



**Trabajo de Integración Curricular, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología**

**Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura**

**Carrera en Ingeniería en Biotecnología**

**Tema: Evaluación del proceso óptimo para la obtención de concentrados proteicos de distintas leguminosas mediante la incorporación de distintas bacterias ácidas lácticas como alimento probiótico.**

**Autor: Damaris Polethe Jiménez Chamaba**

**Tutor: Ing. Sánchez Llaguno, Sungey Naynee, PhD.**

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 07 de marzo de 2024**



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

## Reporte de Verificación de Contenido



I.C. JIMENEZ DAMARIS.analisis.pdf

### Scan details

Scan time:  
March 12th, 2024 at 0:45 UTC

Total Pages:  
83

Total Words:  
20695

### Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	2.1%	430
Minor Changes	0.8%	169
Paraphrased	0.4%	85
Omitted Words	0%	0

### AI Content Detection



Text coverage

- AI text
- Human text

Firma:



Firma electrónica por:  
SUNGEY NAYNEE  
SANCHEZ LLAGUNO

.....  
Ing. Sánchez Llaguno, Sungey Naynee, PhD.

C.C.: 1205348673

Director del Proyecto de Investigación



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura**  
**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Certificación**

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Evaluación del proceso óptimo para la obtención de concentrados proteicos de distintas leguminosas mediante la incorporación de distintas bacterias ácidos lácticas como alimento probiótico”** fue realizado por el señorita **Damaris Polethe Jiménez Chamba**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 7 de marzo de 2024**

**Firma:**



firmado electrónicamente por:  
SUNGEY NAYNEE  
SANCHEZ LLAGUNO

.....  
**Ing. Sánchez Llaguno, Sungey Naynee, PhD.**

C.C.: 1205348673

**Director del Proyecto de Investigación**



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura**  
**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Responsabilidad de la Autoría**

Yo, Damaris Polethe Jimenez Chamaba, con cédula de ciudadanía n° 1719233379, declaró que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **"Evaluación del proceso óptimo para la obtención de concentrados proteicos de distintas leguminosas mediante la incorporación de distintas bacterias ácidos lácticas como alimento probiótico"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 07 de marzo de 2024**

**Damaris Polethe Jimenez Chamaba**

C.C.: 1719233379



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura  
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

**Autorización de Publicación**

Yo Damaris Polethe Jimenez Chamba, con cédula de ciudadanía n° 1719233379, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: "Evaluación del proceso óptimo para la obtención de concentrados proteicos de distintas leguminosas mediante la incorporación de distintas bacterias ácidos lácticas como alimento probiótico" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 07 de marzo de 2024

.....  
Damaris Polethe Jimenez Chamba

C.C.: 1719233379

## Dedicatoria

Dedicar este trabajo y años de estudio universitario llenos de amor y gratitud a cada uno de ustedes. A mi querida madre, Laura Chamba, y a mi padre, Juan Diego Jiménez, quienes con su amor y apoyo incondicional han sido mi guía y mi ejemplo a seguir en la vida.

A mis amados hermanos, Dereck y Matías, con quienes comparto risas, sueños y momentos inolvidables que han llenado mi vida de alegría y compañerismo.

A mis queridos abuelos, de parte de mamá, Miguel Chamba, y de parte de papá, Pilar Tobar, quiero expresarles mi profundo agradecimiento por su apoyo incondicional y por creer en mí. Sus palabras de motivación han sido un gran impulso en mi vida. Gracias por todo su amor y sabiduría.

A mis tíos y tías y a todos mis familiares en general, quienes con su cariño y apoyo han sido parte fundamental en mi vida, brindándome su amor incondicional y su apoyo en cada paso que he dado.

## **Agradecimiento**

En primer lugar, agradezco a Dios me ha dado la vida y es la fuente principal en mi cada día y por darme a mi familia quienes son los más importantes en mi vida.

A mi amada madre a quien dedico todo mi esfuerzo y éxitos, por siempre brindarme su amor, tiempo y consejos en mi formación.

Agradezco a mi querida amiga Hadassa con quien llevamos conociendo desde el colegio, me llena de admiración siendo un ejemplo a seguir afrontando los desafíos de la vida.

Agradezco a los docentes que me enseñaron en mi formación académica la parte teórica y práctica.

Agradezco a la Dra. Sungey Sanchez y Dr. Neira por su guía en la formación de este estudio de fin de grado con sus conocimientos y consejos.

