



UNIVERSIDAD DEL AZUAY
FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGIA
ESCUELA DE INGENIERIA EN ALIMENTOS

**Efecto de levaduras y bacterias probióticas en fermentación
en estado semisólido de harinas de chocho (*Lupinus
mutabilis*)**

**Trabajo de graduación previo a la obtención del título de
INGENIERIA EN ALIMENTOS**

Autor:

ANA MARIA ROMERO ESPINOZA

Director:

ING. MARCO LAZO, PhD

CUENCA, ECUADOR

2017

DEDICATORIA

A mis padres, Luis y Vilma, por darme la oportunidad de estudiar aunque esto implicaba estar lejos, enseñarme e inculcarme buenos valores como el respeto, honestidad, humildad y que a pesar de los obstáculos que se presenten en el camino siempre se puede llegar a la meta que uno se ha propuesto.

A mis hermanos, Andrea y Alexander, por ser uno de mis mejores ejemplos a seguir.

A mi esposo, Danny, quien ha estado a mi lado todo este tiempo en momentos buenos y malos apoyándome sobre todas las cosas.

A mi hijo, Thiago, quien es una de las razones principales por quien seguí esforzándome día a día hasta llegar a cumplir esta tan anhelada meta.

Gracias a todos ustedes.

Los llevo en el corazón.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a Dios, quien ha estado presente en todo este camino y en todo momento de una u otra manera guiándome. A mi mamá por ser el mejor ejemplo a seguir, por ser una mujer fuerte, trabajadora que nunca se rinde, por brindarme su apoyo incondicional a pesar de la distancia que nos separa y estar siempre presente en los momentos más importantes de mi vida.

Agradezco a mi hermana por estar a mi lado en todos estos años de estudio, apoyándome en mis decisiones. A mi esposo, quien con sus palabras me ha dado la fortaleza de seguir adelante y luchar contra los obstáculos que se presenten.

A mis tíos, tías, primos quienes siempre han estado pendientes de mis estudios, y enseñándome buenos valores.

Igualmente agradezco a mi director de tesis, Ing. Marco Lazo, por su enseñanza, paciencia y entrega total a este trabajo de investigación.

A todos mis profesores quienes de una u otra manera me compartieron sus conocimientos. Y a todos quienes estuvieron apoyándome y contribuyeron a la realización de este trabajo.

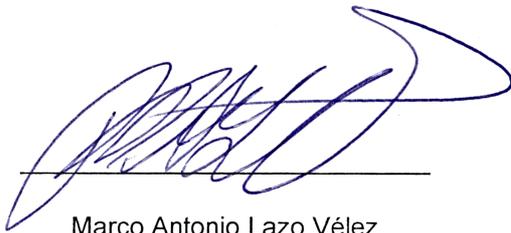
Ana María

“EFECTO DE LEVADURAS Y BACTERIAS PROBIÓTICAS EN FERMENTACIÓN EN ESTADO SEMISÓLIDO DE HARINAS DE CHOCHO (*LUPINUS MUTABILIS*)”

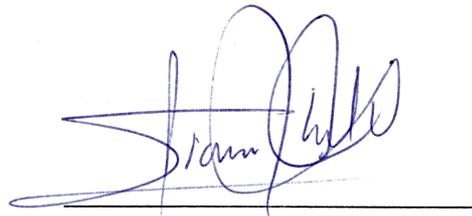
RESUMEN

El chocho (*Lupinus mutabilis*) es una leguminosa rica en nutrientes originaria de los Andes. Sin embargo, su consumo es limitado por la presencia de factores antinutricionales. El proceso de fermentación en estado semisólido de harinas de chocho integral, cuando se usaron en conjunto bacterias probióticas y dos levaduras del género *Saccharomyces*, favoreció la mayor degradación de oligosacáridos (96,3%) y ácido fítico (67,7%); así como mejoró los valores del índice de absorción de agua (76,3%) y de dispersabilidad proteica (65,3%), cuando fueron comparadas al control.

Palabras claves: *Lupinus mutabilis*, fermentación, oligosacáridos, ácido fítico.



Marco Antonio Lazo Vélez
Director de Tesis



Diana Catalina Chalco Quezada
Coordinador de Escuela



Ana María Romero Espinoza
Autora

EFFECT OF YEASTS AND PROBIOTIC BACTERIA IN FERMENTATION IN THE SEMI-SOLID STATE OF CHOCHO FLOUR (*LUPINUS MUTABILIS*)

ABSTRACT

Chocho (*Lupinus mutabilis*) is a nutrient-rich legume native to the Andes. However, its consumption is limited by the presence of anti-nutritional factors. When probiotic bacteria and two yeasts of *Saccharomyces* genus were used together, the process of fermentation in the semisolid state of whole-grain flours favored greater degradation of oligosaccharides (96.3%) and of phytic acid (67.7%); and also improved the values of water absorption index (76.3%) and protein dispersibility (65.3%), when compared to the control.

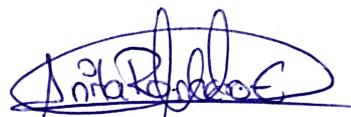
Keywords: *Lupinus mutabilis*, fermentation, oligosaccharides, phytic acid.



Marco Antonio Lazo Vélez
Thesis Director



Diana Catalina Chalco Quezada
School Coordinator



Ana María Romero Espinoza
Author



UNIVERSIDAD DEL
AZUAY
Dpto. Idiomas



Translated by,
Lic. Lourdes Crespo

INDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|-------------|
| DEDICATORIA | ii |
| AGRADECIMIENTOS | iii |
| INDICE DE CONTENIDOS | vi |
| INDICE DE TABLAS | viii |
| INDICE DE FIGURAS | ix |
| INDICE DE ANEXOS | x |
| | |
| INTRODUCCION | 1 |
| | |
| CAPITULO I. MATERIALES Y METODOS | 3 |
| 1.1. Materia prima. | 3 |
| 1.2. Microorganismos..... | 3 |
| 1.3. Capacidad microbiana para variar la composición proximal y la degradación de factores antinutricionales de una HIC. | 3 |
| 1.4. Análisis químico proximal..... | 5 |
| 1.5. Determinación de alcaloides, ácido fítico y azúcares reductoras | 5 |
| 1.6. Propiedades funcionales..... | 5 |
| 1.7. Análisis estadístico..... | 6 |
| CAPITULO II. RESULTADOS | 8 |
| 2.1. Capacidad microbiana para variar la composición proximal durante la FES de HIC..... | 8 |
| 2.2. Capacidad microbiana para degradar factores antinutricionales durante la FES de HIC..... | 10 |
| 2.3. Efecto de la fermentación en la composición química proximal, reducción de factores antinutricionales y funcionalidad de harinas integral y desamargada de chocho.12 | |
| 2.3.1. Comparación de la composición química proximal y la reducción de factores antinutricionales con el tratamiento FES-24. | 12 |
| 2.4. Determinación de la funcionalidad..... | 14 |
| CAPITULO III. DISCUSION | 16 |
| | |
| CONCLUSION | 20 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| BIBLIOGRAFIA | 21 |
| ANEXOS | 24 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Diseño factorial 2 ⁴ para la fermentación de HIC con dos tipos levaduras y MBP | 3 |
| Tabla 2. Variación en la composición proximal de HIC fermentadas con MBP y/o levaduras ¹ | 8 |
| Tabla 3. Variación de las azúcares reductoras de HIC fermentadas con MBP y/o levaduras ¹ | 9 |
| Tabla 4. pH final de las masas fermentadas con MBP y/o levaduras ¹ | 10 |
| Tabla 5. Reducción de factores antinutricionales de HIC fermentadas con MBP y/o levaduras ¹ | 11 |
| Tabla 6. Efecto en la composición química proximal y reducción de factores antinutricionales de las muestras procesadas con FES-24 | 12 |
| Tabla 7. Variación de las azúcares reductoras en harinas de chocho fermentadas con el tratamiento FES-24 ^{1,2} | 13 |
| Tabla 8. Variación del pH de las masas fermentadas con el tratamiento FES-24 ^{1,2} | 14 |
| Tabla 9. Características funcionales de las harinas de chocho integral y desamargada fermentadas con MBP, <i>S. cerevisiae sp</i> y <i>S. cerevisiae var. boulardii</i> ^{1,2} | 15 |
| Tabla 10. Variación en la composición proximal de harina integral de chocho autoclavada ^{1,2} | 25 |
| Tabla 11. Reducción de factores antinutricionales de harina integral de chocho autoclavada ^{1,2} | 25 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|---|
| Figura 1. Elaboración de harina integral de chocho..... | 4 |
| Figura 2. Elaboración de harina de chocho lavada-cocida | 6 |

INDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Inoculación de MBP y las levaduras | 24 |
| Anexo 2. Composición proximal y la degradación de factores antinutricionales de harina integral de chocho autoclavada | 25 |

Romero Espinoza, Ana María

Trabajo de graduación

Ing. Marco Lazo, PhD

Julio, 2017

Efecto de levaduras y bacterias probióticas en fermentación en estado semisólido de harinas de chocho (*Lupinus mutabilis*)

INTRODUCCION

El chocho (*Lupinus mutabilis*) es una leguminosa originaria de los Andes, cultivada en países como Venezuela, Perú, Ecuador, Colombia, Bolivia, Argentina y Chile (Apunte y León). Ésta leguminosa cuando está desamargada puede ser empleada para cubrir las deficiencias por malnutrición debido a que presenta contenidos importantes de proteína, 54,05%, y lípidos, 21,22% (Allauca Chávez). Sin embargo el consumo de chocho se ve disminuido por la presencia de algunos factores antinutrimientales como azúcares flatulentas, alcaloides, ácido fítico (Fritsch, Vogel y Toelstede).

