

Bebida con potencial nutraceutico elaborada con maiz QPM extrudido y frijol fermentado

Cuauhtémoc Reyes-Moreno, Jorge Milán-Carrillo, Angel Valdez-Ortiz, Francisco Delgado-Vargas, Luis Martín Sánchez-Magaña, Jesús Jaime Rochín-Medina, Roberto Gutiérrez-Dorado

Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Universidad Autónoma de Sinaloa
Culiacán, Sinaloa, México
robe399@hotmail.com

Abstract— The objective of this research was develop a nutraceutical beverage with antioxidant, antihypertensive and antimutagenic potential using a mixture of extruded quality protein maize and fermented bean flours. A single screw extruder and the solid state fermentation process were used to obtain the flours. The mixture of extruded quality protein maize and fermented bean flours (proportion= 60%:40%, respectively) had high antioxidant activity, total phenolic content and antihypertensive capacity, higher than captopril, the main drug used in the control hypertension. The mixture also had strong antimutagenic capacity. A 200 mL portion of the beverage prepared with the mixture contributed with 69-115% of the recommended daily intake of antioxidants. The beverage prepared with the mixture, for their nutraceutical potential, can be used for health promotion and disease prevention, especially the chronic degenerative diseases.

Keyword— *Nutraceutical beverage, QPM maize, Common bean, Extrusion, Solid state fermentation.*

Resumen— El objetivo de esta investigación fue desarrollar una bebida nutraceutica con potencial antioxidante, antihipertensivo y antimutagenico a partir de una mezcla de harinas de maiz de calidad proteínica extrudido y frijol fermentado. Para obtener las harinas se emplearon un extrusor de tornillo simple y el proceso de fermentación en estado sólido. La mezcla de harinas de maiz de calidad proteínica extrudido y frijol fermentado (proporción=60%:40%, respectivamente) presentó una alta actividad antioxidante, alto contenido de compuestos fenólicos totales y alta capacidad antihipertensiva, mayor que captopril, el principal fármaco empleado en el control de la hipertensión arterial. La mezcla también tuvo una capacidad antimutagenica fuerte. Una porción de 200 mL de la bebida preparada con la mezcla contribuyó con el 69-115% de las recomendaciones diarias de la ingesta de antioxidantes. La bebida preparada con la mezcla, por su potencial nutraceutico, puede ser usada para la promoción de la salud y la prevención de enfermedades, principalmente las crónico degenerativas.

Palabras claves— *Bebida nutraceutica, Maiz QPM, Frijol, Extrusión, Fermentación en estado sólido.*

I. INTRODUCCIÓN

Existe evidencia epidemiológica que sugiere que la malnutrición, así como el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas (ECD) pueden atribuirse, al menos parcialmente, a la ingesta de una dieta mal balanceada o inadecuada, a un exceso en el consumo calórico, sedentarismo, así como también a una predisposición genética [1,2]. Recientemente se ha señalado el potencial de cereales y leguminosas integrales, debidamente procesados, como alimentos nutraceuticos por el papel que algunos de sus componentes (compuestos bioactivos) desempeñan en la prevención de ECD, como obesidad, hipertensión, diabetes, enfermedades cardiovasculares y cáncer [3-6].

El Maíz (*Zea mays* L) es el cereal más altamente producido en el mundo, representa una importante fuente de energía, proteínas y otros de nutrimentos tanto para humanos como para animales; sin embargo, la calidad de las proteínas del maiz es pobre debido a que es deficiente en los aminoácidos esenciales lisina (Lys) y triptófano (Trp) [7]. El Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo (CIMMYT) y el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de México desarrollaron 26 híbridos y variedades de maiz de calidad proteínica (QPM, por sus siglas en inglés), que tienen rendimientos y características agronómicas importantes similares a las de maiz

normal, pero contienen casi el doble de Lys y Trp que el maíz normal, por lo que presentan una mejor calidad de su proteína [8]. Fitoquímicos tales como los compuestos fenólicos también se ha encontrado en varios genotipos de maíz y han sido asociados con actividad antioxidante [9,10] y efectos anticarcinogénicos [11].

El Frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) tiene un papel importante en la dieta de los pueblos latinoamericanos, proporcionando entre un 20-40% de proteínas, ácidos grasos esenciales, carbohidratos complejos, vitaminas y minerales, y su consumo se ha asociado con un menor riesgo de padecer cáncer y enfermedades del corazón, estos efectos fisiológicos pueden deberse a algunos fitoquímicos abundantes en el grano, incluyendo polifenoles [12,13].

En términos generales, el maíz y frijol podrían formar una mezcla perfecta para la generación de alimentos altamente nutritivos y saludables. Las proteínas de los granos de maíz y frijol se complementan entre sí, proporcionando a cada uno cantidades significativas de los respectivos aminoácidos limitantes [14]. Paredes-López y col. [15] reportaron un alto PER (relación de eficiencia proteica) para una mezcla 60:40 de maíz y frijol común, el valor PER presentó un aumento del 1 en maíz y 1.4 en frijol al 2,4 en la mezcla. Cuevas-Martínez y col. [16] estudiaron el efecto de la adición de frijol común en ciertas propiedades nutricionales de tortillas de maíz nixtamalizado, ellos encontraron que después de la adición de 25% de frijol común, el contenido de lisina y triptófano en las tortillas aumentó del 56 y 36% al 95 y 84% del perfil de la FAO, respectivamente. Además, la mezcla de maíz y frijol incrementó la capacidad nutracéutica, influyendo positivamente en una o más funciones del cuerpo, mejorando el estado de salud o de bienestar, y/o reducir el riesgo de enfermedades [17].

La extrusión es un proceso de temperatura alta/tiempo corto con numerosas ventajas (versatilidad, productividad alta, costos de operación bajos, eficiencia energética, obtención productos de valor biológico alto, digestibilidad elevada de proteínas) [8]. Esta tecnología se ha utilizado para elaborar diversos productos alimenticios, incluyendo cereales para el desayuno, snacks, alimentos infantiles y harinas precocidas [8,18]. El uso de harinas extruidas tiene varias ventajas ya que el proceso de extrusión causa pre-gelatinización de los gránulos de almidón, lo que resulta en la pérdida del orden molecular y la degradación completa de polímeros con formación de fragmentos altamente solubles. Debido a ello, las suspensiones de harinas precocidas por extrusión son capaces de aumentar rápidamente su viscosidad, con una baja tendencia a formar grumos, ya que los gránulos de almidón modificados muestran capacidad de hinchamiento elevada en condiciones frías y calientes, lo que hace a las harinas extruidas altamente recomendadas para elaborar productos instantáneos [19], tales como bebidas.

La fermentación en estado sólido (FES) es un bioprocesamiento microbiano de un sustrato alimenticio sólido que actúa como soporte físico y fuente de nutrientes en presencia de poco líquido libre superficial [20]. El tempe es un alimento tradicional en Asia obtenido por FES de soya con el hongo *Rhizopus oligosporus*. Muchos otros sustratos han sido empleados para preparar tempe, por ejemplo frijol, garbanzo, arroz, avena, lupino, nuez, trigo, maíz/soya [21-25]. La FES mejora sustancialmente el valor nutricional y características sensoriales de los sustratos, lográndose cambios favorables en la materia prima: incremento de sólidos solubles en agua, solubilidad de las proteínas, digestibilidad proteínica *in vitro*, lisina disponible, relación de eficiencia proteínica (PER) y digestibilidad proteínica corregida por el perfil de aminoácidos (PDCAAS) [26,27]. Además, se ha encontrado que la FES incrementa el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de los granos, mejorando su potencial funcionalidad asociada a la salud [28-30].