Agradezco al Ing. Kathy Medina encargada del laboratorio de bromatología y biociencia por su paciencia y ayuda en las necesidades que requería.

Agradezco a los compañeros de universidad que conocí a lo largo de esta esta estudiantil que me han brindado su amabilidad y compañerismo, deseándoles muchos éxitos en sus vidas.

## Índice de Contenido

Dedicatoria	I
Agradecimiento	II
Resumen	1
Abstract	2
Introducción y Estado del arte	3
Hipótesis	5
Hipótesis Nula	5
Hipótesis Alternativa	6
Objetivos	7
Objetivo General	7
Objetivos Específicos	7
Fundamentación teórica	8
Metodología/Técnicas/Diseño	42
Ubicación del Área de Investigación	42
Tipo de investigación	43
Enfoques y Técnicas de Recolección de Datos	43
Fuentes de Recopilación de Información	43
Diseño Experimental	43
Tipo de diseño experimental	43
Variables Dependientes del ANOVA	44
Factores y Niveles del Diseño Factorial	44
Tratamientos del Diseño Factorial	45
Análisis Estadístico del Diseño Factorial	45
Análisis Funcional del Diseño Factorial	46



Análisis de Componentes Principales	46
Materiales	4
Métodos	51
Preparación de las leguminosas	51
Extracción de grasa	52
Métodos de obtención de proteínas de las leguminosas	53
Activación de las bacterias ácido lácticas	55
Incorporación de bacterias al concentrado proteico.	55
Liofilización	56
Determinación de humedad	57
Determinación de ceniza	58
Determinación de proteína	60
Determinación de acidez	63
Determinación de potencial de hidrógeno	64
Análisis microbiológico	65
Cultivo en 3M Placas Petrifilm™ para Recuento de Enterobacterias (EB).	65
64	65
Cultivo en 3M Placas Petrifilm™ para Recuento de Coliformes (CC).	66
Recuento de Microorganismos.	66
Resultados	67
Resultados del estudio del método de optimización para obtención de concentrados proteicos de distintas leguminosas, mediante la incorporación de distintas bacterias ácido lácticas.	67
Análisis de Componentes Principales	93
93	94
Conclusiones	95

Recomendaciones	98
Bibliografía	4101

### Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b> Información taxonómica de la soja	8
<b>Tabla 2</b> <i>Composición nutricional de las semillas de soja seca</i>	10
<b>Tabla 3</b> <i>Información taxonómica del frijol común</i>	12
<b>Tabla 4</b> Contenido de aminoácidos	13
<b>Tabla 5</b> <i>Tabla nutricional de Phaseolus vulgaris L.</i>	14
<b>Tabla 6</b> <i>Perfil de aminoácidos presente en tres variedades de frijol</i>	14
<b>Tabla 7</b> <i>Cantidad de microorganismos específicos en leche fermentada sin tratamiento térmico posterior a la fermentación</i>	33
<b>Tabla 8</b> <i>Requisitos microbiológicos en leche fermentada sin tratamiento térmico posterior a la fermentación</i>	34
<b>Tabla 9</b> <i>Clasificación de Información: Homofermentativas y Heterofermentativas en Bacterias Lácticas (BAL)</i>	38
<b>Tabla 10</b> <i>Producción de Metabolitos por Bacterias Lácticas (BAL)</i>	40
<b>Tabla 11</b> <i>Sustancias Antimicrobianas Producidas por BAL</i>	41
<b>Tabla 12</b> <i>Factores y niveles a evaluar en el estudio de los concentrados proteicos a partir de leguminosas con bacterias ácido lácticas.</i>	44
<b>Tabla 13</b> <i>Tratamientos a comparar en el estudio de los métodos de obtención de concentrados proteicos a partir de leguminosas implementando bacterias ácido lácticas.</i>	45
<b>Tabla 14</b> <i>Esquema del análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el método óptimo de obtención de concentrados proteicos a partir de leguminosas implementando bacterias ácido lácticas.</i>	45