El proceso de desamargado es un método muy utilizado para la eliminación de alcaloides y de otros factores antinutrimientales asociados al chocho como los oligosacáridos no hidrolizables (azúcares flatulentas) (Villacreses Freire; Jul et, al.). Para éste proceso se requiere elevadas cantidades de agua y mucho tiempo de trabajo, lo que industrialmente lo convierte en un proceso deficiente, poco amigable con el medio ambiente y pérdida de nutrientes en el grano (Villacreses Freire). Este sistema artesanal consta de tres etapas que son hidratación, cocción y lavado, requiriéndose aproximadamente 50 litros de agua por cada kilo de chocho (Villacreses Freire).

Los oligosacáridos no hidrolizables en el intestino, α -galactósidos están conformados por rafinosa, estaquiosa y verbascosa (Ulloa, et al.) Son azúcares que no pueden ser digeridos en la mucosa intestinal de los mamíferos debido a la ausencia de la enzima α -galactosidasa. A estos azúcares se les atribuye las flatulencias y responsables de reducir la digestibilidad de la proteína (Fritsch, Vogel y Toelstede). En el chocho se encuentra la estaquiosa (62,5%), seguida de la verbascosa (22,5%) y finalmente la rafinosa (15%) (Karnpanit, et al.).

Por otro lado, los alcaloides, son amargos y tóxicos para los seres vivos (Villacreses Freire). Los principales que están en ésta leguminosa son los tipo quinolizidínicos como la lupanina, esparteína, 13-hidroxi lupanina. De los cuales, los dos primeros mencionados son más tóxicos, y el hidroxi lupanina es 10 veces menos tóxico (Schoeneberger, et al.). Además, son responsables de producir algunos efectos fisiológicos en el cuerpo debido a su

complejidad molecular (Allauca Chávez). Su toxicidad es de 30 mg/kg de peso en adultos y 10-15 mg/kg de peso en niños. Sin embargo, su peligro se ve disminuido debido a la pobre digestibilidad de los alcaloides (5%) y un bajo efecto acumulativo en el organismo (Allauca Chávez).

El ácido fítico es una forma de tener en reserva el fósforo en ciertos organismos vegetales, pero se puede ir acumulando en las semillas de algunas especies en la maduración; es conocido como un antinutriente debido a la capacidad quelante que presenta frente a ciertos iones metálicos di- y trivalentes (Cameán y Repetto). Además, por la capacidad de formación de complejos produce una biodisponibilidad reducida de minerales, vitaminas y proteína (Fritsch, Vogel y Toelstede).

Por otro lado, la fermentación es un proceso metabólico de levaduras y varias bacterias que sirve para la obtención de energía por parte de microorganismos fermentativos a través de compuestos orgánicos, principalmente azúcares simples (Puerta Quintero). La fermentación de las harinas mejora el contenido de azúcares libres, proteínas, así como la biodisponibilidad de vitaminas, minerales, aminoácidos esenciales. Además, favorece las propiedades funcionales y la degradación de compuestos antinutricionales (Ijarotimi Oluwole). Los procesos tecnológicos de fermentación más usados son: a) fermentación sumergida, en la cual los microorganismos son adicionados en un medio líquido que contiene nutrientes y; b) la fermentación en estado sólido o semi-sólido (FES), proceso donde el crecimiento microbiano se realiza en partículas sólidas en ausencia (o cerca de ausencia) de agua; de las cuales varios estudios han demostrado que la FES da mayores rendimientos y mejores características a los productos (Barkiene, et al.; Martins, et al.). Este último tipo de fermentación es utilizado para elaborar masas madres de uso en panificación (Torres, et al.).

Las levaduras son los microorganismos más utilizados en fermentación gracias a su alta capacidad para transformar la glucosa y otras azúcares simples en anhídrido carbónico y alcohol (García Olmedo). Por otro lado, las bacterias lácticas, muchas de ellas consideradas como microorganismos probióticos, tienen la capacidad de utilizar los carbohidratos como sustrato para producir ácido láctico responsable de la acidez y bajo pH de las masas fermentadas (García Olmedo; Olagnero, et al.).

El ánimo de ésta investigación se centró en comparar la variación en la composición química proximal, la reducción de factores antinutricionales y características funcionales entre una harina integral (HIC) y una harina desamargada de chocho (HLC), ésta última usada como control, cuando fueron sometidas a un proceso de fermentación en estado semisólido (FES) con la mejor combinación de dos tipos de levaduras del género *Saccharomyces* y una mezcla de bacterias probióticas (MBP). La mejor combinación de microorganismos con capacidad para variar la composición proximal y la degradación de factores antinutricionales fue determinada a partir de un diseño factorial 2^4 donde fueron evaluadas la presencia o ausencia de MBP y de dos levaduras en la HIC.

CAPITULO I

MATERIALES Y METODOS

1.1. Materia prima.

Granos de *Lupinus mutabilis* var. Bola (L) fueron adquiridos en LaVerde (Machachi, Ecuador). Los granos de chocho fueron clasificados, limpiados, enfundados, pesados y congelados a -20°C (Arctiko S.A., Esbjerg, Dinamarca).

1.2. Microorganismos.

Para los diferentes ensayos de fermentación realizados en éste trabajo se usaron una mezcla de bacterias probióticas (MBP): *Lactobacillus acidophilus* (1000 millones de UFC), *Lactobacillus casei* (1000 millones de UFC), *Lactobacillus rhamnosus* (440 millones de UFC), *Lactobacillus plantarum* (176 millones de UFC), *Bifidobacterium infantis* (27,6 millones de UFC), *Streptococcus thermophilus* (667 mil UFC) (Lactipan, ITALMEX S.A., Calzada de Tlalpan, México) y dos cepas de levaduras liofilizadas listas para usar: a) una levadura comercial para panificación *Saccharomyces cerevisiae* (Saf-instantant, FERMEX S.A., Toluca, México) y una levadura grado farmacológico *Saccharomyces boulardii* (Floratil, Biocodex, Beauvais, Francia).

1.3. Capacidad microbiana para variar la composición proximal y la degradación de factores antinutricionales de una HIC.

La capacidad microbiana para variar la composición proximal y la degradación de factores antinutricionales durante la FES de una HIC fue determinada a partir de un diseño factorial 2^4 (Tabla 1). Donde fueron evaluadas la presencia o ausencia de MBP y de dos levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla 1. Diseño factorial 2^4 para la fermentación de HIC con dos tipos levaduras y MBP

| Muestra | Mix de MBP ¹ | Levaduras ² |
|---------|-------------------------|------------------------|
| 11 | Sin | Sin |
| 12 | Sin | L1 |
| 13 | Sin | L2 |
| 14 | Sin | L1/L2 |
| 21 | Con | Sin |
| 22 | Con | L1 |
| 23 | Con | L2 |
| 24 | Con | L1/L2 |

¹Mezcla de bacterias probióticas: *Lactobacillus acidophilus* (1000 millones de UFC), *Lactobacillus casei* (1000 millones de UFC), *Lactobacillus rhamnosus* (440 millones de UFC), *Lactobacillus plantarum* (176 millones de UFC), *Bifidobacterium infantis* (27,6 millones de UFC), *Streptococcus thermophilus* (667 mil UFC).

²L1 es levadura *Saccharomyces cerevisiae* y L2 es levadura *Saccharomyces boulardii*.

Para la obtención de harina integral-cruda (HIC), los granos de chocho se remojaron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.3% durante 3 min, seguido se realizó tres lavadas consecutivas con agua destilada. El exceso de agua fue eliminado con papel secante. Luego, se molieron hasta obtener un tamaño de partícula de 0 – 5 mm en un molino para café (Krups, Solingen, Alemania). Este proceso fue realizado en 100g de granos de chocho para cada muestra establecida en el diseño de experimentos planteado (Figura 1).

