de 50°C a 55°C. La máxima actividad proteolítica fue lograda de 72 a 96 hr a 32°C. La producción de la proteasa ácida por *Rhizopus oligosporus* creciendo en salvado de trigo fue alta después de 4 días a 25°C con un 50% de humedad en el sustrato. Wang et. al.

-Zamora y Veum reportaron que las ratas encontraron menos apetecible el tempeh a medida que progresaba la fermentación y esto se demostró por la cantidad de alimento consumido y la cuantificación del peso promedio diario. Esto sugiere que el valor nutritivo del tempeh se reduce con el incremento del tiempo en la fermentación.

También se reportó un incremento en el peso promedio diario de las ratas de laboratorio alimentadas con soya fermentada con *Rhizopus oligosporus* a diferencia de la soya que solamente se le dio un tratamiento térmico de 121°C por 30 minutos. Los frijoles fermentados tiene un mayor valor biológico en la utilización neta de las proteínas.

-Ensayos microbiológicos indican que el contenido de vitaminas en el tempeh es alto. Steinkraus et. al., reporta que la riboflavina se incrementa al doble, la niacina se incrementa 7 veces, y la actividad de la vitamina B₁₂ se incrementa en 33 veces. La tiamina desafortunadamente decrece, el pantoteno permanece en forma constante, la biotina y los folatos se incrementan de 2.3 y 4 a 5 veces respectivamente. Estos incrementos son considerados importantes nutricionalmente hablando así como una alternativa importante para los consumidores que buscan otra fuente de estas vitaminas , tal es el caso de los vegetarianos. El tempeh no solo cumple con éstos requisitos de ser rico en proteínas sino que además como fuente de vitamina B₁₂.

-Los valores de peróxidos fueron determinados en los lípidos extraídos con éter del frijol de soya y del tempeh seco pulverizado y guardado a temperatura ambiente. El número de peróxidos que se encontraron en las muestra de tempeh fue de 0 a 1.1, sin embargo en la muestra de frijol de soya estando bajo las mismas condiciones el valor encontrado fue de 18.3 a 201.9. Steinkraus et. al., 1961.

-Los antioxidantes producidos por el *Rhizopus oligosporus* han sido ampliamente estudiados por Gyorgy et. al., 1964 y 1974, ellos atribuyen un valor nutritivo extra por la alta estabilización del aceite del tempeh debido a los antioxidantes que produce el hongo; tempehs almacenados por un largo periodo de tiempo no desarrollan rancidez porque éste contiene 6,7,4'-trihidroxi isoflavona.

-Wang et. al., reportan que el *R. oligosporus* produce un antibiótico activo contra un gran número de bacterias Gram + incluyendo *Staphilococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. El único Gram - sensible al antibiótico fue *Klebsiella pneumoniae*, pero se ha investigado y se ha visto que éste es muy importante ya que colabora en la actividad de la vitamina B₁₂, y no se tiene ninguna evidencia de que exista inhibición en el crecimiento del *Rhizopus oligosporus*.

7.- ELABORACION DEL PRODUCTO CON CARACTERISTICAS CULINARIAS
DE LA COCINA MEXICANA.

Como resultado final de la elaboración del producto al cual se le impartió algunas características culinarias de la comida mexicana, fueron manufacturados 2 productos para cada uno de los tempehs que consistió en adicionar aquellos condimentos que le impartieran esos sabores característicos con la finalidad de enmascarar el sabor tradicional del tempeh, sabor con fuerte presencia a humedad y al micelio formado, que permitiera la aceptación del producto entre los consumidores.

Estas variantes se lograron incorporando en el tempeh de frijol negro y tempeh de frijol bayo los diferentes condimentos en forma de salsa, una de chile guajillo y otra de chile pasilla, en la cual se dejaron en reposo los diferentes tempehs.

Así se obtuvieron cuatro productos:

Tempeh de frijoles negros con chile guajillo.

Tempeh de frijoles negros con chile pasilla.

Tempeh de frijoles bayos con chile guajillo.