<b>Tabla 15</b> Reactivos, insumos y equipos para la preparación de las muestras vegetales soja ( <i>Glycine max</i> ) y frijol canario ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ).	47
<b>Tabla 16</b> Reactivos, insumos y equipos para la extracción de grasa de soja y frijol canario	47
<b>Tabla 17</b> Reactivos, insumos y equipos método ajuste de agua al punto isoeléctrico.	48
<b>Tabla 18</b> Reactivos, insumos y equipos método solución hidroalcohólica.	48
<b>Tabla 19</b> Reactivos, insumos y equipos para la determinación de proteínas.	49
<b>Tabla 20</b> Reactivos, insumos y equipos para la determinación de humedad.	49
<b>Tabla 21</b> Reactivos, insumos y equipos para la determinación de cenizas.	50
<b>Tabla 22</b> Reactivos, insumos y equipos para la determinación de acidez titulable.	50
<b>Tabla 23</b> Reactivos, insumos y equipos para la determinación de pH	50
<b>Tabla 24</b> Análisis de ANOVA para el resultado de proteína del concentrado proteico de leguminosas enriquecido con bacterias ácido lácticas para fines probióticos.	67
<b>Tabla 25</b> Análisis de ANOVA para el resultado de humedad del concentrado proteico de leguminosas enriquecido con bacterias ácido lácticas para fines probióticos ( $p < 0,05$ ).	68
<b>Tabla 26</b> Análisis de ANOVA para el resultado de cenizas del concentrado proteico de leguminosas enriquecido con bacterias ácido lácticas para fines probióticos ( $p < 0,05$ ).	69
<b>Tabla 27</b> Análisis de ANOVA para el resultado de acidez titulable del concentrado proteico de leguminosas enriquecido con bacterias ácido lácticas para fines probióticos ( $p < 0,05$ ).	70
<b>Tabla 28</b> Análisis de ANOVA para el resultado de pH del concentrado proteico de leguminosas enriquecido con bacterias ácido lácticas para fines probióticos ( $p < 0,05$ ).	71
<b>Tabla 29</b> Resultados de la evaluación de prueba de grupos homogéneos de los tipos de leguminosas con prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).	72
<b>Tabla 30</b> Resultados de la evaluación de las propiedades bromatológicas de las dos leguminosas para la extracción de proteínas implementando bacterias ácido lácticas.	74

<b>Tabla 31</b> <i>Resultados de la evaluación de las propiedades bromatológicas de las dos leguminosas para la extracción de proteínas implementando bacterias ácido lácticas.</i>	76
<b>Tabla 32</b> <i>Resultados de la evaluación de las propiedades bromatológicas de las dos leguminosas para la extracción de proteínas implementando bacterias ácido lácticas.</i>	79
<b>Tabla 33</b> <i>Resultados de la evaluación de las propiedades bromatológicas de las dos leguminosas para la extracción de proteínas implementando bacterias ácido lácticas.</i>	82
<b>Tabla 34</b> <i>Resultados de la evaluación de las propiedades bromatológicas de las dos leguminosas para la extracción de proteínas implementando bacterias ácido lácticas.</i>	84
<b>Tabla 35</b> <i>Resultados de la evaluación de las propiedades bromatológicas de las dos leguminosas para la extracción de proteínas implementando bacterias ácido lácticas.</i>	88
<b>Tabla 36</b> Resultados del análisis microbiológico para el mejor tratamiento	94

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> <i>Mecanismo de síntesis de GABA por las BAL</i>	38
<b>Figura 2</b> Ubicación del lugar de estudio	42
<b>Figura 3</b> Comparación de la proteína de dos leguminosas en la elaboración de concentrado proteico con la adición de bacterias ácido lácticas (factor A).	73
<b>Figura 4</b> Comparación en las variables proteína y cenizas de dos métodos de extracción de proteína en la elaboración de concentrado proteico con la adición de bacterias ácido lácticas (factor B)	75
<b>Figura 5</b> Comparación de las variables acidez titulable y pH de dos bacterias en la elaboración de concentrado proteico de leguminosas con la adición de bacterias ácido lácticas (factor C)	77
<b>Figura 6</b> Comparación de las variables proteína y cenizas de la relación entre dos tipos de leguminosas y métodos de extracción (Interacción AxB).	79

<b>Figura 7</b> Comparación de las variables proteína y pH de la relación entre dos leguminosas y dos tipos de bacterias (Interacción AxC).	82
<b>Figura 8</b> Comparación de las variables proteína y acidez titulable de la relación entre dos métodos de extracción y dos tipos de bacterias (Interacción BxC).	85
<b>Figura 9</b> Comparación de las variables proteína, ceniza, acidez y pH de la relación entre tipos de leguminosas, métodos de extracción y dos tipos de bacterias (Interacción AxBxC)	88
<b>Figura 10</b> Componentes principales en espacio rotado de variables estudiadas	941