Las bebidas nutracéuticas representan uno de los mercados de mayor crecimiento a nivel mundial con una tasa de crecimiento anual del 13,6% entre los años 2002 al 2007 [31]. El principal criterio para la aceptación de este tipo de bebidas es su sabor; por lo tanto, la formulación de bebidas de

alta calidad con un buen sabor es importante para un adecuado nivel de consumo, el cual es requerido para la promoción de la salud y prevención de enfermedades.

El objetivo de esta investigación fue desarrollar una bebida nutracéutica con potencial antioxidante, antihipertensivo y antimutagénico a partir de una mezcla de harinas de maíz QPM extrudido y frijol fermentado.

II. MATERIAL Y METODOS

A. *Materiales*

Como materiales de estudio se utilizaron maíz QPM variedad V 537C y frijol común variedad Azufrado Higuera, los cuales fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Culiacán, Sinaloa, México. Los granos de maíz QPM y frijol fueron limpiados y almacenados a 4-8°C en contenedores herméticamente cerrados hasta su uso. La cepa NRRL 2710 de *Rhizopus oligosporus* fue obtenida de American Type Culture Collection, Manassas, USA.

B. *Obtención de harina de QPM extrudido (HQPME)*

La HQPME se preparó de acuerdo a Gutiérrez-Dorado y col. [8]. Los granos integrales de maíz QPM (lotes de 1 kg) fueron molidos hasta obtener fragmentos que pasaran a través de malla No 40 (0.425 mm), después fueron mezclados con cal [0.21 g cal / 100 g de fragmentos] y agua hasta alcanzar una humedad del 28%. Cada lote se envasó en bolsas de polietileno y se almacenaron durante 12 horas a 4°C, seguido de 1 hora a 25 °C. La cocción por extrusión se realizó en un extrusor de laboratorio de tornillo simple modelo 20 DN equipado con un tornillo de 19 mm de diámetro, 20:1 de longitud/diámetro, relación 1:1 de compresión nominal y boquilla de salida de 3 mm. Las condiciones de operación del extrusor fueron 85°C y 240 rpm. Los extrudidos obtenidos fueron secados (actividad de agua < 0.6) y molidos hasta pasar a través de una malla No 80 (0.180 mm) para obtener harina de QPM extrudido (HQPME). Las harinas fueron envasadas en bolsas de polietileno y almacenadas a 4-8°C hasta su uso.

C. *Obtención de harinas de frijol fermentado (HFF)*

Las HFF fueron elaboradas utilizando el procedimiento descrito por Reyes-Bastidas y col. [24] con algunas modificaciones. Los granos de frijol fueron remojados en solución de ácido acético (pH 3) (relación 1:3, 16 h, 25°C), drenados y descascarillados manualmente. La testa fue secada (contenido de humedad = 11%) a 50°C, molida hasta pasar a través de una malla No 80 (0.180 mm), empacada y almacenada a 4-8°C. Los cotiledones fueron cocidos en la solución de remojo (90°C, 30 min), enfriados (25°C), inoculados con una suspensión de esporas de *Rhizopus oligosporus* (1×10^6 esporas/mL) y colocados en bolsas de polietileno perforadas cada 4 cm. La fermentación en estado sólido (FES) fue llevada a cabo a 34.9°C y tiempos de fermentación de 0, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 y 108 h. Los cotiledones fermentados (tempe) obtenidos con cada tiempo de fermentación fueron secados (50°C, 8h), enfriados (25°C) y molidos hasta pasar malla 80 (0.180 mm). Debido a que la testa de frijol tiene alto contenido de fibra dietaria, minerales y compuestos fenólicos, fue adicionada al tempe de cotiledones de frijol. Esta mezcla de tempe y testa, denominada harina de frijol fermentado (HFF), fue envasada en bolsas de polietileno a 4-8°C hasta su uso.

D. *Elaboración de bebidas y evaluación sensorial*

Para la elaboración de las bebidas, se añadieron 25 g de mezcla de HQPME y HFF (60% HQPME+40%HFF), 6,4 g de edulcorante bajo en calorías (Azúcar BC Metco ®), 1 g de vainillina en polvo en 168 mL de agua purificada; la suspensión se agitó en una licuadora domestica (velocidad media) y una

vez elaboradas las bebidas éstas se pasteurizaron y se envasaron en envases PET de 500 mL, se refrigeraron (4-8°C). Después a estas bebidas se les evaluó sensorialmente su aceptabilidad (A), la cual se realizó con 80 panelistas no-entrenados, empleando una escala LAM (Labeled Affective Magnitude). La escala LAM es una escala bidireccional de 100 mm con una descripción verbal con rangos que van desde -100 (máximo valor de disgusto imaginable) hasta +100 (máximo gusto imaginable) en donde cero (ni me gusta, ni me disgusta) es el punto central. Posteriormente estos valores se transformaron a una escala de 0 a 100 [32]. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

E. Composición proximal

Se utilizaron los métodos oficiales de la AOAC [33] 925.09B, 923.03, 960.52 y 920.39C para determinar humedad, cenizas, lípidos y proteínas, respectivamente. Los carbohidratos se calcularon por diferencia.

F. Perfil de aminoácidos

Se utilizó la metodología descrita por López-Cervantes y col [34] con algunas modificaciones. 50 mg de muestra se sometieron a hidrólisis ácida con 10 mL de HCl 6 M, y se incubó por 24 h a 100°C. La muestra hidrolizada, se filtró y se diluyó 200 veces con agua MilliQ. Se utilizó una alícuota de 300 µL, se secó y se sometió a derivatización con 300 µL de 9-fluorenilmetil-cloroformato (FMOC). Se tomó una alícuota de 20 µL para su análisis, utilizando una columna de escala analítica (4.6 mm x 250 mm) SGE Hypersil ODS C18 mantenida a 38°C y conectada a un sistema HPLC equipado con un detector de fluorescencia LC5100. Se utilizaron las siguientes fases móviles: A: 30 mM de fosfato de amonio en 15:85 (v/v) de metanol/agua; B: 15:85 (v/v) metanol/agua; y C: 90:10 (v/v) acetonitrilo/agua. Se utilizó velocidad de flujo constante de 1.2 mL/min. La detección se llevó a cabo por fluorescencia usando longitudes de onda de excitación y emisión a 270 y 316 nm, respectivamente. Se construyó una curva de calibración usando una mezcla estándar de aminoácidos. Los niveles de triptófano se determinaron utilizando una hidrólisis alcalina. Se mezclaron 25 mg de muestra con 3 mL de 4.2 M NaOH y se incubó en tubos sellados (en atmósfera de N₂) a 120°C por 4 h. Después de la hidrólisis, la muestra se ajustó a pH 9, y se lavó con búffer de boratos (pH 9), filtrado a vacío y después se diluyó a 50 mL con búffer de boratos. Después de la centrifugación, el sobrenadante se filtró (0.45 µm) y se tomó entonces, una alícuota de 20 µL para su análisis como se describió anteriormente. El Triptófano se detectó a 280 nm con detector ultravioleta. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

G. Digestibilidad proteínica *in vitro* (DPIV)

Se determinó de acuerdo al procedimiento recomendado por Hsu y col [35]. Se preparó una disolución multienzimática compuesta por tripsina pancreática porcina tipo IX, quimotripsina pancreática bovina tipo II y peptidasa intestinal porcina grado II. A partir de la harina y agua destilada se prepararon 50 mL de una suspensión acuosa (6.25 mg de proteína/L) con pH ajustado a 8, mientras se agito en un baño con circulación de agua a 37°C, se agregaron alícuotas de 5 mL de disolución multienzimática. A los 10 min de acción enzimática se procedió a la medida de pH de la mezcla. DPIV se calculó de la ecuación: $DPIV = 210.46 - 18.10 X$, donde X = pH después de 10 min. Esta determinación se hizo por triplicado.