Tempeh de frijoles bayos con chile pasilla.

8.- PRUEBA DE ACEPTACION DEL PRODUCTO PARA CONSUMIDORES
POTENCIALES.

Se realizó la prueba de aceptación para cada una de las alternativas del producto con frijol negro y frijol bayo.

Primeramente se asignó un número a cada una de las diferentes muestras con la finalidad de identificarlas y posteriormente pudieran ser evaluadas por el juez-afectivo. Como segunda etapa se preparó la muestra y el escenario para la evaluación. Se sometieron a prueba con los jueces y fueron registrados los resultados como el número de personas que aceptaron las muestras contra el número de rechazos. Posteriormente se hizo una evaluación con la ayuda de tablas estadísticas y en la cual fue reportado el grado de significancia de los resultados finales.

Muestra No. 246. Tempeh frijol bayo guajillo.

32 personas aceptaron el producto. Lo que equivale al 64% de la población. 18 personas rechazaron el producto. Lo que equivale al 36% de la población.

Muestra No. 462. Tempeh frijol bayo pasilla.

29 personas aceptaron el producto. Lo que equivale al 58% de la población. 21 personas rechazaron el producto. Lo que equivale al 42% de la población.

Muestra No. 836. Tempeh frijol negro guajillo.

34 personas aceptaron el producto. Lo que equivale al 68% de la población. 16 personas rechazaron el producto. Lo que equivale al 32% de la población.

Muestra No. 683. Tempeh frijol negro pasilla.

37 personas aceptaron el producto. Lo que equivale al 74% de la población. 13 personas rechazaron el producto. Lo que equivale al 26% de la población.

Para determinar si la aceptación es significativa, de la tabla f-2, alfa = 1% (Pedrero D. L.).

Dado que el valor de tablas es menor que el valor real, se considera que las muestras se aceptan de manera significativa con un nivel de significancia del 1%.

Los anteriores resultados se muestran en la tabla No. 4.

TABLA No. 4 RESULTADOS PRUEBA DE ACEPTACION.

MUESTRA	NUMERO ACEPTACION	NUMERO RECHAZOS	VALOR TABLAS	VALOR REAL
246	32	18	24	32
462	29	21	22	29
836	34	16	25	34
683	37	13	27	37

VI.- CONCLUSIONES.

1.- La reproducción del *Rhizopus oligosporus* en el laboratorio resultó satisfactoria siguiendo la técnica señalada para tal efecto.

2.- La implementación del crecimiento del hongo en la producción de tempeh de soya fue satisfactorio, obteniéndose una torta compacta unida por el micelio. Este fenómeno también se manifestó para los sustitutos del frijol de soya que fueron frijol negro y frijol bayo.

3.- La implementación en la elaboración del tempeh de frijol de soya resultó favorable, teniéndose algunos cambios en lo que respecta a las variables de proceso como fueron: tiempos y temperaturas de precocción, remojo y cocción resultando que el método es reproducible y es factible la producción de tempeh.

4.- La implementación del tempeh de frijol negro fue factible debido a que la técnica de elaboración es reproducible y que el hongo tiene la capacidad de crecer también sobre este sustrato.

5.- La elaboración de tempeh con frijol bayo se puede realizar debido a lo versátil del método y también a que el *Rhizopus* es capaz de crecer sobre la superficie de los cotiledones.

6.- El producto fermentado tempeh, independientemente del frijol empleado, presentó características aceptables de sabor, textura así como una buena formación de la torta y sin oscurecimiento del micelio.

7.- Los tempehs de frijol de soya, frijol negro y frijol bayo son importantes para aquellas personas que buscan alternativas en alimentos de origen vegetal, mientras que el tempeh de frijol de soya es meramente proteico el de frijol negro y bayo son completamente energéticos.

8.- Se considera que todos los cambios nutritivos en el tempeh de soya también se vean manifestados en un grado determinado en los tempehs de frijol de negro y bayo.