## Resumen

En Ecuador, las leguminosas son una fuente crucial de proteínas para humanos y animales. La extracción de proteínas, utilizando métodos como el ajuste al punto isoeléctrico y solución hidroalcohólica, produce concentrados de alta calidad. Al implementar bacterias ácido lácticas *Limosilactobacillus reuteri* y *Lactiplantibacillus plantarum*, se obtuvieron resultados destacados, especialmente en el tratamiento de soja con Punto Isoeléctrico y *L. plantarum* (93,93 %). En las variables humedad y acidez titulable se formaron grupos simples, mientras que en cenizas se registró una media baja de 2,76% con el método de solución hidroalcohólica. El análisis de componentes principales mostró una fuerte correlación entre proteína y ceniza, y una baja asociación con acidez. Este tratamiento cumple con los estándares de calidad para aislados proteicos y ofrece un prometedor procesamiento biológico para alimentos nutricionales y funcionales de alta calidad.

**Palabras clave:** Leguminosas, agua ajustada al punto isoeléctrico, solución hidroalcohólica, concentrado proteico y probiótico.

## Abstract

In Ecuador, legumes are a crucial source of protein for humans and animals. Protein extraction, using methods such as adjustment to the isoelectric point and hydroalcoholic solution, produces high quality concentrates. By implementing lactic acid bacteria *Limosilactobacillus reuteri* and *Lactiplantibacillus plantarum*, outstanding results were obtained, especially in the treatment of soybeans with Isoelectric Point and *L. plantarum* (93.93%). In the variables humidity and titratable acidity, simple groups were formed, while in ashes a low average of 2.76% was recorded with the hydroalcoholic solution method. Principal component analysis showed a strong correlation between protein and ash, and a low association with acidity. This treatment meets quality standards for protein isolates and offers promising biological processing for high-quality nutritional and functional foods.

**Keywords:** Legumes, water adjusted to the isoelectric point, hydroalcoholic solution, protein and probiotic concentrate.

## **Introducción**

Las leguminosas son una importante fuente de proteínas en la alimentación humana y animal, con hasta 150 especies utilizadas. Son valoradas por su bajo contenido en grasa y su adaptación a diversos suelos y climas. Además, tienen la capacidad única de fijar nitrógeno al suelo. A pesar de sus beneficios nutricionales, su consumo ha disminuido en algunos países debido a la falta de innovación en el desarrollo de productos y a la competencia con importaciones más baratas. Sin embargo, el aumento en la conciencia sobre la salud ha impulsado un renovado interés en las dietas vegetales equilibradas, donde las leguminosas juegan un papel importante por su composición nutritiva (Olmedilla Alonso et al., 2010).

Los probióticos se usan ampliamente como ingredientes alimentarios que promueven la salud debido a las diversas bioactividades que realizan, varios estudios han demostrado que no solo los probióticos vivos sino también los probióticos muertos por calor o los componentes celulares fraccionados, como los exopolisacáridos, de las bacterias pueden tener efectos beneficios sobre la salud, en particular, el sistema inmunológico del huésped (Kim et al., 2022).

## **Estado del Arte**

El estudio presente se basa en la implementación de bacterias ácido lácticas en concentrado de proteína a partir de leguminosas como alimento probiótico. Existen estudios sobre alimentos fermentados con bacterias.

Esta técnica surge como desafío a nivel industrial para la vehiculización de probióticos en preparados de bebidas en polvo dado sus numerosas ventajas, como la necesidad de menor espacio durante el envasado, prolongación de su vida de anaquel y una actividad de agua (AW) que beneficie la supervivencia de los probióticos (Castillo-Escandón et al., 2019)



En un estudio de jugos deshidratados a partir de fresa, plátano y manzana, se han probado dos procedimientos para evaluar la viabilidad ante el calor: uno de ellos incluía la impregnación de los probióticos (*L. plantarum* 299v) en las frutas y posterior secado por convección con aire caliente, luego fueron molidas y conservadas por tres meses. El segundo procedimiento, implicó el secado de las frutas con la misma técnica que en el anterior, y el secado por aspersión de una suspensión del microorganismo, para finalmente adicionarlo al polvo de frutas (Fu et al., 2018).