H. Calificación química (CQ)

La calificación química es una medida de la calidad de la proteína, basada en su composición de aminoácidos. Este parámetro se calculó dividiendo el aminoácido esencial limitante en la muestra con respecto al contenido del aminoácido en la mezcla de referencia estándar de aminoácidos. La

calificación química se calculó, utilizando el patrón de requerimientos de aminoácidos esenciales de la FAO para niños mayores de 3 años, adolescentes y adultos [36].

I. Relación eficiencia proteínica calculada (C-PER)

Se utilizó la metodología reportada por Satterlee y col [37] y adoptada por la AOAC [33]. Para el cálculo se requiere conocer la DPIV y el contenido de aminoácidos esenciales de la muestra analizada. Se empleó caseína como proteína de referencia. El C-PER se determinó utilizando la ecuación de regresión: $C-PER = -2,1074 + 2,8525(Z) - 0,4030(Z^2)$, donde Z se calculó en base al perfil de aminoácidos y a la DPIV de la muestra y de la proteína de referencia, así como en relación a los valores estándares de la FAO para aminoácidos esenciales.

J. Extracción de compuestos fenólicos libres y ligados

Los compuestos fenólicos libres se extrajeron como lo reportó Dewanto y col. [38] con modificaciones menores. 1 g de muestra molida se mezcló con 10 mL de etanol al 80% durante 10 minutos y después se centrifugó a 2 500 x g durante 10 min y el sobrenadante se concentró a vacío a 45°C y se almacenó a -20°C hasta la evaluación. El residuo fue empleado para la extracción de los compuestos fenólicos ligados de acuerdo con Adom y Liu [39] y Mora-Rochín y col. [10]. El residuo se digirió con 10 mL de NaOH 2 M a 95°C durante 30 minutos, seguido por 1 h a 25°C, con remoción previa de O₂ usando N₂. La mezcla se acidificó (pH <2) con 2 mL de HCl 2 M y los lípidos fueron extraídos con hexano. La solución final se extrajo cinco veces con 10 mL de acetato de etilo, las fracciones de cada extracción se combinaron y se secaron a vacío a 35°C. Los compuestos fenólicos ligados se reconstituyeron en 2 mL de metanol-agua (50:50, v/v). Los extractos se congelaron y almacenaron a -20°C hasta su evaluación. Todas las extracciones se realizaron por cuadruplicado.

K. Determinación de compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos de los extractos libres y ligados se determinó utilizando el método colorimétrico descrito por Singleton y col. [40]. 20 µL de cada extracto se oxidaron con 180 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EE.UU.). Después de 20 min, la absorbancia del color azul resultante se midió a 750 nm utilizando un lector de microplacas (Synergy™ de detección múltiple, BioTek, Inc., Winooski, VT, EE.UU.). Se preparó una curva de calibración usando ácido gálico (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EE.UU.) como estándar y los fenólicos totales se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de muestra (bs, base seca). El contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) se calculó mediante la suma de compuestos fenólicos presentes en extractos de fenólicos libres y ligados. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

L. Determinación de actividad antioxidante por el método ORAC

La actividad antioxidante utilizando el ensayo de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) fue determinada a los extractos hidrófilicos libres y ligados. El ensayo ORAC determina el grado de inhibición antioxidante del radical peroxilo por la transferencia de átomos H [10, 41]. Este ensayo incluye tanto el tiempo de inhibición, así como el grado de inhibición de la oxidación. Este método está basado en el grado de inhibición de la fluoresceína (FL) como sustrato de oxidación y como agente oxidante el generador de radicales libres peroxilo inducido por descomposición térmica del compuesto 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) dihidroclorado (AAPH). La intensidad de FL disminuye a medida que avanza la degeneración oxidativa. Esta intensidad se registra durante 35 minutos después de la adición del azoderivado (AAPH). La descomposición de FL se mide en función del retardo en el decaimiento de fluorescencia, respecto a la presencia o no del antioxidante. Las curvas de caída (la intensidad de fluorescencia respecto al tiempo) se registran y el área entre las dos curvas de

caída (con o sin antioxidante) se calcula. Posteriormente, el grado de protección antioxidante mediada se cuantifica utilizando el antioxidante Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico, un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E) como estándar, para lo cual se construye una curva estándar con diferentes concentraciones de Trolox. La solución de FL (1.2mM) se preparó pesando 39.87 mg de FL, disueltos en 100 mL de buffer de fosfato (PBS)(75 mM, pH 7.4), posteriormente se almacenó en condiciones de refrigeración en ausencia de luz. A partir de la muestra de FL se preparó una solución diluida (10µM). La solución utilizada en este ensayo (0.1 µM) se preparó diariamente, para lo cual se tomaron 0.25 mL de la solución diluida y se le agregaron 25 mL de PBS. La solución de AAPH (200mM) se preparó tomando 207 mg de AAPH mezclándolos con 5 mL de PBS. El estándar utilizado fue 1mM de solución Trolox, la cual se preparó en PBS. Se tomaron 25 µL de muestra del extracto fenólico las cuales se diluyeron en buffer de fosfato 75 mM, fueron transferidas a las celdas del espectrofotómetro (lector de microplacas Synergy™), donde se les adicionó 150µL de FL y 25µL de AAPH se mezclaron e incubaron a 37°C durante 30 min, la determinación de la fluorescencia se realizó en intervalos de 2 min durante 60 min (485 nm para absorción y 538 nm para emisión). Los valores obtenidos tanto para la muestras como para el control se determinaron obteniendo el área bajo la curva. Los valores se expresaron en µmol equivalentes de Trolox (ET)/100 g de muestra seca. Todas las mediciones se hicieron por triplicado.

M. Determinación de actividad antioxidante por el método ABTS

Este ensayo se realizó de acuerdo a lo descrito por Re y col [42]. La actividad antioxidante se determinó a los extractos de compuestos fenólicos libres y ligados por el método ABTS para compuestos hidrofílicos. El ensayo del ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotioazolín-6-sulfónico) (ABTS) está basado en la captación por los antioxidantes del radical catión ABTS·+ generado en el medio de reacción. El radical catión del ABTS posee una coloración verde-azulada con un máximo de absorción a 415 nm y una serie de máximos secundarios de absorción a 645, 660, 734, 815 y 820 nm. Dependiendo de la variante del método ABTS utilizada se emplean distintas longitudes de onda, aunque las más frecuentes son 415 y 734 nm; en este trabajo se empleó una longitud de onda de 734 nm. Para el desarrollo del método se suelen emplear dos estrategias; inhibición y decoloración. En la primera los antioxidantes se añaden previamente a la generación del radical ABTS·+ y lo que se determina es la inhibición de la formación del radical, que se traduce en un retraso en la aparición de la coloración verde-azulada. En la segunda estrategia, los antioxidantes se añaden una vez el ABTS·+ se ha formado y se determina entonces la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical, es decir la decoloración de este. En este trabajo, para el desarrollo del método se empleó la estrategia de decoloración. Finalmente, el grado de protección antioxidante mediada se cuantifica utilizando el antioxidante Trolox como estándar. Según la metodología, el radical ABTS+ se obtuvo tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2.45 mM) incubados a temperatura ambiente (25°C) y oscuridad durante 12-16 h. Después la solución de ABTS+ fue diluida con agua desionizada para obtener una solución de trabajo de ABTS+. La reacción entre la solución de trabajo de ABTS+ y muestras con diferentes concentraciones fueron iniciadas y almacenadas a temperatura ambiente (25°C) hasta que la reacción fue completada. El radical ABTS+ sufrió decoloración debido a la reacción con los antioxidantes. La disminución de coloración se monitoreó en un lector de microplacas (Synergy™) a 734 nm y fue expresada como porcentaje de inhibición de ABTS, la cual fue comparada con una curva estándar de Trolox. Los datos se expresaron como µmol equivalentes de Trolox (ET)/100 g de muestra seca. Todas las mediciones se hicieron por triplicado.

N. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de las muestras se realizó de acuerdo a la metodología de Humiski y Aluko [43] y Adler-Nissen [44]. Las muestras fueron hidrolizadas con la enzima pancreatina (una mezcla de enzimas digestivas) simulando la digestión gastrointestinal. Las muestras fueron mezcladas con agua

desionizada para preparar soluciones al 10%, y después se ajustó la temperatura y el pH a 39°C y 8.0, respectivamente. El tiempo de hidrólisis fue de 2 h. Después de la hidrólisis, las muestras fueron ajustadas a pH 4.0 con HCl 2 M y fueron colocadas en un baño de agua a 95°C por 10 min para inactivar la enzima. Posteriormente, la muestra fue centrifugada (10 000 × g, 30 min, 25°C) y el sobrenadante, conteniendo los hidrolizados, fue recuperado y almacenado a -20 °C.

O. Ensayos in vitro de inhibición de ECA

La actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (I-ECA) de las muestras se determinó de acuerdo al método reportado por Miguel y col [45], con modificaciones. ECA hidroliza hipuril-histidil-leucina (HHL) para generar ácido hipúrico y el péptido His-Leu. La mezcla de reacción, la cual consistió del sustrato HHL y la muestra hidrolizada, fue preparada en buffer ACE (borato de sodio 50 mol/L, conteniendo 0.5 mol/L de cloruro de sodio, pH 8.3) y pre-incubada a 37°C por 5 min, después que ACE fue añadido hasta alcanzar una concentración de 2.5 mU/mL. Diferentes diluciones de cada hidrolizado fueron añadidas e incubadas en la mezcla de reacción antes mencionada por 30 min a 37°C; después de esto, las reacciones fueron detenidas por la adición de 150 µL de solución de HCl (1 mol/L), seguido por la adición de 1 mL de etil acetato, para extraer ácido hipúrico, y mezclado por 1 min. La mezcla fue centrifugada a 14,000 x g a 25°C por 10 min, 750 µL de la fase orgánica fue colectada y transferida a un tubo y evaporada. El residuo fue disuelto en 600 µL de agua y la concentración de ácido hipúrico fue determinada a 228 nm usando agua como blanco. El porcentaje de inhibición fue determinado mediante la siguiente formula: % Inhibición= (Abs control – Abs muestra/Abs control – Abs blanco) x 100. Para determinar el IC₅₀ de las muestras, los datos fueron ajustados a un modelo de regresión no lineal usando la ecuación de Hill's [36].

P. Ensayos in vitro de mutagenicidad y antimutagenicidad

Para este ensayo se utilizó un extracto en etanol al 80% de harina (EEH). Se empleó el ensayo de microsuspensión, una modificación del método de Ames [46,47]. Se usó la cepa YG1024 de *Salmonella typhimurium*. En este ensayo la cepa no requirió de activación metabólica. Sin embargo, para verificar las transformaciones en los extractos (EEH), los ensayos se realizaron con y sin preincubación del EEH con la fracción microsomal S9. A partir de los ensayos se determinó la toxicidad/mutagenicidad del EEH y la actividad antimutagénica. El índice de mutagenicidad (IM) se calculó como la razón entre el número de revertantes inducidas por la sustancia evaluada y el número de revertantes espontaneas. La muestra evaluada es considerada mutagénica si $IM \geq 2$ y citotóxica si $IM \leq 0.6$. La actividad antimutagénica se calculó como porcentaje de inhibición de actividad mutagénica (PI): $PI = (1 - y_1/y_2) \times 100$; donde, y_1 =número de revertantes por plato en presencia de la muestra evaluada (antimutágeno), y y_2 =número de revertantes por plato en ausencia de la muestra evaluada (antimutágeno). La antimutagenicidad se clasifica de acuerdo a los valores de PI: 0–20% negativa, 20–40% débil, 40–60% positiva, 60–90% fuerte, >90% sospecha de toxicidad.

Q. Propiedades fisicoquímicas y funcionales

A las harinas se les determinaron propiedades fisicoquímicas como pH y actividad de agua (a_w) con un potenciómetro e higrómetro, respectivamente. También se les determinaron propiedades funcionales como índice de absorción de agua (IAA), índice de solubilidad en agua (ISA) [48], dispersabilidad [49], capacidad de formación de espuma (CFEs) y estabilidad de espuma (EEs), actividad de emulsión (AEm) y estabilidad de emulsión (EEm) [50] y capacidad de absorción de aceite [51].

R. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) y las medias de los resultados se separaron aplicando la prueba de rango múltiple de Duncan, con un nivel de significancia del 5%.

III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

A. Efecto del tiempo de fermentación sobre la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos totales de frijol

En la Tabla 1 se presenta la actividad antioxidante evaluada por los métodos ORAC y ABTS. Los resultados indicaron que la fermentación en estado sólido (FES) incrementó gradualmente la actividad antioxidante del frijol, evaluada por ambos métodos, a medida que incremento el tiempo de fermentación hasta las 108 horas (Figura 1). Los máximos incrementos de la actividad antioxidante total fueron de 173 y 145%, evaluada por ORAC y ABTS, respectivamente. Diversas investigaciones han demostrado que los productos fermentados presentan actividad antioxidante más elevada que sus correspondientes sustratos sin fermentar [24,52,53]. Sheih y col [54] reportaron que aproximadamente un tercio de la capacidad antioxidante en tempe de soya (producto de la fermentación en estado sólido) se debió a isoflavonas y el resto a péptidos bioactivos derivados de la proteólisis de proteínas de soya durante la fermentación microbiana del grano.

En la Tabla 2 se observa que, al igual que la actividad antioxidante, la FES incrementó gradualmente el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) del frijol, a medida que aumentó el tiempo de fermentación. El máximo CFT se obtuvo a las 108 horas de fermentación con un incremento del 124% con respecto al grano sin procesar. Varios investigadores han sugerido que la enzima fúngica β -glucosidasa cataliza la liberación de agliconas del sustrato, incrementado de esta forma su contenido fenólico [24, 55, 56]. Reyes-Bastidas y col [24] reportaron que el incremento de CFT puede explicar en gran medida el aumento de la actividad antioxidante durante la fermentación de frijol; estos investigadores encontraron una fuerte correlación entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante durante la FES de frijol.

B. Composición química y propiedades fisicoquímicas, funcionales, nutricionales y nutraceuticas de la mezcla de harinas

En la Tabla 3 se muestra la composición química, propiedades fisicoquímicas, funcionales, nutricionales y nutraceuticas de la mezcla de HQPME y HFF (60% HQPME + 40% HFF). La HFF seleccionada para la preparación de la mezcla HQPE+HFF fue aquella que presentó la mayor capacidad antioxidante y el mayor contenido de compuestos fenólicos totales, la cual fue obtenida con el mayor tiempo de fermentación empleado en esta investigación (108 h). La mezcla HQPE+HFF presentó un buen contenido de proteína cruda (17.64%, bs) y excelentes propiedades funcionales, que la hacen adecuada para la preparación y/o fortificación de diferentes alimentos. En esta investigación la propiedad funcional de mayor interés fue la dispersabilidad, ya que es importante para la preparación de bebidas; la mezcla HQPE+HFF presentó un valor alto de esta propiedad (60%), contribuyendo a la elaboración de bebidas estables, con una menor separación de fases. En cuanto a las propiedades nutricionales se encontró que el contenido de aminoácidos esenciales (AAE) de la mezcla fue mayor que los requerimientos para niños mayores de 3 años, adolescentes y adultos, su calificación química de AAE fue 100 y no presentó aminoácido limitante para niños de estas edades, adolescentes y adultos.