9.- Es factible la realización del tempeh utilizando otras alternativas en el uso de las leguminosas como son frijoles en todas sus variedades, que son importantes a nivel nacional y que pueden enriquecerse con una pequeña transformación.

10.- Las diferencias entre el tempeh de frijol de soya y los tempehs de frijol negro y frijol bayo se manifiestan en el mayor contenido de proteína y grasa para el tempeh de soya, mayor el porcentaje en carbohidratos para los tempehs de frijol negro y frijol bayo.

11.- Los condimentos empleados en el tempeh salsa fueron aquellos que comunmente se utilizan en la cocina mexicana con la finalidad de evitar el sabor fuerte característico en los tempehs.

12.- El producto tempeh salsa se elabora fácilmente, tiene una presentación agradable, adquiere una similitud con productos alimentarios ya conocidos, como serian las tortas de carne, palanquetas, hamburguesas, etc., cumple con ciertas características culinarias de la comida mexicana lo que lo hace más atractivo para su ingestión.

13.- El tempeh salsa absorbe sabores de los ingredientes de la mezcla impartiendo el sabor que uno desea y que potencialmente se pueden elaborar otros productos con los sabores que se desea ya que existen evidencias no reportadas en donde se elaboraron productos tipo pescado enchilado hamburguesa y chorizo.

14.- La prueba de aceptación fue de capital importancia ya que ésta nos reportó que el tempeh elaborado con otro tipo de leguminosas es aceptado por el público consumidor.

Es importante como una alternativa en la investigación el poder corroborar la importancia que tiene el seguir el curso de la fermentación paso a paso, para ello es necesario contar con equipo y aparatos que nos permitan hacer mediciones exactas para poder hacer predicciones de lo que ocurrirá, se sugiere el trabajo mas profundo para ver los cambios con respecto a aminoácidos, producción de peróxidos, antioxidantes, vitaminas y producción de antibióticos. También el evaluar el valor biológico en la utilización de las proteínas, así como poder implementar de métodos que nos permitan una evaluación de la calidad del tempeh en cuanto a su textura y formación del micelio, también se sugiere el poder realizar mezclas con otro tipo de leguminosas, para que finalmente se pueda evaluar el aporte energético y proteínico del producto. Se sugiere utilizar como una herramienta los métodos estadísticos con jueces entrenados para poder evaluar de una manera mas precisa los nuevos productos.

VII.- BIBLIOGRAFIA.

1. Aduke James, 1981. Handbook of Legumes of World Economic Importance, Plendum Press, N.Y.

2. A.O.A.C., 1984, Association of the Official Analytical Chemistry, 12th Edition, U.S.A.
 - a.- 14.004
 - b.- 7.009
 - c.- 7.056
 - d.- 7.065
 - e.- 47.021

3. Baker R. C., Mustakas., 1972. Inactivación por calor del inhibidor de tripsina, lipoxigenasa y ureasa en frijol de soya: efecto de aditivos ácidos y alcalinos. A.S.A México Núm. 3 .

4. Djien Koswan y Hesseltine, C. W., 1961. Indonesian Fermented Foods. Soybeans Digest. Nov 22, 14, .

5. First European Soyfoods Worshop Tempeh., 1984. European Soyfoods Works, A.S.A.

6. From Traditional Agricultural Research A.G., 1966. A.S.A. Núm 49.

7. Goulart Frances, 1981. Tempeh on your table. Soyfoods Center A.S.A., Núm 4668.
8. Gyorgy P. K., Murata., 1974. Studies on antioxidant activity of tempeh oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 51:377-379.
9. Haytowitz David B, Marsh Anne C. and Matthews Ruth H., 1981. Content of selected nutrients in raw, cooked and processed legumes. Food Technology. Pags 73-74.
10. Hesseltine C.W., Camargo R. Rackis J.L., 1963. A mould inhibitor in soybeans. Nature 200:1226-1227.
11. Kao C. and Robinson R. J., 1978. Nutricional aspects of fermented foods from Chickpea, horsbean and soybean, Cereal Chemistry 55:512-517.
12. Kronenberg Soyfoods Conference. Technical Seminar in Tempeh Microbiology. A.S.A 46.
13. K.U. Shun, Wei L.S., Steinberg M.P., Nelson A.I. and Hymowitx T., Extracción de oligosacáridos durante la cocción del frijol de soya entero A.S.A. México Núm 2.