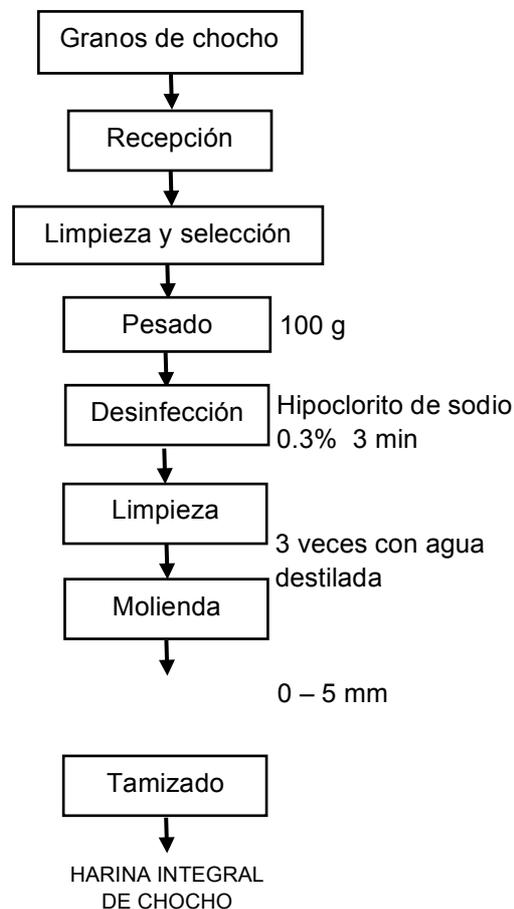


Figura 1. Elaboración de harina integral de chocho

La HIC fue resuspendida en agua destilada en proporción 1:1.19 p/v, esta mezcla se homogenizó hasta obtener una masa. Terminado el proceso de mezclado se midió el pH. Estandarizado el método, se inoculó bacterias y levaduras acorde al diseño experimental (Anexo 1), se homogenizó para luego iniciar con la fermentación. Las muestras pasaron a la fermentación en una cámara climática (Binder, Tuttlingen, Alemania) durante 24 h a una temperatura de 37°C y una humedad relativa de 70% HR. Se midió el pH nuevamente.

Sacadas las muestras de la cámara climática, fueron colocadas a -80°C en el ultra congelador (VWR, Radnor, EEUU). Las harinas fermentadas fueron colocadas en un liofilizador de frascos (Labconco, Kansas City, EEUU) durante cuatro días a -50°C y 0.032 milibares, salidas las muestras del liofilizador se molieron nuevamente. Finalmente, las muestras se conservaron a una temperatura de -20°C con una duración de seis meses.

1.4. Análisis químico proximal.

Los análisis de humedad, grasa, fibra, así como los de cenizas y proteína fueron obtenidos de acuerdo a las normas AOAC 925:09, 920:39, 962:09, y norma INEN NTE 520:2013, 519:2012, respectivamente. El extracto libre de nitrógeno (carbohidratos) se determinó por diferencia.

1.5. Determinación de alcaloides, ácido fítico y azúcares reductoras

La determinación de alcaloides se realizó según la norma INEN NTE 2390:2004. La presencia de ácido fítico y azúcares reductoras se determinaron mediante métodos colorimétricos, Kit *Phytic acid* y Kit *Raffinose/Sucrose/D-Glucose Assay*, respectivamente. Ambos de *Megazyme* (Megazyme International Ireland, Bray, Irlanda). El total de azúcares flatulentos (RSO) fueron expresados en g de estaquiosa/100g de harina, considerando que esta azúcar representa la mayor concentración (62,5%) en los granos de chocho (Karnpanit, et al.).

1.6. Propiedades funcionales.

Las propiedades funcionales se evaluaron en tres lotes diferentes de harinas de chocho, tanto integral y desamargada, fermentadas con la mezcla microbiana que observó un mejor desempeño en el diseño experimental ensayado. El índice de absorción de agua (IAA), el índice de solubilidad de agua (ISA) y el poder de hinchamiento (PH) se realizaron de acuerdo a (Rodríguez-Sandoval, Lascano y Sandoval). El índice de absorción de grasa (IAG), índice de actividad emulsionante (IAE) e índice de dispersabilidad de proteína (PDI) se analizaron con los métodos propuestos por (Granados, et al.), (Chaparro, et al.) y (Taha y Ibrahim), respectivamente.

Por otro lado, el proceso de elaboración de la harina lavada-cocida (HLC) fue de acuerdo a (Caicedo y Peralta). Brevemente, consistió en dejar en remojo el grano de chocho por 24 horas, seguido se cocinó por una hora, se puso en remojo durante 5 días cambiando el agua tres veces al día lavando los granos, se les retiró la cáscara y se los cocinó nuevamente a $65^{\circ}\text{C} \pm 5$ por 3 min en proporción 2:1 p/v, se dejó enfriar a 25°C , se licuó, tamizó con la ayuda de un lienzo y se puso a secar el bagazo en una cámara de secado (Tecnopast, Trento, Italia) durante 24 horas. Finalmente, el bagazo se molió hasta obtener un tamaño de partícula de 0 – 5 mm en un molino para café (Krupps, Solingen, Alemania) y se tamizó (Figura 2).

Las harinas integrales fueron elaboradas de la misma forma detallada en el inciso 1.3. Para ello se prepararon 3 lotes de 0,25 Kg fermentados en un incubador orbital con movimiento (ES-20 Grant bio, Cambridge, Reino Unido), luego fueron secadas y reducidas a partícula de 0 – 5 mm de tamaño y almacenadas a -20°C.

Todas las harinas fueron analizadas para proximales, degradación de factores antinutrimientales y funcionales.

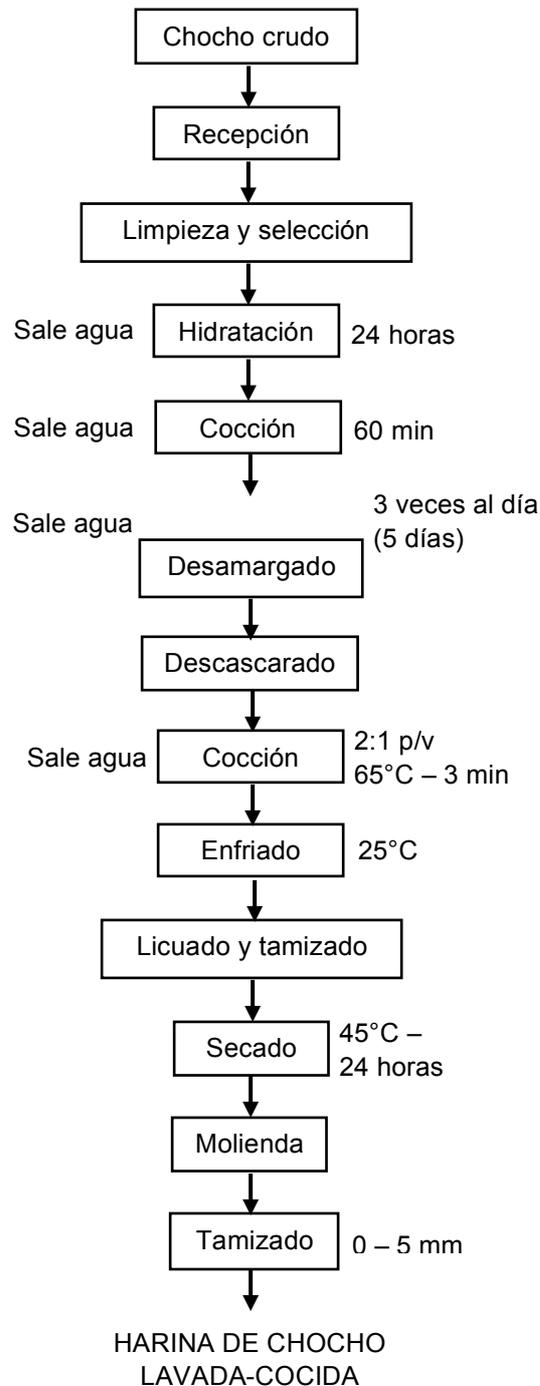


Figura 2. Elaboración de harina de chocho lavada-cocida

1.7. Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el software estadístico JMP-12 (SAS Corporation, Long Beach, CA, USA) y Minitab-16 (Quality Companion, State College, Pensilvania). Todos los análisis se expresaron como desviación estándar media de mínimo tres replicas independientes ($n = 3$), a menos que se indique lo contrario. Cuando fue apropiado, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido por un análisis de Tukey HSD o t -Student para evaluar las diferencias entre las muestras, a un nivel de significación de $p < 0.05$.