Tabla 1. Actividad antioxidante de harinas de frijol crudo y fermentado a diferentes tiempos de FES.

Tiempo Fermentación (h)	ORAC (µmoles ET/100g)			ABTS (µmoles ET/100g)		
	Libres	Ligados	Totales	Libres	Ligados	Totales
crudo	2,018±9 ^g	4,383±12 ^d	6,402±19 ^f	517±23 ^g	4,992±33 ^d	5,509±60 ^e
0	6,480±10 ^e	5,530±64 ^c	12,010±73 ^d	966 ± 27 ^e	3,656±46 ^c	4,622±73 ^e
21	5,827± 14 ^f	5,402±13 ^c	11,230 ±14 ^e	933 ± 60 ^{e,f}	3,747± 32 ^c	4,679 ±14 ^e
36	5,618 ± 56 ^f	6,543±23 ^b	12,162 ±22 ^d	1,432 ±38 ^f	4,149±40 ^b	5,582 ±22 ^e
48	6,582±34 ^{d,e}	7,280±43 ^{a,b}	13,863 ± 42 ^c	2,984±29 ^{d,e}	4,916±48 ^{a,b}	7,900 ± 42 ^{c,d}
60	6,802±24 ^{d,e}	7,549±26 ^a	14,351 ±17 ^c	3,480±15 ^{d,e}	4,994±70 ^a	7,575 ±17 ^d
72	7,042±55 ^{c,d}	6,759±19 ^{a,b}	13,802±66 ^c	3,890±31 ^{c,d}	4,854±40 ^{a,b}	8,745±66 ^c
84	7,350±57 ^c	6,666±14 ^b	14,017±43 ^c	4,673±45 ^c	5,762±220 ^b	10,435±43 ^b
96	8,454± 16 ^b	6,948±93 ^{a,b}	15,402± 78 ^b	5,267± 80 ^b	6,093±27 ^{a,b}	11,360± 78 ^b
108	10,160±21 ^a	7,308±12 ^{a,b}	17,468±20 ^a	6,207±29 ^a	7,298±39 ^{a,b}	13,505±21 ^a

Valores con la misma letra superíndice dentro de una misma columna no son significativamente diferentes.

La mezcla HQPE+HFF tuvo una digestibilidad proteínica *in vitro* (DPIV) y una relación de eficiencia proteínica calculada (C-PER) de 76.2% y 2.0, respectivamente (Tabla 3). Serna-Saldívar y col [57] reportaron, para pan de trigo fortificado con harinas de soja y sésamo desengrasadas DPIV's y C-PER's of 83.1-84.87% y 1.22-1.35, respectivamente.

Alarcón-Valdez y col. [58] prepararon un alimento para niños a base de una mezcla de harinas de QPM extrudido (26.7%) y garbanzo extrudido (73.3%); este alimento tuvo valores de DPIV y C-PER de 87.9% y 1.86, respectivamente.

La mezcla HQPE+HFF también presentó propiedades nutraceuticas sobresalientes. Ésta puede ser considerada una buena fuente de fibra dietaria debido al alto contenido que presentó (24.75%). El valor alto de esta propiedad se debió al empleo de granos integrales y al uso de procesos en los cuales se evitó la pérdida de este ingrediente funcional. La mezcla es una fuente importante de antioxidantes (15,337 µmoles equivalentes de Trolox/100 g de muestra, bs, método ORAC) y compuestos fenólicos (385.21 mg equivalentes de ácido gálico (EGA)/ 100 g muestra, bs). En lo referente a la capacidad antihipertensiva de las mezcla, esta propiedad se determinó *in vitro*, en base al ensayo de inhibición de la principal enzima involucrada en el control de la presión sanguínea, la enzima convertidora de angiotensina (ECA). El valor que se obtiene en esta prueba se conoce como IC₅₀, el cual corresponde a la cantidad de muestra necesaria para inhibir al 50% la actividad de ECA; de esta forma, entre menos cantidad (es decir, entre más bajo sea el valor de IC₅₀) de harina se requiera para la inhibición de ECA, significa que el potencial antihipertensivo de la muestra es mayor. En el caso de la mezcla HQPE+HFF el valor de IC₅₀ obtenido fue de 0.034 µg/mL de suspensión. La mezcla tuvo valores mucho mejores que los reportados en otros trabajos de investigación, tanto para harinas de maíz nixtamalizado, como de frijol y garbanzo cocidos. De igual forma, el potencial antihipertensivo *in vitro* de la mezcla fue mayor que captopril, el principal fármaco empleado en el control de la hipertensión arterial. En cuanto

a la actividad antimutagénica, los extractos de la mezcla analizada no resultaron tóxicos/ mutagénicos hasta 1000 $\mu\text{g}/\text{tubo}$, con un índice de mutagenicidad de ~ 1 , usando la cepa TA98 de *Salmonella typhimurium* y 1-nitropireno (1-NP) como mutágeno, por lo tanto fue posible evaluar su antimutagenicidad. La mezcla mostró los siguientes valores de inhibición de la mutagenicidad: 48.37% (100 $\mu\text{g}/\text{tubo}$), 77.06% (500 $\mu\text{g}/\text{tubo}$) y 77.63% (1000 $\mu\text{g}/\text{tubo}$); lo que nos indica que, a las concentraciones máximas, la mezcla puede considerarse un antimutágeno fuerte.