14. Leiner Irving E., 1977. Nutricional aspects of soy protein products. Journal American Oil Chemist Society. 54:454-473.
15. Martinelli Alcides Gilho and Hesseltine W.C., 1964. Tempeh fermentation, package and tray fermentations. Food Technology 19:167-171.
16. Making Tempeh Home Soyfood Equipment. A.S.A., 1982. Núm 4890.
17. Molina R. Mayorga I. y Bressani R., 1982 Producción de pastas de proteína de alta calidad usando una mezcla de sémola, harina de maíz y harina de soya. Cereal Chemistry 53:134-140 A.S.A. Núm 4.
18. Murata and Sugimoto Y., 1974. Studies on antioxidant activity of tempeh oil. Journal American Chemistry Society. 51:249-253.
19. Noyes Robert, 1969. Protein foods supplements. UNESCO New Jersey, A.S.A.
20. Pedrero D. L. Pangborn R. M., 1989. Evaluación sensorial de los alimentos. Editorial Alhambra México.

21. Que es el Tempeh. The soyfoods center, A.S.A. 1982 Núm 4593.
22. Regalado Zamora y Tryge L. UEUM., 1981. Human Nutritions Highlights. A.S.A. Núm 4683.
23. Shurfleff William and Aoyagi Akiko. Favorite Tempeh Recipes Organic Living. A.S.A.
24. Shurfleff W. Aoyagi A., 1979. The book of tempeh. Harper and Row N. Y.
25. Smith Allan K., 1963. Foreign uses of soybean protein foods, Cereal Science 8:6-10.
26. Smith A.K., Rackts J. Hesseltine, C.W. Smith Mable Robins, Dorothy J., and Booth A. N., 1964. Tempeh nutritive value in relation to processing. Cereal Chemistry 41:123-127.
27. Sudarmadji Slamet and Murkakis Pericles, 1977. The phytate and phytase of soybean tempeh . Journal Science Food and Agriculture. 28:381-383.
28. Suparmo and Marakis P., 1987. Tempeh prepared from germinated soybeans. Journal of Food Science. 52:1736-1737.

29. Steinkraus Keith H., 1985 Handbook of indigenous fermented foods. Microbiology series. Vol 9 Ed. Bekker, New York.
30. Tester Howard M. and Schaeper Wilbur C., 1969. Food uses of soybeans. Soybean Digest.
31. Tempeh Keeps on Coming for More Soybeans, 1981. Organic gardening and farming. A.S.A. Núm 4313.
32. Tempeh the Indonesian Contribution., 1981. Soya News.
33. Truesdell Dolores D., Green Nancy R. and Acosta Phyllis B., 1987. Vitamin B12 activity in miso and tempeh. Journal of Food Science, 52:235-239.
34. Wang Hwa L. and Hesseltine C. W., 1966, Wheat tempeh. Cereal Chemistry 43: 5.
35. Wolf W. J., 1977. Proteínas comestible de la soya y sus usos. A.S.A. México, Núm 5.
36. Zamora R. G. Veum F. L., 1979. The nutritive value of dehulled Soybeans fermented with *Aspergillus oryzae* or *Rhizopus oligosporus* as evaluated by rats. J. Nutr 109:1333-1339.