CAPITULO II RESULTADOS

2.1. Capacidad microbiana para variar la composición proximal durante la FES de HIC.

La variación en la composición química proximal de la HIC fermentada en estado semisólido con MBP y/o levaduras se pueden observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Variación en la composición proximal de HIC fermentadas con MBP y/o levaduras¹

| Muestra ² | Humedad (%) | Proteína (%) | Fibra (%) | Grasa (%) | Cenizas (%) | Carbohidratos (%) |
|----------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 11 | 6,81±0,61 ^d | 39,87±1,23 ^e | 7,05±0,10 ^a | 15,51±0,92 ^b | 3,40±0,23 ^c | 33,85±1,91 ^a |
| 12 | 7,23±0,13 ^{cd} | 45,32±0,42 ^{bc} | 6,15±0,32 ^b | 17,44±0,76 ^a | 3,50±0,07 ^{bc} | 27,99±0,32 ^{bc} |
| 13 | 8,43±0,36 ^{ab} | 43,91±0,65 ^{cd} | 6,73±0,17 ^{ab} | 17,34±0,17 ^a | 3,56±0,05 ^{abc} | 28,51±0,62 ^{bc} |
| 14 | 7,21±0,49 ^{cd} | 45,93±0,04 ^{abc} | 7,23±0,16 ^a | 17,53±0,75 ^a | 3,44±0,31 ^{bc} | 25,28±0,60 ^{de} |
| 21 | 7,73±0,31 ^{bc} | 43,15±0,01 ^d | 6,16±0,20 ^b | 17,42±0,65 ^a | 3,43±0,10 ^{bc} | 30,10±0,98 ^b |
| 22 | 8,80±0,37 ^a | 46,22±0,19 ^{ab} | 7,19±0,59 ^a | 17,12±0,96 ^a | 3,68±0,07 ^{ab} | 25,99±2,15 ^{cd} |
| 23 | 8,58±0,57 ^a | 45,60±0,51 ^{bc} | 7,14±0,18 ^a | 16,96±0,12 ^a | 3,41±0,05 ^c | 26,92±0,20 ^{cd} |
| 24 | 7,41±0,71 ^{cd} | 47,82±2,01 ^a | 7,28±0,09 ^a | 16,91±0,17 ^a | 3,79±0,06 ^a | 24,14±1,80 ^e |

¹Los datos son media ± desviación estándar de mínimo tres réplicas expresadas en % de base seca. Los valores con la misma letra dentro de las columnas no son significativamente diferentes a $p < 0,05$.

²11: HIC control; 12: HIC con levadura *S. cerevisiae*; 13: HIC con *S. boulardii*; 14: HIC con levadura *S. cerevisiae* y *S. boulardii*; 21: HIC con mix de MBP; 22: HIC con mix de MBP y levadura *S. cerevisiae*; 23: HIC con mix de MBP y levadura *S. boulardii*; 24: HIC con mix de MBP y levadura *S. cerevisiae* y *S. boulardii*.

En el contenido de proteínas, interesantemente, las harinas fermentadas presentaron un incremento promedio de 13,9% en comparación a la muestra control (11). Siendo la muestra de harina fermentada con el mix de levaduras y MBP (24) la que presentó el mayor contenido (47,8%).

Por otro lado, el contenido de fibra de la muestra control (11) no presenta diferencias significativas con las muestras de harinas fermentadas con la mezcla de levaduras y las fermentadas con la mezcla de levaduras/MBP. Sin embargo, el menor contenido ($p < 0,05$) fue para las muestras fermentadas por cada una de las dos levaduras (12, 13) o por MBP (21).

También se observó una tendencia en el incremento (11%) de la grasa en las harinas de masas fermentadas que contenían cualquiera de los microorganismos estudiados, cuando éstas fueron comparadas con la harina control (11) que presentó el menor contenido (15,5%). Sin embargo, no se observó una diferencia significativa entre las muestras fermentadas variando de 16,96% a 17,44%.

De las harinas de masas fermentadas, la muestra con MBP (21) fue la que mayor cantidad de carbohidratos presentó ($p < 0.05$), seguida por las muestras fermentadas con las levaduras por separado, incrementando 6%. Además, se observó que el menor contenido ($p < 0.05$) fue para las harinas fermentadas con MBP/levaduras, con una mayor significancia cuando se utilizó las dos levaduras en conjunto (25,3%) y estas con MBP (24,1%). Finalmente, los contenidos de cenizas se encontraron en un rango de 3,4 a 3,8% las cuales presentaron una diferencia significativa entre las muestras de harinas de masas fermentadas.

En el caso de las azúcares reductoras (Tabla 3), las harinas que presentaron la mayor cantidad de D-Glucosa fueron las fermentadas con las levaduras por separado (12 y 13) y con MBP/*S. cerevisiae* (22), con un porcentaje de incremento en promedio del 8%. Las muestras restantes no presentaron diferencia estadísticamente significativa entre sí. En cuanto a la sucrosa, la muestra control (11) es la que presentó mayor cantidad, seguida por la muestra fermentada con las MBP (21) con una disminución del 64%. En las demás muestras de harinas de masas fermentadas no hubo diferencia significativa ($p < 0.05$), presentando una disminución del 99%.

Tabla 3. Variación de las azúcares reductoras de HIC fermentadas con MBP y/o levaduras¹

| Muestra ² | Azúcares reductores (g/100g) | |
|----------------------|---------------------------------|------------------------|
| | D-Glucosa | Sucrosa |
| 11 | 0,12±0,01 ^{ab} | 2,86±0,23 ^a |
| 12 | 0,15±0,01 ^a | 0,02±0,05 ^c |
| 13 | 0,12±0,05 ^{ab} | 0,00±0,21 ^c |
| 14 | 0,06±0,01 ^b | 0,02±0,01 ^c |
| 21 | 0,08±0,04 ^b | 1,03±0,80 ^b |
| 22 | 0,12±0,01 ^{ab} | 0,00±0,04 ^c |
| 23 | 0,07±0,04 ^b | 0,16±0,14 ^c |
| 24 | 0,06±0,00 ^b | 0,01±0,00 ^c |

¹Los datos son media \pm desviación estándar de mínimo dos réplicas expresadas en % de base seca. Los valores con la misma letra dentro de las columnas no son significativamente diferentes a $p < 0,05$.

²11: HIC control; 12: HIC con levadura *S. cerevisiae*; 13: HIC con *S. boulardii*; 14: HIC con levadura *S. cerevisiae* y *S. boulardii*; 21: HIC con mix de MBP; 22: HIC con mix de MBP y levadura *S. cerevisiae*; 23: HIC con mix de MBP y levadura *S. boulardii*; 24: HIC con mix de MBP y levadura *S. cerevisiae* y *S. boulardii*.

Finalmente, se pudo observar que los pHs finales (Tabla 4) de las diferentes muestras no presentaron una diferencia estadística significativa entre sí ($p < 0.05$), variando entre 4.1 a 4.6. Sin embargo, se observó una clara disminución en promedio (19%) del pH final comparado con el pH inicial de las muestras (5.35).

Tabla 4. pH final de las masas fermentadas con MBP y/o levaduras¹

| Muestra ² | pH final ³ |
|----------------------|-------------------------------|
| 11 | 4.58 \pm 0.05 ^a |
| 12 | 4.37 \pm 0.06 ^b |
| 13 | 4.35 \pm 0.03 ^b |
| 14 | 4.27 \pm 0.04 ^c |
| 21 | 4.17 \pm 0.04 ^d |
| 22 | 4.25 \pm 0.04 ^c |
| 23 | 4.22 \pm 0.02 ^{cd} |
| 24 | 4.27 \pm 0.04 ^c |

¹Los datos son media \pm desviación estándar de mínimo tres muestras. Los valores con la misma letra dentro de las columnas no son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

²11: HIC control; 12: HIC con levadura *S. cerevisiae*; 13: HIC con *S. boulardii*; 14: HIC con levadura *S. cerevisiae* y *S. boulardii*; 21: HIC con mix de MBP; 22: HIC con mix de MBP y levadura *S. cerevisiae*; 23: HIC con mix de MBP y levadura *S. boulardii*; 24: HIC con mix de MBP y levadura *S. cerevisiae* y *S. boulardii*.

³El pH inicial de todas las muestras fue de 5.35 \pm 0.08. El pH final fue medido a las 24 horas de fermentación.

2.2. Capacidad microbiana para degradar factores antinutricionales durante la FES de HIC.

La capacidad de MBP y/o levaduras para degradar ácido fítico, alcaloides y oligosacáridos de la HIC fermentada en estado semisólido se pueden observar en la Tabla 5.