(Nualkaekul & Charalampopoulos, 2011) utilizó como matriz alimento el Arándano, Grosella negra / Polvos liofilizados de frutas y como probiótico *L. Plantarum* NCIMB 8826, obtenido un polvo de grosella negra siendo el factor principal en que mantuvo la viabilidad celular. (108 UFC/g), el tiempo de almacenamiento fue por 12 meses, reconstitución en agua a temperatura ambiente.

## Hipótesis

### Hipótesis Nula

**Ho:** Los dos tipos de **leguminosas** soja (*Glycine max*) y **frijol canario** (*Phaseolus vulgaris*) no influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

**Ho:** Los métodos de extracción por **agua ajustada al punto isoelectrico** y solución **hidroalcohólica** no influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

**Ho:** Los dos tipos de bacterias ácido lácticas ***Limosilactobacillus reuteri*** y ***Lactiplantibacillus plantarum*** no influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

**Ho:** La interacción entre **los tipos de leguminosas** y los **métodos** de extracción proteica no influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

**Ho:** La interacción entre **los tipos de leguminosas** y la aplicación de bacterias **ácido lácticas** no influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

**Ho:** La interacción entre los **métodos de extracción proteica** y la aplicación de **bacterias ácido lácticas** no influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

**Ho:** La interacción entre los tipos de **leguminosas**, los **métodos** de extracción y la aplicación de **bacterias ácido lácticas** no influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

### Hipótesis Alternativa

**Ho:** Los dos tipos de **leguminosas** soja (*Glycine max*) y **frijol canario** (*Phaseolus vulgaris*) influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

**Ho:** Los métodos de extracción por **ajuste de agua de punto isoelectrico** y solución **hidroalcohólica** influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

**Ho:** Los dos tipos de bacterias ácido lácticas ***Limosilactobacillus reuteri*** y ***Lactiplantibacillus plantarum*** influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

**Ho:** La interacción entre **los tipos de leguminosas** y los **métodos** de extracción proteica influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

**Ho:** La interacción entre **los tipos de leguminosas** y la aplicación de bacterias **ácido lácticas** influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

**Ho:** La interacción entre los **métodos de extracción proteica** y la aplicación de **bacterias ácido lácticas** influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

**Ho:** La interacción entre los tipos de **leguminosas**, los **métodos** de extracción y la aplicación de **bacterias ácido lácticas** influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

## Objetivos

### Objetivo General

Evaluar el proceso óptimo para la obtención de concentrados proteicos de distintas leguminosas, mediante la incorporación de bacterias ácido lácticas como alimento probiótico.

### Objetivos Específicos

Establecer el proceso óptimo para la obtención de concentrados proteicos a partir de soja amarilla y fréjol canario a escala de laboratorio.

Obtener concentrados proteicos de soja amarilla y fréjol canario mediante dos métodos de extracción: uso de agua ajustada al punto isoeléctrico de las proteínas y uso de soluciones hidroalcohólicas.

Analizar la incorporación de distintas bacterias ácido-lácticas (*Limosilactobacillus reuteri* y *Lactiplantibacillus plantarum*) en los concentrados proteicos de soja amarilla y fréjol canario como alimento probiótico.

Evaluar las propiedades bioquímicas y microbiológicas de los concentrados proteicos.

## Fundamentación teórica

### ***Leguminosas como fuentes de proteínas***

**Soja (*Glycine max*).** Es una semilla importante rica en proteínas utilizada para la extracción de aceite en muchos países occidentales, su taxonomía se visualiza en la tabla 1. Debido a su alto contenido en proteínas se usa como alimento en animales, aunque también forma parte de la dieta humana. Los principales países productores de soja son Estados Unidos, Brasil, China y Argentina (Vásquez, 2020). La proteína vegetal y aceite proveniente de la soja constituyen el 56% del peso seco de la semilla y es ampliamente usada en la industria farmacéutica, producción de biodiésel y alimentos en general. La cosecha se realiza luego de 120 días de la siembra y su alto rendimiento se relaciona con el clima, ya que se desarrolla óptimamente en las regiones cálidas y tropicales (Reyes, 2022).

En Ecuador la soja es uno de los ingredientes principales del balanceado, la superficie de soja sembrada para el 2020 fue de 27.960,01 hectáreas, lo que representó el 5,7% de la superficie total que se requiere para cubrir la demanda nacional siendo las provincias de Los Ríos, Guayas, Santa Elena, Bolívar, Loja y Morona Santiago los principales productores (Sánchez et al., 2020).