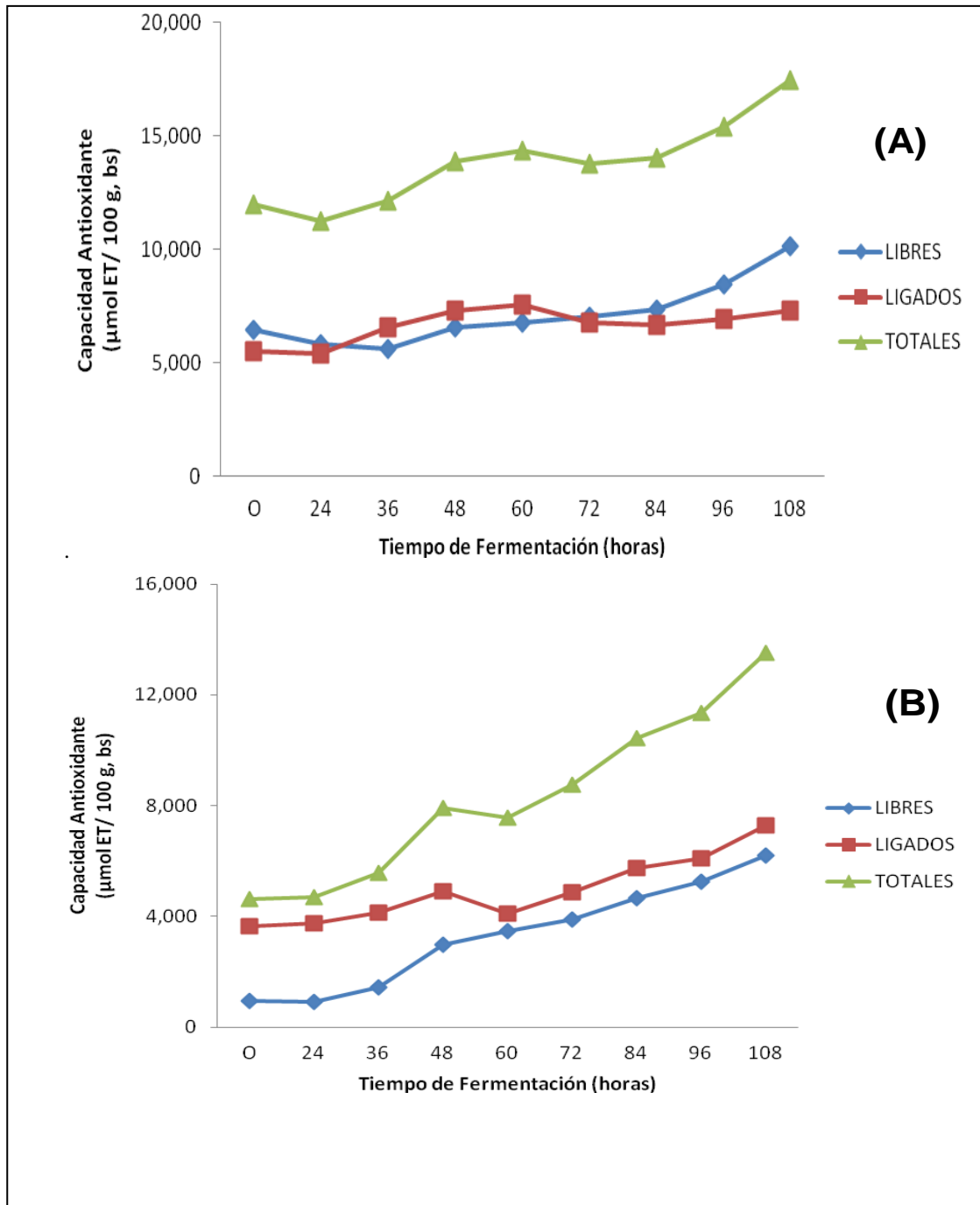


Fig. 1. Actividad antioxidante de frijol fermentado a diferentes tiempos de FES. Métodos ORAC (A) y ABTS (B).

C. *Formulación, composición nutrimental, contenido energetico y actividad antioxidante de la bebida nutraceutica*

La formulación de la bebida se basó en la preparación de bebidas tradicionales y ampliamente consumidas en México, las cuales son producidas a partir de diferentes granos (por ejemplo, arroz, cebada), así como pruebas sensoriales para definir las cantidades de los ingredientes usados. La norma mexicana NMX-F-439-1983 para alimentos y bebidas no alcohólicas fue considerada. Esta norma define una bebida nutricional cuando ésta contiene al menos 1.5% de proteína o hidrolizados proteínicos con una calidad equivalente a la de la caseína; ésta también establece que las bebidas deben contener entre 10 y 25% del principal ingrediente usado para preparar la bebida; éstas pueden contener también alrededor de 2% de etanol, edulcorantes, agentes saborizantes, dióxido de carbono, jugos, pulpa de fruta, vegetales o leguminosas y otros aditivos autorizados por la Secretaría de Salud. Las formulaciones usadas en este estudio contenían 12.5% de la mezcla y 1.98% de proteínas de buena calidad. Además, estas bebidas fueron preparadas con edulcorantes de bajas calorías por dos razones:

1) *para satisfacer las recomendaciones de la Secretaría de Salud, acerca de que una porción de 200 mL de la bebida (alimento) no debe contener más de 140 kcal, y 2) para mantener una alta aceptabilidad sensorial. Una porción de 200 mL de la bebida preparada con 25 g de la mezcla HQPME+HFF contenía 3.97 g de proteínas, 0.86 g de lípidos, 0.26 g de minerales, 23.81 g de carbohidratos y 93 kcal. Esta porción de bebida cubre entre el 30.5% y el 21.0% de los requerimientos diarios de proteína para niños de 1-3 y 4-8 años de edad, respectivamente. La bebida nutraceutica (200 mL) mostró una actividad antioxidante total de 3,450 $\mu\text{mol ET}$, lo cual contribuye entre 69-115% del consumo diario recomendado de antioxidantes (3,000 to 5,000 $\mu\text{mol TE}$) [59]. Los panelistas no-entrenados calificaron con un valor promedio de 79 la aceptabilidad de la bebida (valor correspondiente a un nivel de satisfacción entre “me gusta mucho” y “me gusta extremadamente”). Es de esperarse que esta aceptabilidad de la bebida permita un adecuado consumo de la misma, y con ello poder proveer los beneficios a la salud que puede ocasionar esta bebida.*

IV. CONCLUSIONES

La fermentación en estado sólido (FES) incrementó la actividad antioxidante (AAox) de frijol a medida que aumentó el tiempo de fermentación, evaluada ésta por los métodos ORAC y ABTS. Este proceso también incrementó el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) en el frijol con el aumento del tiempo de fermentación. Los valores más altos de AAox y CFT se obtuvieron a las 108 horas de fermentación con incrementos del 173 y 145% para AAox por los métodos ORAC y ABTS, y 124% para el contenido de CFT, con respecto al grano sin procesar. La mezcla de 60% HQPME + 40% HFF tuvo una dispersabilidad (60%) adecuada para la preparación de bebidas. Esta mezcla cumplió con el perfil de aminoácidos esenciales (AAE) para niños mayores de 3 años, adolescentes y adultos, tuvo calificación química de AAE de 100, no presentó aminoácido limitante para niños mayores de 3 años, adolescentes y adultos, tuvo una digestibilidad proteínica *in vitro* (DPIV) de 76.2% y una relación de eficiencia proteínica calculada (C-PER) de 2.0. La mezcla también presentó una alta AAox (15,337 $\mu\text{moles equivalentes de Trolox/100 g de muestra, bs, método ORAC}$) y alto contenido de compuestos fenólicos (385.21 mg equivalentes de ácido gálico (EGA)/ 100 g muestra, bs), así como, un valor de IC50 (0.034 $\mu\text{g/mL}$), para la capacidad antihipertensiva, mayor que captopril, el principal fármaco empleado en el control de la hipertensión arterial. La mezcla también tuvo una capacidad antimutagénica fuerte de 77.06 y 77.63% de inhibición a las concentraciones de 500 y 1000 $\mu\text{g/tubo}$, respectivamente. Una porción de 200 mL de la bebida preparada con la mezcla cumple con los contenidos de ingrediente, proteína y energía recomendados por la normatividad mexicana y la secretaría de salud; y contribuye con el 69-115% de las recomendaciones diarias de ingesta de antioxidantes. Esta bebida nutraceutica puede ser usada para la promoción de la salud y la prevención de enfermedades, como una alternativa a bebidas con valor nutrimental/nutraceutico bajo.

Tabla 2. Composición química y propiedades DE la mezcla de harinaS de QPM extrudido (60%) y de frijol fermentado (40%).