Tabla 5. Reducción de factores antinutricionales de HIC fermentadas con MBP y/o levaduras¹

| Muestra ² | Ácido fítico (g/100g) | Alcaloides (%) | Oligosacáridos RSO ³ (g/100g) |
|----------------------|-------------------------|------------------------|--|
| 11 | 1,18±0,03 ^a | 2,43±0,02 ^a | 4,80±0,08 ^a |
| 12 | 0,45±0,03 ^b | 1,63±0,01 ^d | 2,39±0,49 ^c |
| 13 | 0,41±0,02 ^{bc} | 1,81±0,01 ^b | 0,93±0,19 ^{de} |
| 14 | 0,39±0,01 ^c | 1,56±0,01 ^e | 0,57±0,04 ^{ef} |
| 21 | 0,39±0,03 ^c | 1,71±0,05 ^c | 3,37±0,34 ^b |
| 22 | 0,42±0,03 ^{bc} | 1,54±0,02 ^e | 0,21±0,07 ^f |
| 23 | 0,41±0,02 ^{bc} | 1,56±0,04 ^e | 1,34±0,43 ^d |
| 24 | 0,38±0,02 ^c | 1,53±0,01 ^e | 0,17±0,11 ^f |

¹Los datos son media ± desviación estándar de mínimo dos muestras expresados en % de base seca. Los valores con la misma letra dentro de las columnas no son significativamente diferentes a $p < 0,05$.

²11: HIC control; 12: HIC con levadura *S. cerevisiae*; 13: HIC con *S. boulardii*; 14: HIC con levadura *S. cerevisiae* y *S. boulardii*; 21: HIC con mix de MBP; 22: HIC con mix de MBP y levadura *S. cerevisiae*; 23: HIC con mix de MBP y levadura *S. boulardii*; 24: HIC con mix de MBP y levadura *S. cerevisiae* y *S. boulardii*.

³RSO (rafinosa, estaquiosa, verbascosa). Peso expresado como mili equivalentes de estaquiosa.

El ácido fítico en las muestras de harinas de masas fermentadas no presentaron una diferencia estadística significativa variando de 0,38 a 0,45 g/100g. Sin embargo, hubo una disminución en promedio de 2.9 veces con respecto a la harina control (11), la cual tuvo el mayor contenido de ácido fítico (1,18 g/100g).

Por otro lado, en los alcaloides la harina control (11) es la que presenta mayor cantidad (2,4%). Interesantemente, las muestras de harinas fermentadas presentaron una disminución en promedio del 67%. Habiendo una mayor reducción en las muestras en las que los microorganismos actúan en conjunto, entre levaduras o levaduras con MBP.

El contenido de RSO en las muestras de harinas fermentadas disminuyó. Siendo las muestras fermentadas con MBP (21) y MBP/levaduras (24) las que presentaron la mayor y menor cantidad (3,37 y 0,17 g/100g, respectivamente). Teniendo en cuenta que la muestra con *S. cerevisiae* también presentó uno de los contenidos más elevados (2,39 g/100g), no obstante en conjunto con la MBP hubo una disminución del 96%. Lo que no sucedió con la

muestra fermentada con *S. boulardii*, que tuvo un valor bajo (0,93 g/100g) y en conjunto con la MBP que disminuyó el 72%.

2.3. Efecto de la fermentación en la composición química proximal, reducción de factores antinutricionales y funcionalidad de harinas integral y desamargada de chocho.

El análisis estadístico de las variaciones en la composición química proximal y la reducción de factores antinutricionales, determinó que las mejores características de FES para las HIC, se obtuvieron usando en conjunto MBP y las dos levaduras estudiadas (*S. cerevisiae s.p* y *S. cerevisiae var. boulardii*), muestra 24 (Tabla 1). Tratamiento que de aquí en adelante llamaremos FES-24.

2.3.1. Comparación de la composición química proximal y la reducción de factores antinutricionales con el tratamiento FES-24.

La variación en la composición química proximal y la reducción de factores antinutricionales elaborados con FES-24 pueden observarse en la Tabla 6.

Tabla 6. Efecto en la composición química proximal y reducción de factores antinutricionales de las muestras procesadas con FES-24

| Parámetros | Muestras ³ | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | HIC | FES-24 (HIC) | HLC | FES-24 (HLC) | |
| Química proximal | | | | | |
| Humedad | (%) | 11,13±0,32 ^c | 57,28±1,37 ^b | 4,29±0,25 ^d | 67,86±4,29 ^a |
| Proteína | (%) | 38,64±1,65 ^d | 47,17±0,11 ^c | 53,25±1,24 ^b | 57,16±0,29 ^a |
| Fibra | (%) | 9,12±0,32 ^a | 8,63±0,05 ^b | 3,02±0,12 ^c | 2,87±0,09 ^c |
| Grasa | (%) | 15,20±0,44 ^d | 17,11±0,06 ^c | 23,41±1,93 ^b | 26,67±0,16 ^a |
| Cenizas | (%) | 2,87±0,53 ^a | 2,45±0,03 ^a | 1,69±0,07 ^b | 1,66±0,09 ^b |
| Carbohidratos | (%) | 34,17±1,63 ^a | 24,65±0,08 ^b | 18,63±1,38 ^c | 11,64±0,41 ^d |
| Factores antinutricionales | | | | | |
| Alcaloides | (%) | 2,47±0,06 ^a | 1,68±0,04 ^b | 0,12±0,00 ^c | 0,12±0,00 ^c |
| Ácido fítico | (g/100g) | 1,24±0,02 ^a | 0,40±0,01 ^c | 0,72±0,06 ^b | 0,26±0,01 ^d |
| Oligosacáridos no digeribles | (g/100g) | 5,93±0,27 ^a | 0,22±0,04 ^b | ND | ND |
| RSO ⁴ | | | | | |

¹FES-24 horas de fermentación a una temperatura de 37°C y 76% HR.

²Los datos son media \pm desviación estándar de mínimo tres réplicas expresados en % de base seca. Los valores con la misma letra dentro de las columnas no son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

³HIC: harina integral-cruda; HLC: harina lavada-cocida; FES-24 (HIC): harina integral-cruda con MBP y levadura *S. cerevisiae* y *S. boulardii*; FES-24 (HLC): harina lavada-cocida con MBP y levadura *S. cerevisiae* y *S. boulardii*.

⁴RSO (rafinosa, estaquiosa, verbascosa). Peso expresado como mili equivalentes de estaquiosa.

La humedad varió de acuerdo al tratamiento dado a la harina o masa. En cuanto a la fibra, como se esperaba, la HIC, procesada con el grano entero, presentó un 67% más que su contraparte elaborada solo con el cotiledón (HLC), mientras que en cada una de sus harinas fermentadas disminuyeron aproximadamente en un 1%. Un efecto contrario fue observado con respecto a las grasas que aumentaron en un 1% en cada harina fermentada en relación a sus contrapartes no fermentadas (Tabla 6). Finalmente, los proximales mostraron que tanto la HIC como la HLC, una vez fermentadas, redujeron sus contenidos de CHO en promedio de 1.4 veces.

Los procesos de FES-24 favoreció la degradación de los factores antinutricionales, la cantidad de ácido fítico disminuyó en 3.1 veces en la HIC y 2.8 veces en HLC. Por otro lado, las muestras de HLC no fueron afectadas (0,12%) en su contenido ya bajo de alcaloides, confirmándose la que la HIC presentó una disminución del 32%. Finalmente, en relación a la degradación de RSO, estas no fueron detectables en las HLC y su harina fermentada, mientras que la harina fermentada de HIC verificó una pérdida del 96% de RSO con respecto a ésta.

Tabla 7. Variación de las azúcares reductoras en harinas de chocho fermentadas con el tratamiento FES-24^{1,2}

| Azúcares reductores (g/100g) | Muestra ³ | | | |
|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | HIC | FES- 24 (HIC) | HLC | FES-24 (HLC) |
| D-Glucosa | 0,09 \pm 0,01 ^a | 0,06 \pm 0,00 ^b | 0,02 \pm 0,00 ^c | 0,01 \pm 0,00 ^d |
| Sucrosa | 0,79 \pm 0,08 ^a | 0,01 \pm 0,00 ^b | 0,01 \pm 0,01 ^b | 0,00 \pm 0,00 ^b |

¹FES-24 tuvieron 24 horas de fermentación a una temperatura de 37°C y 76% HR.

²Los datos son media \pm desviación estándar con mínimo dos muestras expresados en % de base seca. Los valores con la misma letra dentro de las columnas no son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

³HIC: harina integral-cruda; HLC: harina lavada-cocida; FES-24 (HIC): harina integral-cruda con MBP y levadura *S. cerevisiae* y *S. boulardii*; FES-24 (HLC): harina lavada-cocida con mix de MBP y levadura *S. cerevisiae* y *S. boulardii*.

La variación de las azúcares reductoras en las harinas fermentadas con el tratamiento FES-24 se puede apreciar en la tabla 7. Tanto la D-Glucosa y sucrosa disminuyeron durante la FES-24 de las harinas. Cabe señalar que la HLC presentaron valores de sucrosa cercanos a cero; sin embargo, el proceso de fermentación logró que la HIC iguale los valores de esta azúcar presentes en la HLC, con una disminución de 0,79 a 0,01 g/100g.

Tabla 8. Variación del pH de las masas fermentadas con el tratamiento FES-24^{1,2}

| Muestra ² | pH inicial | pH final ³ |
|----------------------|------------------------|------------------------|
| FES-24 (HIC) | 5,10±0,03 ^b | 4,55±0,01 ^a |
| FES-24 (HLC) | 5,35±0,08 ^a | 4,14±0,01 ^b |

¹Los datos son media ± desviación estándar de mínimo tres muestras.