**Tabla 1**

#### *Información taxonómica de la soja*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae

Género	<i>GlycineWilld., 1802</i>
Especie	<i>max (L.) Merr., 1917</i>
Nombre común	Soja

*Nota.* Tomado del Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados. (SIOVM, n.d.)

**Composición química.** Las proteínas en las semillas se encuentran almacenadas como fuente de aminoácidos, nitrógeno y carbono para el desarrollo de la planta. El grano de soja se compone químicamente en 37% de proteína, 30% de carbohidratos, 20% de lípidos, 8% de agua y 5% de cenizas (Marioli Nobile, 2016).

Las albúminas y las globulinas son los principales grupos de proteínas de almacenamiento que conforman del 44 a 77% de la fracción proteica, siendo la glicinina y  $\beta$ -conglucina las dos subunidades de globulinas mayoritarias en la soja (Chito et. al, 2017) representando del 65 al 80%. Los aminoácidos esenciales que se encuentran en la soja son: valina, fenilamina, isoleucina, leucina, metionina, lisina, treonina y triptófano; los aminoácidos no esenciales son: cistina, arginina, ac. aspártico, ac. glutámico, serina, tirosina, glicina, prolina y alanina (Reyes, 2022).

En cuanto a carbohidratos, el almidón constituye del 2 al 4%, también se encuentra presente la glucosa, fructosa, arabinosa, galactosa, maltosa y rafinosa en menor proporción (Chito et al., 2017). El 50% de los carbohidratos presentes son del tipo insoluble, en particular fibra insoluble (ligninas, celulosa), mientras que el otro 50% se compone de fibra soluble (pectina) y azúcar soluble, mayoritariamente sacarosa (8%). Sobre la porción lipídica, los ácidos grasos insaturados, linoleico y linolénico son esenciales para la nutrición humana y animal. A la vez que la fracción de cenizas incluye minerales relevantes para la calidad nutricional del grano como K, P, Ca, Mg, Fe y Zn, y trazas de Se, Co, Mo (Marioli Nobile, 2016).

**Información nutricional.** Desde el punto de vista nutricional, la soja presenta un contenido apreciable de grasas y proteínas de buena calidad. Además, contiene todos los aminoácidos esenciales para los adultos, lo que la hace la única proteína de origen vegetal con una calidad equiparable a la de las proteínas de origen animal como se aprecia en la tabla 2. Asimismo, la cantidad de aminoácidos ajustada por su capacidad de ser digeridos es notablemente alta en las proteínas provenientes de fuentes vegetales; en particular, alcanza un valor del 78% en los granos de soja y del 86% en las bebidas elaboradas a partir de soja (Martín Salinas & López Sobaler, 2017).

Debido a que tiene menos carbohidratos que otras legumbres, los alimentos derivados de la soja presentan ventajas para los diabéticos, además dado que la mayoría se encuentran en forma de oligosacáridos (estaquiosa) actúan como prebióticos, ya que no se digieren del todo y llegan al colón donde se fermentan y estimulan el crecimiento de la flora bacteriana del individuo (Rosón, 2017).

**Tabla 2**

*Composición nutricional de las semillas de soja seca*

<b>Energía y macronutrientes/ 100 g PC</b>		<b>Vitaminas/100 g PC</b>	
Agua (g)	8,5	Vitamina C (mg)	6,0
Energía (kcal)	446	Vitamina B1 (mg)	0,87
Proteínas (g)	36,5	Vitamina B2 (mg)	0,87
Lípidos (g)	19,9	Niacina (mg)	1,62
AGS (g)	2,9	A. pantoténico (mg)	0,79

AGM (g)	4,4	Vitamina B6 (mg)	0,38
AGP (g)	11,3	Folatos (ug)	375
Omega-3 (g)	1,3	Vitamina B12 (ug)	0
Omega-6 (g)	9,9	Colina (ug)	116
Colesterol (mg)	0	Vitamina A (ug)	1
H. de carbono (g)	30,2	Vitamina D (ug)	0
Azúcares totales (g)	7,3	Vitamina E (ug)	0,85
Fibra (g)	9,3	Vitamina K (ug)	47,0

---

**Minerales/100 g PC**

---

Calcio (mg)	277	Sodio (mg)	2
Hierro (mg)	15,7	Zinc (mg)	4,9
Magnesio (mg)	280	Cobre (mg)	1,67
Fósforo (mg)	704	Manganeso (mg)	2,5
Potasio (mg)	1797	Selenio (mg)	17,8

---

*Nota.* Tomado de Martín Salinas & López Sobaler, (2017).