APENDICE 1

EQUIPO UTILIZADO:

- DIGESTOR DE FIBRA LABCONCO
CATALOGO NUM. 30001. SERIE 71860.
- HORNO ELECTRICO DE AIRE FORZADO RIOS ROCHA
MODELO ESDF-48 NUM. 303554 RIOSSA.
- MUFLA BLUE-M LAB HEAT
MODELO M25A-2A. SERIE M-1-5013
RANGO DE TEMPERATURA 66°C A 1010°C (1850° F).
- DIGESTOR DE PROTEINAS LABCONCO
SERIE 60011.
- DESTILADOR CRISTALAB.
- TERMOBALANZA OHAUS
MODELO 6010. SERIE 27723. CAPACIDAD 10 g. 600 WATTS MAXIMO.
- HORNO ELECTRICO RIOS ROCHA S.A.
MODELO ESCF-48.
- BALANZA GRANATARIA OHAUS
MODELO HARVARD TRIP DOBLE PLATILLO 2 Kg CAPACIDAD.
- BALANZA ANALITICA SAUTER
TIPO FEINWAAGE 414/18. SENSIBILIDAD DE 0.1 mg.
- BOMBA DE VACIO
MARCA CENCO. SERIE 90510.
- REFRIGERADOR VERTICAL SEMIINDUSTRIAL
DOS PUERTAS MODELO TR-2L2 GEFRIMEX.
- POTENCIOMETRO CORNING
pH METER MODELO 10.
- AUTOCLAVE PRESTO
MODELO 21L CAPACIDAD 15 LITROS.
- LICUASET MOULINEX
MODELO PATENTADO TIPO 518.
- PARRILLA TERMOLINE
TIPO 1000 STIR PLATE.
- REOSTATO TIPO 2PF 1010.

APENDICE 2

TECNICAS ANALITICAS

DETERMINACION DE NITROGENO 47.02 A.O.A.C. 12^a Ed.

REACTIVOS

Acido sulfúrico H_2SO_4 1.84 g/ml.	Oxido de mercurio HgO.
Sulfato de potasio K_2SO_4 .	Hidróxido de sodio NaOH.
Acido bórico H_3BO_3 al 4%.	Rojos de metilo.
Acido clorhídrico HCl 0.02 N	Azul de metileno.
Tiosulfato de sodio pentahidratado $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$.	

MATERIAL Y EQUIPO

Matraz kjeldahl 30 ml.
Matraz erlenmeyer 125 ml.
pipetas serológicas 1-10 ml.
Aparato digestor LABCONCO.
Aparato destilador CRISTALAB.
Balanza analítica.

PROCEDIMIENTO

Pesar de 0.06-0.085 gramos de muestra, agregar al matraz kjeldahl 1.9 gramos de sulfato de potasio, agregar 40 miligramos de óxido de mercurio , agregar 2 ml de ácido sulfúrico y perlas de ebullición.

Si la muestra tarda en ebullición de 2 a 2.5 minutos digerir durante 60 minutos. Si la muestra tarda en ebullición de 2.5 a 3 minutos digerir durante 90 minutos.

Enfriar y agregar agua mínima para disolver los sólidos, pasar al aparato de destilación enjuagando con 1 o 2ml de agua en el matraz erlenmeyer, agregar de 5 a 8 ml de ácido bórico y 2 a 4 gotas de indicador y poner en la parte posterior del destilador, agregar 8 a 10 ml de solución de sosa mas tiosulfato de sodio pentahidratado y coleccionar hasta 15 mililitros del destilado.

Diluir a 50 ml. y titular con ácido clorhídrico 0.02 N. Hacer un blanco testigo.

CALCULOS

$$\%N = \frac{\text{ml de HCl} - \text{ml de blanco} \times N \text{ HCl} \times 14.007 \times 100}{w \text{ muestra}}$$

ml HCl: mililitros de ácido clorhídrico.

N HCl: normalidad del ácido.

w: peso de la muestra.

DETERMINACION DE FIBRA CRUDA 7.065 A.O.A.C.

REACTIVOS

Acido sulfúrico 1.25%

Hidróxido de sodio 1.25%

Etanol (antiespumante).

MATERIAL Y EQUIPO

Vaso berzellius 600ml.

Probeta 100ml.

Perlas de ebullición.

gendarme.

crisoles.

desecador.

estufa.

mufla.

Embudo buchner.

Matraz Kitasato.

Vidrio de reloj.

Digestor fibra LABCONCO.

Balanza analítica.

Bomba de vacío.