²FES-24 (HIC): harina integral-cruda con MBP y levadura *S. cerevisiae* y *S. boulardii*; FES-24 (HLC): harina-lavada cocida con MBP y levadura *S. cerevisiae* y *S. boulardii*.

³El pH final fue medido a las 24 horas de fermentación.

Los pHs finales de las masas fermentadas con el tratamiento FES-24 (Tabla 8) con cualquiera de las dos harinas, disminuyeron. HLC fueron menores con respecto a las HIC, confirmando el desarrollo de un proceso de fermentación en las masas.

2.4. Determinación de la funcionalidad.

Las características funcionales de las harinas fermentadas de chocho (Tabla 9) mostraron que el IAA, ISA y PH fueron afectados positivamente por FES-24 en los dos tipos de harinas tratadas, resultados especialmente significativos en la HIC. Por otra parte, el FES-24 decreció el IAG en un 12% en HLC y 17% en HIC, mientras que el IAE en la harina integral disminuyó 8 puntos su actividad, sin registrarse una variación significativa en la HLC. Finalmente, FES-24 mejoró el IDP tanto de las harinas integrales y desamargadas, siendo la harina fermentada de la HLC la de mejor actividad (12%).

Tabla 9. Características funcionales de las harinas de chocho integral y desamargada fermentadas con MBP, *S. cerevisiae* sp y *S. cerevisiae* var. *boulardii*^{1,2}

| Muestra ³ | Propiedades funcionales ⁴ | | | | | |
|-------------------------|--------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | IAA (g/g) | ISA (%) | PH (g/g) | IAG (%) | IAE (%) | IDP (%) |
| HIC | 5,98±0,13 ^c | 8,39±0,27 ^a | 2,21±0,15 ^d | 168,5±2,3 ^b | 45,8±1,6 ^a | 65,5±2,3 ^a |
| HLC | 3,27±0,04 ^b | 0,61±0,06 ^b | 3,28±0,02 ^b | 174,0±1,9 ^a | 39,0±1,2 ^b | 24,9±0,9 ^b |
| FES-24 (HIC) | 3,49±0,03 ^a | 0,76±0,01 ^b | 2,77±0,04 ^c | 139,9±4,6 ^d | 38,0±0,6 ^b | 22,7±0,1 ^c |
| FES-24 (HLC) | 3,48±0,03 ^a | 0,79±0,04 ^b | 3,61±0,07 ^a | 153,2±2,0 ^c | 38,8±0,8 ^b | 12,0±0,1 ^d |

¹FES-24 (HIC) tuvieron 24 horas de fermentación a una temperatura de 37°C y 76% HR.

²Los datos son media ± desviación estándar mínimo de tres réplicas expresados en % de base seca. Los valores con la misma letra dentro de las columnas no son significativamente diferentes a $p < 0.05$.

³HIC: harina integral-cruda; HLC: harina lavada-cocida; FES-24 (HIC): harina integral-cruda con MBP y levadura *S. cerevisiae* y *S. boulardii*; FES-24 (HLC): harina lavada-cocida con mix de MBP y levadura *S. cerevisiae* y *S. boulardii*.

⁴IAA Índice de absorción de agua; ISA Índice de solubilidad de agua; PH Poder de hinchamiento; IAG Índice de absorción de grasa; IAE Índice de actividad emulsionante; IDP Índice de dispersabilidad de proteínas.

CAPITULO III

DISCUSION

Una vez realizados los análisis se determinaron que la harina fermentada con las bacterias probióticas y las dos levaduras (muestra 24), fue la que presentó los mejores parámetros en cuanto a lo nutricional y reducción de factores antinutrimientales. Esta mezcla de microorganismos se inoculó en harina integral-cruda (HIC) y en la harina lavada-cocida (HLC) con el fin de ver cual harina tiene mejores resultados.

Al finalizar los análisis proximales de las diferentes harinas fermentadas de chocho, así como de la muestra control se pudo observar de manera general que los resultados obtenidos tienen relación a los reportados por otros autores. De acuerdo a Caicedo y Peralta, reportan valores de 41,2% para proteína y 17,54% para grasa, esto en el grano de chocho amargo; sin embargo, en el chocho desamargado estos valores se elevan presentando 51,06% de proteína y 20,37% grasa. Esto está en concordancia con las muestras de harinas fermentadas que fueron analizadas en el presente estudio, teniendo en promedio 45,4% de proteína y 17,2% de grasa en las muestras fermentadas. El incremento de la proteína se puede deber a la sintetización de una nueva proteína gracias a que las enzimas de la microflora hidrolizaron los enlaces entre el nutriente y las enzimas para liberar aminoácidos (Onoja y Obizoba), y en el caso de las muestras que fueron desamargadas por el proceso tradicional porque se eliminan los carbohidratos solubles en agua (Schoeneberger, et al.), pasa lo mismo de acuerdo a Caicedo y Peralta, ya que se pierden los carbohidratos solubles y ciertos minerales, produciéndose una concentración de otros componentes como proteína. En el caso del incremento de las grasas no se pudo encontrar una posible causa ya que los autores Igbabul, Hiiikyaa y Amove reportan que la grasa puede verse incrementada por una descomposición de las moléculas grandes de grasa en ácidos grasos simples. Sin embargo, en el estudio realizado no se puede decir que se debe al número de enlaces rotos ya que la técnica utilizada mide el total de grasas, además no se encontró en bibliografía que las bacterias o levaduras utilizadas sean productoras de grasa.

Se observó que hubo una diferencia significativa en cuanto al contenido de fibra entre la HIC y la HLC. Esto se puede atribuir al proceso de elaboración de las harinas, ya que la HLC es descascarada. Sin embargo, la disminución de fibra entre las harinas integrales se le puede atribuir a un ablandamiento de los tejidos fibrosos en el proceso de fermentación (Igbabul, Amove y Twadue). En la muestra HLC se pudo observar una pérdida en las cenizas, Carvajal-Larenas, Van Boekel y Koziol reportan que es por la lixiviación de minerales solubles en agua. Así mismo, hubo una disminución de carbohidratos, esto puede ser por la conversión de oligosacáridos en azúcares simples o a la utilización del nutriente como fuente de energía por los microorganismos para su crecimiento y metabolismo (Igbabul, Hiiikyaa y Amove).

Según (Fajardo y Sarmiento) las levaduras rompen las moléculas de sucrosa produciendo glucosa para poder alimentarse. Esto último se pudo observar de manera clara, ya que en

todas las muestras de harinas fermentadas con una o dos levaduras hay una clara disminución de sucrosa. Además, se ha demostrado que en la fermentación con *S. cerevisiae* se incrementa la presencia de glucosa. Camacho, et al. reportan que el *Lactobacillus acidophilus* es una bacteria que fermenta la sucrosa y glucosa a compuestos de ácido láctico y de sabor. Según Fritsh, Vogel y Toelstede, el *Lactobacillus plantarum* puede llegar a degradar el contenido total de galactosa y sacarosa en 24 horas, lo que indica que los mono y disacáridos son la fuente de alimento principal de este microorganismo.

En cuanto a los resultados obtenidos en el pH se puede apreciar que tuvieron una tendencia ácida. Este cambio ocurre gracias a que las MBP generan ácido láctico de manera rápida, Camacho, et al. indica que la bacteria *L. acidophilus* es una de las que más rápido genera ácido láctico. Por otro lado, las levaduras también intervienen en el pH, el nitrógeno soluble que la levadura incorpora a su metabolismo suele ser administrado en forma de sales amónicas de ácido fuerte; la asimilación del amonio por la levadura deja en libertad los ácidos que afectan grandemente al pH, disminuyéndolo de 6 a 5 unidades (García Olmedo).

De manera interesante la fermentación ayudó en la disminución de alcaloides. En un estudio realizado en harina de cocoyam (*Colocasia esculenta*) se reportó que con la ayuda de la fermentación disminuyeron los valores iniciales de alcaloides en un 18% a las 24 horas de fermentación, sin embargo, el contenido inicial es de 0,11% (Igbabul, Hiikyaa y Amove). Por otro lado, Camacho et al. reportan la disminución de alcaloides en la fermentación realizada por el *Lactobacillus acidophilus*. Su eliminación en la muestra HLC se debió a los lavados que se le aplicaron, esto gracias a que los alcaloides en su estado natural se encuentran en forma de sales, los cuales son solubles en soluciones de ácidos en agua o hidroalcohólicas (Caiza Ayala; Carvajal-Larenas, Van Boekel y Koziol). Carvajal-Larenas, Van Boekel y Koziol también señalan que la lixiviación tiene efectos positivos sobre su eliminación gracias a la adición de agua en la desamargado tradicional. No obstante, se recomienda darle una mejora ecológica al proceso tradicional en términos de ahorro de agua y tiempo.