Propiedades	Mezcla (60% HQPME+40% HFF)¹	Requerimientos para niños mayores de 3 años, adolescentes y adultos
Composición química (% , bs)		---
Proteína	17.64	---
Lípidos	3.82	---
Cenizas	1.16	---
Carbohidratos	77.38	---
Fisicoquímicas		---
a _w	0.48	---
pH	6.28	---
Funcionales		---
Índice de Absorción de Agua (g de gel/g de muestra seca)	4.07	---
Índice de Solubilidad en Agua (g sólidos /100g de muestra seca)	17.20	---
Índice de Absorción de Aceite (mL/g de muestra seca)	1.17	---
Dispersabilidad (%)	60	---
Capacidad de Formación de Espuma (%)	4.92	---
Actividad de Emulsión (%)	30.83	---
Estabilidad de Emulsión (%)	91.88	---
Nutricionales¹		
AEE (g / 100 g proteína)		
Ile	3.02	3.0
Leu	8.19	6.1
Lys	5.13	4.8
Met+Cys	4.23	2.3
Phe+Tyr	7.67	4.1
Trp	1.06	0.66
Thr	3.50	2.5
Val	4.95	4.0
Calificación química de AAE	100	---
AAE limitante	--	---
DPIV(%)	76.2	---
C-PER	2.0	---
Fibra dietaria total (%)	24.75	---
Actividad antioxidante^d (ORAC)	15,337	---
Capacidad antihipertensiva (IC₅₀, µg/mL)	0.034	---
Capacidad antimutagénica (% inhibición)	77.06	---

¹AEE=Aminoácido esencial, DPIV=Digestibilidad proteínica *in vitro*, C-PER=Relación de Eficiencia Proteínica Calculada

Tabla 3. Contenido de compuestos fenólicos totales¹ de harinas de frijol crudo y fermentado a diferentes tiempos de FES.

Tiempo de fermentación (horas)	Contenido de Fenólicos Totales (mg EAG/100g)		
	<i>Libres</i>	<i>Ligados</i>	<i>totales</i>
Crudo	35.91±0.24 ^h	156.46±5.47 ^{de}	192.37±5.68 ^h
0	106.00±2.02 ^f	127.03±3.86 ^f	233.03±5.66 ^g
24	91.32±2.59 ^g	148.88±4.36 ^e	240.20±2.29 ^g
36	91.86±5.45 ^g	151.77±8.64 ^e	243.63±10.75 ^g
48	114.04±1.29 ^e	162.14±3.82 ^{cd}	276.18±2.90 ^f
60	129.49±3.96 ^d	167.78±8.28 ^c	297.27±5.23 ^e
72	134.03±0.84 ^d	183.79±1.77 ^b	317.83±1.42 ^d
84	150.81±6.25 ^c	193.66±3.57 ^b	344.46±9.77 ^c
96	172.45±2.64 ^b	190.09±5.57 ^b	362.54±8.15 ^b
108	190.46±3.79 ^a	240.86±7.06 ^a	431.33±5.78 ^a

Valores marcados con la misma letra superíndice dentro de una misma columna no son significativamente diferentes.

RECONOCIMIENTOS

Esta investigación fue realizada con el apoyo del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI), Universidad Autónoma de Sinaloa (2012-2013) y Fundación Produce Sinaloa, A.C. (2012-2013).

REFERENCIAS

- [1] Liu RH (2007) Whole grain phytochemicals and health. *J Cereal Sci* 46:207-219.
- [2] Leiner de la Cabada M, Ortiz-Días JR, Ávila Maese C (2008) Un nuevo paradigma de la responsabilidad social corporativa. El aumento de enfermedades crónico-degenerativas en la fuerza laboral. *Contaduría y Administración* 225:105-119.
- [3] Jankovic MM, Kosanovic MM (2005) Glycosylation of urinary prostate-specific antigen in benign hyperplasia and cancer: assessment by lectin-binding patterns. *Clin Biochem* 38:58-65.
- [4] Maruyama C, Araki R, Kawamura M, Kondo N, Kigawa M, Kawai Y, Takanami Y, Miyashita K, Shimomitsu T (2008) Azuki Bean Juice Lowers Serum Triglyceride Concentrations in Healthy Young Women. *J Clin Biochem Nutr* 43: 19–25.
- [5] Campos-Vega R, Loarca-Piña G, Oomah BD (2010) Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Res Int* 43(2): 461–482.
- [6] Carrasco-Castilla J, Hernández-Álvarez AJ, Jiménez-Martínez C, Jacinto-Hernández C, Alaiz M, Giron CJ, Vioque J, Dávila-Ortiz G (2012) Antioxidant and metalchelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. *Food Chem* 135(3):1789-1795.

- [7] FAOSTAT (2013) Statistical database; Online reference <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Fecha de consulta: Octubre 28, 2013.
- [8] Gutiérrez-Dorado R, Ayala-Rodríguez AE, Milán-Carrillo J, López-Cervantes J, Garzón-Tiznado JA, López-Valenzuela JA, Paredes-López O, Reyes-Moreno C (2008) Technological and nutritional properties of flours and tortillas from nixtamalized and extruded quality protein maize (*Zea mays* L). *Cereal Chem* 85:808-816.
- [9] Lopez-Martínez LX, Oliart-Ros RM, Valerio-Alfaro G, Lee CH, Parkin KL, García HS (2009) Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT - Food Sci Technol* 42:1187 – 1192.
- [10] Mora-Rochín S, Gutiérrez-Urbe JA, Serna-Saldívar SO, Sánchez-Peña P, Reyes-Moreno C, Milán-Carrillo J (2010) Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. *J Cereal Sci* 52:502-508.
- [11] Anselmi C, Centini M, Granata P, Segal A, Buonocore A, Bernini A, Facio RM (2004) Antioxidant activity of ferulic acid alkyl esters in a heterophasic system. *J Agric Food Chem* 52:6425 – 6432
- [12] Aparicio-Fernández X, García-Gasca T, Yousef GG, Lila MA, González de Mejia E, Loarca-Piña G (2006) Chemopreventive activity of polyphenolics from black jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on HeLa and HaCaT Cells. *J Agric Food Chem* 54:2116-21229.
- [13] Bazzano LA, He J, Ogden LG, Loria C, Vupputuri S, Myers L, Whelton PK (2001) Legume consumption and risk of coronary heart disease in US men and women. *Arch Intern Med* 161:2573-2578.
- [14] Grajales-García EM, Osorio-Díaz P, Goñi I, Hervert-Hernández D, Guzmán-Maldonado SH, Bello-Pérez LA (2012) Chemical composition, starch digestibility and antioxidant capacity of tortilla made with a blend of quality protein maize and black bean. *Int J Mol Sci* 13:286-301.
- [15] Paredes-López O, Guevara-Lara F, Bello-Pérez LA (2006) Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas. Fondo de Cultura Económica. ISBN 968-16-7567-3 México, DF pp 32-34, 81-8812
- [16] Cuevas-Martínez D, Moreno-Ramos C, Martínez-Manrique E, Moreno-Martínez E, Méndez-Albores A (2010) Evaluación nutricional y textural de tortillas de maíz-frijol blanco nixtamalizadas. *Interciencia* 35:828-832.
- [17] SERNAC 2004. Alimentos funcionales. Servicio Nacional del Consumidor. Gobierno de Chile. Pp. 1-21.
- [18] Milán-Carrillo J, Alarcón-Valdez C, Gutiérrez-Dorado R, Cárdenas-Valenzuela OG, Mora-Escobedo R, Garzón-Tiznado JA, Reyes-Moreno C (2007) Nutritional properties of quality protein maize and chickpea extruded based weaning food. *Plant Foods Hum Nutr* 62:31-37.
- [19] Vasanthan T, Yeung J, Hoover R (2001) Dextrinization of starch in barley flours with thermostable alpha-amylase by extrusion cooking. *Starch/Stärke* 53:616-622.
- [20] Holker U, Lenz J (2005) Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages?. *Curr Opin Microbiol* 8:301-306.
- [21] Sharma A, Khetarpaul N (1997) Effect of fermentation on phytic acid content and in vitro digestibility of starch and protein of rice-black gram dhal-wheat blends. *J Food Sci Technol*, 34:20 -30.