PROCEDIMIENTO

Pesar de cuatro a seis gramos de muestra previamente desgrasada, añadir 200ml. de ácido hirviendo. Digerir la muestra durante 30 minutos.

Lavar la muestra con agua destilada caliente hasta neutralizar la muestra.

Digerir la muestra con hidróxido de sodio (200 ml.) durante 30 minutos.

Lavar el residuo con agua hasta neutralizar, secar el residuo a 130°C y pesar . llevarlo a cenizas a 600°C 30 minutos. Enfriar en la estufa a 100°C, Pasar al desecador y pesar.

CALCULOS

$$\text{Fibra cruda} = \frac{\text{wbs} - \text{w cenizas}}{\text{w muestra}} \times 100$$

wbs: peso en base seca.

w cenizas: peso de las cenizas.

w muestra: peso de la muestra.

DETERMINACION DE GRASA EXTRACTO ETereo 7.056 A.O.A.C.**REACTIVOS**

Eter de petroleo.

MATERIAL Y EQUIPO

Extractor Soxhlet.

Cartucho poroso de celulosa.

mantilla eléctrica.

Horno eléctrico de aire forzado.

Balanza analítica.

Desecador.

Pinzas para crisol.

Probeta de 100ml.

Reóstato.

PROCEDIMIENTO

Poner los cartuchos a peso constante. Pesar de 5 a 8 gramos de muestra, ponerlos en el cartucho. Introducir el cartucho en el equipo de extracción. Agregar el éter de petroleo (150 ml.) Realizar la extracción de la grasa durante 5 horas continuas. Eliminar el exceso de éter. Poner los cartuchos en la estufa durante 3 horas. Pasarlos al desecador. Pesar los cartuchos.

CALCULOS

$$B - A$$

$$\text{Extracto estereo} = \frac{\text{---} \text{---}}{w \text{ muestra}} \times 100$$

B: peso del cartucho con muestra original.

A: peso del cartucho con la muestra desgrasada.

w muestra: peso de la muestra.

DETERMINACION DE HUMEDAD 14.004 A.O.A.C.

MATERIAL Y EQUIPO

Cápsula de porcelana.

Pinzas para crisol.

Espátula.

Desecador.

Balanza analítica.

Estufa de secado.

PROCEDIMIENTO

Poner las cápsulas a peso constante durante 3 horas a una temperatura de 130°C.

Pesar de 4 a 6 gramos de muestra, ponerlas en las cápsulas.

Meter las cápsulas en la estufa para eliminar la humedad, hasta que no registre variación en el peso de las muestras.

Meter en el desecador las muestras y pesarlás en la balanza analítica.

CALCULOS

B - A

$$\% \text{ de humedad} = \frac{\text{B} - \text{A}}{\text{w muestra}} \times 100$$

w muestra

B: peso del recipiente con el peso original.

A: peso del recipiente con la muestra seca.

w muestra: peso de la muestra.

DETERMINACION DE MINERALES 7.009 A.O.A.C.

MATERIAL Y EQUIPO

Crisoles de porcelana.

Pinzas para crisol.

Mechero buncen.

Triángulo de porcelana.

Desecador.

Mufla 500°C.

Balanza analítica.

Espátula.

PROCEDIMIENTO

Transfierase de 2 a 5 gramos de muestra seca en los crisoles puestos previamente a peso constante a una temperatura de 500°C a 600°C. Primero se calcina la muestra, para eliminar todos los gases que se desprenden durante la combustión, la operación se realiza utilizando un mechero, una vez que ya no se desprendan gases se introduce a una mufla hasta que el color de la muestra sea gris o blanca. esto se lleva a cabo a una temperatura de 500°C a 600°C, una vez incinerada la muestra se introduce a un desecador, hasta que adquiera la temperatura ambiente 30 minutos. Posteriormente se seca.

CALCULOS

$$\% \text{ cenizas} = \frac{B - A}{w \text{ muestra}} \times 100$$

B: peso del crisol mas cenizas.

A: peso del crisol.

w muestra: peso de la muestra.