La disminución de ácido fítico encontrada en las muestras analizadas son en promedio de 65% en las muestras fermentadas y de 68% en las muestras lavadas, los cuales son bajos en comparación a lo reportado por (Riera Sánchez) de 82%. Sin embargo, hay que tener en cuenta que su metodología se basa en que el chocho está cocido. Según (Riera Sánchez) el ácido fítico disminuye gracias al aumento de la actividad fitasa, la cual cataliza la hidrólisis del ácido fítico en myo-inositol, fosfatos y fosfatos inorgánicos. Además, las sales de Mg y Ca presentes en el ácido fítico tienden a ser solubles cuando se encuentran en un medio ácido como el que se presentó en nuestras masas que tuvieron un pH en promedio de 4.31 (Camacho, et al.). De acuerdo a Fritsh, Vogel y Toelstede, una fermentación realizada a semillas de *Lupinus*, luego de remojo y pasteurizado, con *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus buchneri* dio como resultado la reducción de fitatos, por otro lado Fritsh, Vogel y Toelstede reporta que el *Lactobacillus plantarum* disminuyó el ácido fítico en 54,8% en un

caldo MRS y del 14% en la harina de chocho, esto gracias a que el *Lactobacillus* tiene una actividad fitasa que cataliza la hidrólisis de ácido fítico a fosfatos miositol más bajos.

En cuanto al contenido de RSO, la levadura *S. cerevisiae* es la que menos actúa sobre estos oligosacáridos; sin embargo en unión con las bacterias probióticas logra mejores resultados, ya que estas disminuyen estos azúcares no digeribles un 30% actuando solas. Fritsh, Vogel y Toelstede reportaron que el *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus fermentum* consumen de manera más fácil los oligosacáridos como estaquiosa y rafinosa (Camacho, et al.); no obstante se debe tener en cuenta que en el estudio de Fritsh, Vogel y Toelstede no se realizó control sin microorganismos adicionados, ya que la degradación de estas sustancias también se puede deber a enzimas endógenas vegetales como la α -galactosidasa o a la fitasa. Además, el *Bifidobacterium* degrada la rafinosa y estaquiosa, el crecimiento de este microorganismo es estimulado por la presencia de oligosacáridos no digeribles, degradando un 23% de estaquiosa (Fritsh, Vogel y Toelstede).

El tratamiento térmico no es favorable cuando hay presencia de oligosacáridos no digeribles y azúcares, como es el caso del autoclavado ya que se pueden formar compuestos de Maillard (Jul, et al.). Una de las razones por la cual la muestra lavada como su fermentada presentaron ausencia de oligosacáridos no digeribles en su composición puede ser porque parte de estos compuestos están ubicados en la cáscara (Jul, et al.)

Efecto en las características funcionales.

El índice de absorción de agua (IAA) está relacionado con algunos factores como el perfil de aminoácidos, pH, tratamiento térmico, cantidad de proteína, presencia de grasa, entre otros; además, el remojo, fermentación o germinación aumentan la absorción de agua debido a la desnaturalización de las proteínas que conduce a una mayor hidrofiliidad (Carvajal-Larenas, Linnemann y Nout). Gracias a estos factores se observó un incremento en promedio del 72% en el IAA en las muestras analizadas (Tabla 9) en el presente trabajo de investigación.

En la harina de papa se reporta 7,45% de índice de solubilidad de agua (ISA), el cual se atribuye al alto contenido de grupos fosfato en la amilopectina, los cuales generan una repulsión en las cadenas adyacentes, incrementando la hidratación por el debilitamiento de los enlaces dentro de la parte cristalina del gránulo (Rodríguez-Sandoval, Lascano y Sandoval). Teniendo en cuenta que la papa cruda presenta 0,54% de fósforo (Granito, et al.) y el chocho crudo tiene en su composición 0,60% (Caicedo y Peralta).

El poder de hinchamiento (PH) se vio mejorado por el proceso de fermentación, este incremento se puede deber a una gelatinización, en la cual el gránulo del almidón se hincha, sufre ruptura y simultáneamente se libera al exterior la amilosa, formando una red tridimensional (Arriciaga y Prieto). Por lo que se puede deducir que la ruptura de las cadenas de amilopectina, en este caso, producen un aumento del pH. Rodríguez-Sandoval, Lascano y Sandoval reportan valores de 2,43 g/g para la quinua y 1,96 g/g para el trigo,

siendo estos valores analizados en los productos crudos. En el presente estudio la muestra de harina integral cruda de chocho presentó 2,2 g/g.

El índice de absorción de grasa puede disminuir luego del proceso de fermentación debido al aumento de grasa durante el mismo, lo que probablemente disminuye la hidrofobicidad del sistema (Igbabul, Bello y Ani).

Las propiedades emulsificantes están relacionadas con la cantidad de proteína soluble e insoluble y de otros componentes; la capacidad de formar emulsiones depende del balance de los grupos hidrofílicos y lipofílicos presentes en la harina (Chaparro, et al.). En la harina de guanábana se reportan un 48% del IAE y luego del tratamiento una disminución del 21% (Chaparro, et al.); en las muestras analizadas hay una disminución promedio del 17%.

Luna Jiménez reporta que una harina con mínimo tratamiento tendrá valores altos de índice de dispersabilidad de proteína, mientras que una muestra completamente cocida presentará valores entre 10 – 20. Estos valores bajos indican una mejor calidad nutricional según (Iwe, Zuilichem y Ngoddy). Mientras valores más elevados presente, menos dispersabilidad proteica tendrá.

CONCLUSION

El chocho (*Lupinus mutabilis*) es una leguminosa conocida por su elevada cantidad de proteína (37%) y grasa (15%). Luego de realizar la fermentación, los respectivos análisis químicos y de degradación de factores antinutrientales se puede concluir que la muestra fermentada con la mezcla de bacterias probióticas y las dos levaduras tiene las mejores características. No obstante, la muestra realizada mediante el proceso tradicional, luego de ser analizada presentó muy buenos resultados en su composición y degradación de compuestos antinutrientales, a excepción de las cenizas, la cual disminuyó significativamente. Ambas muestras mostraron la capacidad de degradar el ácido fítico y los oligosacáridos.

Además, se pudo observar que gracias a la fermentación si es posible reducir el nivel de alcaloides que presenta el chocho; sin embargo, no se disminuyeron hasta estar dentro de los parámetros que permite la norma, 0.02 – 0.07 % (INEN NTE 2390:2004), se recomienda realizar estudios variando los parámetros de fermentación y tiempo para determinar si es posible una mayor disminución de estos fitoquímicos.

Luego de realizar la funcionalidad de las muestras seleccionadas, se pudieron obtener resultados favorables gracias a la fermentación aumentando su absorción de agua, poder de hinchamiento y dispersabilidad proteica.

Gracias a esto se puede concluir que estas harinas de masas fermentadas darán buenos resultados en su futuro uso en panificación. Para lo cual se utilizará el método propuesto con su respectiva inoculación de microorganismos para elaborar masas esponja de harina fermentada de chocho.

BIBLIOGRAFIA

- A.O.A.C. Official Methods of the Association for Analytical Chemists. E.U.A: (19a. Ed.) Washington. DC - USA. 2012.
- Apunte Pinos, German Patricio, Genaro Octavio León Idrovo, Fabiola, Cornejo. "Utilización de harina de chocho (*Lupinus mutabilis*) como ingrediente en la elaboración de pan". BS tesis. 2012.
- Allauca Chávez, Viviana Verónica. "Desarrollo de la tecnología de elaboración de chocho (*Lupinus mutabilis sweet*) germinado fresco para aumentar el valor nutritivo del grano". Escuela Superior Politécnica de Chimborazo: INIAP Archivo Histórico, 2005. Web.
- Arriaga, Geovanna, y Graciela Prieto. "Efecto del tiempo de germinación en las características de hidratación de la harina y gel de arroz". BS tesis. 2013
- Bartkiene, Elena, et al. "Influence of the addition of lupin sourdough with different lactobacilli on dough properties and bread quality." *International Journal of Food Science & Technology* 48.12 (2013): 2613-2620. Web.
- Caicedo, Carlos, y Eduardo Peralta. "Zonificación potencial, sistemas de producción y procesamiento artesanal del chocho (*Lupinus mutabilis sweet*) en Ecuador." *INIAP* (2000). Web.
- Caiza Ayala, Jimena Elizabeth. "Obtención de hidrolizado de proteína de chocho (*Lupinus mutabilis*) a partir de harina integral." BS tesis. Quito. 2011. Web.
- Camacho, et al. "Nutritional quality of lupine (*Lupinus albus cv. Multolupa*) as affected by lactic acid fermentation." *International journal of food microbiology* 14.3-4 (1991): 277-286. Web.
- Cameán, A. M., and M. Repetto. *Toxicología Alimentaria*. Madrid: Editorial Díaz de Santos, 2006. Google libros. Web.
- Carvajal-Larenas, F. E., et al. "Effect of Processing on the Diffusion of Alkaloids and Quality of *Lupinus mutabilis Sweet*." *Journal of food processing and preservation* 38.4 (2014): 1461-1471. Web.
- Carvajal-Larenas, F. E., et al. "*Lupinus mutabilis*: Composition, Uses, Toxicology, and Debittering." *Critical reviews in food science and nutrition* 56.9 (2016): 1454-1487. Web.
- Chaparro, Sandra P., et al. "Propiedades funcionales de la harina y de los aislados proteicos de la semilla de guanábana (*Annona muricata*)." *UDCA Actualidad & Divulgación Científica* 17.1 (2014): 151-159. Web.