- [22] Berghofer E, Grzeskowiak B, Mundigler N, Sentall WB and Walczak J (1998). Antioxidative properties of faba bean, soybean and oat tempeh. *Int J Food Sci Nutr*, 49: 45-54.
- [23] Han H, Baik BK (2008) Antioxidant activity and phenolic content of lentils (*Lens culinaris*), chickpeas (*Cicer arietinum* L.), peas (*Pisum sativum* L.) and soybeans (*Glycine max*), and their quantitative changes during processing. *Int J Food Technol* 43: 1971–1978.
- [24] Reyes-Bastidas M, Reyes-Fernández EZ, López-Cervantes J, López-Cervantes J, Milán-Carrillo J, Loarca-Piña GF, Reyes-Moreno C (2010) Physicochemical, nutritional and antioxidant activity properties of tempeh from common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Food Sci Technol Int* 16:427-434.
- [25] Maiti D, Majumdar M (2012) Impact of bioprocessing on phenolic content and antioxidant activity of two edible seeds to improve hypoglycemic functionality. *J Nat Pharm* 3: 31-36.
- [26] Hachmeister AK, Fung CDY (1993) Tempeh: a mold modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal grains. *Cr Rev Microbiol*. 19:137-188.
- [27] Angulo-Bejarano PI, Verdugo-Montoya NM, Cuevas-Rodríguez EO, Milán-Carrillo J, Mora-Escobedo R, López-Valenzuela JA, Garzón-Tiznado JA, Reyes-Moreno C (2008) Tempeh flour from chickpea (*Cicer arietinum* L). Nutritional and physicochemical properties. *Food Chem* 106: 106-112.
- [28] Chen-Tien H, Cheng-Kuang C, Su-Tze C, Ya-Chen H, Feng-Sheng and Yun-Chin C (2009) Effect of fermentation time on the antioxidant activities of tempeh prepared from fermented soybean using *Rhizopus oligosporus*. *Int J Food Sci Technol* 44:799-806.
- [29] Chaivasut C, Kumar T, Tipduangta P, Rungseevijitprapa W (2010) Isoflavone content and antioxidant activity of Thai fermented soybean and its capsule formulation. *Afr J Biotechnol* 9:4120-4126.
- [30] Sousa BP, Correia RTP (2012) Phenolic content, antioxidant activity and anti-amylolytic activity of extracts obtained from bioprocessed pineapple and guava wastes. *Braz J Chem Eng* 29:25-30.
- [31] Heckman MA, Sherry K, González de Mejía E (2010) Energy drinks: An assessment of their market size, consumer demographics, ingredient profile, functionality, and regulations in the United States. *Compr Rev Food Sci F* 9:303-307.
- [32] Cardello AV, Schutz HG (2004) Research note numerical scalepoint locations for constructing the LAM (labeled affective magnitude) scale. *J Sens Stud* 19:341 346.
- [33] AOAC (1999) Official Methods of Analysis, 16th edn. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- [34] Lopez-Cervantes J, Sanchez-Machado DI, Rosas-Rodriguez JA (2006) Analysis of free amino acids in fermented shrimp waste by high-performance liquid chromatograph. *J Chromatogr* 1105:106–110.
- [35] Hsu HW, Vavak DI, Saterlee ID, Miller GA (1977) A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J Food Sci* 42:1269–1273.
- [36] FAO, 2013. Findings and recommendations of the 2011 FAO Expert Consultation on protein quality evaluation in human nutrition. In: *Dietary Protein Quality Evaluation in Human Nutrition: Report of an FAO Expert Consultation*. FAO Food and Nutrition Paper 92. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, chapter 4, pp. 29.
- [37] Satterlee LD, Kendrick JG, Marshall HF, Jewell DK, Ali RA (1982) In vitro assay for predicting protein efficiency ratio as measured by rat bioassay: Collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* 65:798–809.

- [38] Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH (2002) Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50:3010–3014.
- [39] Adom KK, Liu RH (2002) Antioxidant activity of grains. *J Agric Food Chem* 50:6182–6187.
- [40] Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Method Enzymol* 299:152–178.
- [41] Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL (2001) Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 49:4619–4926.
- [42] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M and Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26:1231-1237.
- [43] Humiski LM, Aluko RE (2007) Physicochemical and bitterness properties of enzymatic pea protein hydroly-sates. *J Food Sci* 72:605–611.
- [44] Adler-Nissen J (1986) “Enzymatic Hydrolysis of Food Pro-teins”, Elsevier Applied Science Publication, New York.
- [45] Miguel M, Aleixandre MA, Ramos M, López-Fandiño R (2006) Effect of simulated gastrointestinal digestion on the antihypertensive properties of ACE-inhibitory peptides derived from ovalbumin. *J Agr Food Chem* 54:726–731.
- [46] Kado NY, Langley D, Eisenstadt E (1983) A simple modification of the Salmonella liquid incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutat Res* 121:25–32.
- [47] Kado NY, Guiguis GN, Flessel CP, Chan RC, Chang K, Wselowski JJ (1986) Mutagenicity of fine (<2.5 mm) airborne particles: diurnal variation in community air determined by Salmonella micro preincubation procedure. *Environ Mol Mutagen* 8:53–66.
- [48] Anderson RA, Conway HF, Pfeifer VF, Griffin E (1969) Gelatinisation of corn grits by roll and extrusion cooking. *Cereal Sci Today* 14:4-7, 11-12.
- [49] Mora-Escobedo R, Paredes-López O, Gutiérrez-López GF (1994) Effect of germination on the rheological and functional properties of amaranth seeds. *Lebensm Wiss Technol.* 24:241-246.
- [50] Hauffman VL, Lee CK, Burns EE (1975) Selected funtional properties of sunflowermeal (*Heliantusanhus*). *J Food Sci* 40: 70-74.
- [51] Ordorica-Falomir C (1988) Obtención de aislados proteicos por micelaceos y precipitación isoeléctrica a partir de pasta de Cártamo. Tesis de Doctorado CINVESTEV-IPN unidad de Irapuato, Guanajuato, Gto, México.
- [52] Esaki H, Onozaki H, Kawakishi S, Osawa T (1996) New antioxidant isolated from tempe. *J Agric Food Chem* 44:696-700.
- [53] Lin PY, Lai HM (2006) Bioactive compounds in legumes and their germinated products. *J Agric Food Chem* 54:3807-3814.
- [54] Sheih IC, Wu HY, Lai YJ, Lin CF (2000) Preparation of high free radical scavenging tempeh by a newly isolated *Rhizopus* sp. R-69 from Indonesia. *Food Sci Agric Chem* 2:35–44.
- [55] Randhir R, Lin YT, Shetty K (2004) Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochem* 39:637-647.

- [56] Watanabe N, Fujimoto K, Aoki H (2007) Activities of the water-soluble fraction in tempeh-like fermented soybean (GABA-tempeh). *Int J Food Sci Nutr* 58: 577-587.
- [57] Serna-Saldívar SO, Abril-Domínguez JR, López-Ahumada G, Ortega-Ramírez R (1999) Nutritional evaluation of table bread fortified with defatted soybean and sesame meals. *Arch Latinoam Nutr* 49:260-264.
- [58] Alarcón-Valdez C, Milán-Carrillo J, Cárdenas-Valenzuela OG, Mora-Escobedo R, Bello-Pérez LA, Reyes-Moreno C (2005) Infant food from quality protein maize and chick: optimization for preparing and nutritional properties. *Int J Food Sci Nutr* 59:273-285.
- [59] USDA (2010) Antioxidants and Health. ACES publications, pp 4.