- Fajardo Castillo, Erika Esperanza y Sandra Constanza Sarmiento Forero. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. BS tesis. 2007. Web.
- Fritsch, C., R. F. Vogel, y S. Toelstede. "Fermentation performance of lactic acid bacteria in different lupin substrates—influence and degradation ability of antinutritives and secondary plant metabolites." *Journal of applied microbiology* 119.4 (2015): 1075-1088. Web.
- García Olmedo, Francisco. "Papel de la fermentación en la fabricación del pan." *Cereales* 173 (1964): 13-15. Web.
- Granados, Clemente, et al. "Propiedades funcionales del almidón de sagú (*Maranta arundinacea*)." *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial* 12.2 (2014): 90-96.7. Web.
- Granito, Marisela, et al. "Valor nutricional y propiedades funcionales de *Phaseolus vulgaris* procesada: un ingrediente potencial para alimentos." *Interciencia* 34.1 (2009). Web.
- Igbabul, B. D., J. Amove, and I. Twadue. "Effect of fermentation on the proximate composition, antinutritional factors and functional properties of cocoyam (*Colocasia esculenta*) flour." *African Journal of Food Science and Technology* 5.3 (2014): 67-74. Web.
- Igbabul, B. D., F. A. Bello, and E. C. Ani. "Effect of fermentation on the proximate composition and functional properties of defatted coconut (*Cocos nucifera* L.) flour." *Sky Journal of Food Science* 3.5 (2014): 034-040. Web.
- Igbabul, Bibiana, Orgem Hiikyaa, and Julius Amove. "Effect of fermentation on the proximate composition and functional properties of mahogany bean (*Azelia africana*) flour." *Current Research in Nutrition and Food Science Journal* 2.1 (2014): 01-07. Web.
- Ijarotimi Oluwole, Steve. "Influence of germination and fermentation on chemical composition, protein quality and physical properties of wheat flour (*Triticum aestivum*)." *Journal of Cereals and Oilseeds* 3.3 (2011): 35-47. Web.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. *Harinas de origen vegetal. Determinación de la ceniza*. Quito, NTE INEN 520, 2013. Web.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. *Harinas de origen vegetal. Determinación de la proteína*. Quito, NTE INEN 519, 2012. Web.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. *Leguminosas. Grano desamargado de chocho, Requisitos*. Quito, NTE INEN 2390, 2004. Web.
- Jul, Lone Blanner, et al. "Lupin seed (*Lupinus albus* and *Lupinus luteus*) as a protein source for fermentation use." *Industrial crops and products* 18.3 (2003): 199-211.

- Karnpanit, Weeraya, et al. "Effect of cultivar, cultivation year and dehulling on raffinose family oligosaccharides in Australian sweet lupin (*Lupinus angustifolius* L.)." *International Journal of Food Science & Technology* 51.6 (2016): 1386-1392. Web.
- Luna Jiménez, Alfonso de. "Composición y procesamiento de la soya para consumo humano." *Investigación y ciencia* 15.37 (2007). Web.
- Martins, Silvia, et al. "Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review." *Biotechnology advances* 29.3 (2011): 365-373. Web.
- Olagnero, Gabriela, et al. "Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos." *Diaeta* 25.121 (2007): 20-33. Web.
- Onoja, U. S., and I. C. Obizoba. "Nutrient composition and organoleptic attributes of gruel based on fermented cereal, legume, tuber and root flour." *J. Trop. Agric. Fd. Environ. Ext* 8.3 (2009): 162-168. Web.
- Puerta Quintero, Gloria. "Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café." *Centro Nacional de Investigaciones de Café* (2013): 120-178. Web.
- Riera Sánchez, María Belén. "Estudio de la acción fuertemente quelante el ácido fítico como factor antinutricional en granos andinos y su incidencia en la baja biodisponibilidad de minerales". BS tesis. 2011. Web.
- Rodríguez-Sandoval, Eduardo, Alexandra Lascano, y Galo Sandoval. "Influencia de la sustitución parcial de la harina de trigo por harina de quinoa y papa en las propiedades termomecánicas y de panificación de masas." *UDCA Actualidad & Divulgación Científica* 15.1 (2012): 199-207. Web.
- Schoeneberger, H., et al. "Composition and protein quality of *Lupinus mutabilis*." *The Journal of nutrition* 112.1 (1982): 70-76. Web.
- Taha, F. S., y M. A. Ibrahim. "Effect of degree of hydrolysis on the functional properties of some oilseed proteins." *Grasas y Aceites* 53.3 (2002): 273-281. Web.
- Torres, Vanessa, et al. "Procesos de panificación en la industria alimentaria." *Higiene y Sanidad Ambiental* 11 (2011): 739:745. Web.
- Ulloa, José Armando, et al. "El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos." *Revista Fuente* 3.8 (2011).
- Villacreses Freire, Ney Rodrigo. "Evaluación del procesamiento artesanal del chocho (*Lupinus Mutabilis Sweet*) sobre el consumo de agua, tiempo empleado y la calidad nutricional y microbiológica". BS tesis. Quito: USFQ, 2011, Marzo del 2011. Web.

ANEXOS

Anexo 1. Inoculación de MBP y las levaduras

| Muestra | Mix de MBP ¹ | Levadura1 ² | Levadura 2 ³ |
|---------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 11 | n/a | n/a | n/a |
| 12 | n/a | 1.25x10 ⁶ UFC/g | n/a |
| 13 | n/a | n/a | 1.25x10 ⁶ UFC/g |
| 14 | n/a | 1.25x10 ⁶ UFC/g | 1.25x10 ⁶ UFC/g |
| 21 | 10x10 ⁶ UFC/g | n/a | n/a |
| 22 | 10x10 ⁶ UFC/g | 1.25x10 ⁶ UFC/g | n/a |
| 23 | 10x10 ⁶ UFC/g | n/a | 1.25x10 ⁶ UFC/g |
| 24 | 10x10 ⁶ UFC/g | 1.25x10 ⁶ UFC/g | 1.25x10 ⁶ UFC/g |

¹Mezcla de bacterias probióticas: *Lactobacillus acidophilus* (1000 millones de UFC), *Lactobacillus casei* (1000 millones de UFC), *Lactobacillus rhamnosus* (440 millones de UFC), *Lactobacillus plantarum* (176 millones de UFC), *Bifidobacterium infantis* (27,6 millones de UFC), *Streptococcus thermophilus* (667 mil UFC).

²Levadura1: *Saccharomyces cerevisiae*.

³Levadura2: *Saccharomyces boulardii*.

Anexo 2. Composición proximal y la degradación de factores antinutricionales de harina integral de chocho autoclavada

Tabla 10. Variación en la composición proximal de harina integral de chocho autoclavada^{1,2}

| Humedad (%) | Proteína (%) | Fibra (%) | Grasa (%) | Cenizas (%) | Carbohidratos (%) |
|-----------------------|------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------------|
| 6,33±0.34 | 38,83±0.31 | 7,16±0.04 | 16,14±0.69 | 3,10±0.28 | 43,77±1.21 |

¹Para la harina control integral autoclavada, luego de obtener la HIC se adicionó agua destilada en relación 1:2.3 y se colocó en un autoclave (Tuttnauer, New York, EEUU) a 115°C durante 10 min.

²Los datos son media ± desviación estándar de mmínimo tres réplicas expresados en % de base seca.

Tabla 11. Reducción de factores antinutricionales de harina integral de chocho autoclavada^{1,2}

| Ácido fítico (g/100g) | Alcaloides (%) | Oligosacáridos RSO³ (g/100g) |
|---------------------------------|--------------------------|---|
| 1,19±0.02 | 2,43±0.02 | 6,49±0.46 |

¹Para la harina control integral autoclavada, luego de obtener la HIC se adicionó agua destilada en relación 1:2.3 y se colocó en un autoclave (Tuttnauer, New York, EEUU) a 115°C durante 10 min.

²Los datos son media ± desviación estándar de mmínimo tres réplicas expresados en % de base seca.

³RSO (rafínosa, estaquiosa, verbascosa). Peso expresado como mili equivalentes de estaquiosa.