### Fréjol canario (*Phaseolus vulgaris*)

**Origen:** El frejol, conocido científicamente como *Phaseolus vulgaris* L., destaca como la especie más relevante entre las leguminosas de grano destinadas al consumo humano, su taxonomía se visualiza en la tabla 3. Su cultivo se extiende a diversas regiones, siendo prácticamente ubicuo a nivel mundial. América Latina, en particular, destaca como la principal región de producción y consumo, contribuyendo con más del 45% del total de la producción mundial (Voysesst, 2000).

**Tabla 3**

#### *Información taxonómica*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Género	<i>Phaseolus</i> L., 1753
Especie	<i>vulgaris</i> L.
Nombre común	Frejol negro

*Nota.* Tomado del Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados. (SIOVM, n.d.)

En Ecuador, la práctica del cultivo de frejoles abarca tanto las zonas costeras como las montañosas, aunque es en esta última región donde adquiere una significancia mayor, representando cerca del 90% del área cultivada en el país. Más del 50% de la superficie sembrada con frejoles en la región montañosa se realiza en asociación con maíz, lo que destaca la importancia tanto de las variedades trepadoras como de las arbustivas en Ecuador. En cuanto a las preferencias de color, se observa una inclinación hacia tonalidades claras como amarillo,

blanco y crema en el país. Sin embargo, la creciente demanda de exportación a Colombia ha impulsado la importancia de los frijoles rojos y moteados, llegando incluso a ocupar un espacio en el mercado local, especialmente en forma de consumo de grano tierno (Voyssest, 2000).

Es importante tener en cuenta que la información sobre la deficiencia de metionina y cisteína indica que los frijoles no son una fuente completa de proteínas, ya que estos aminoácidos esenciales están presentes en cantidades limitadas (tabla 4). Sin embargo, el frijol cocido puede tener una calidad de proteína de hasta el 70%, comparada con una proteína de origen animal considerada como referencia al 100%.

**Tabla 4**

Contenido de aminoácidos

<b>Aminoácido</b>	<b>Contenido (g/100g de proteína)</b>
Lisina	6.4 - 7.6
Fenilalanina	5.3 - 8.2
Metionina	Deficiente
Cisteína	Deficiente

*Nota.* Información tomada de Ulloa et al., (2011).

Respecto a la contribución de carbohidratos, la cantidad de 52 a 76 g por cada 100 g de frijol crudo varía según la variedad, siendo el almidón la fracción más significativa. El almidón constituye la principal fuente de energía en estos alimentos. Aunque, durante el proceso de cocción, parte de este almidón se vuelve no disponible al transformarse en lo que se conoce como almidón resistente a la digestión. Es importante recordar que las cantidades pueden variar según la variedad específica de *Phaseolus vulgaris* y otros factores. La tabla 5 ofrece una representación general de los componentes nutricionales del frijol crudo (Ulloa et al., 2011).

**Tabla 5**

*Tabla nutricional de Phaseolus vulgaris L.:*

<b>Nutriente</b>	<b>Cantidad (por 100g de frijol crudo)</b>
Carbohidratos	52 - 76 g
Almidón	Principal fuente de energía
Lípidos	1.5 - 6.2 g
Ácidos grasos	Predominantemente mono y poliinsaturados
Fibra	14 - 19 g (hasta la mitad soluble)
Componentes de la fibra	Pectinas, pentosanos, hemicelulosa, celulosa, lignina
Micronutrientes y Vitaminas	Cantidad considerable de calcio, hierro, fósforo, magnesio, zinc, tiamina, niacina y ácido fólico

*Nota.* Información tomada de Ulloa et al., (2011).

### **Perfil de aminoácidos**

La disponibilidad biológica de aminoácidos en tres variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) se visualiza a continuación en la tabla 6.

**Tabla 6**

*Perfil de aminoácidos presente en tres variedades de frijol*

Variedad de Frijol	AA Limitantes (Orden Decreciente)	Digestibilidad Aparente (DA)	Digestibilidad Verdadera (DV)	AAE de Menor Disponibilidad	AAE de Mayor Disponibilidad	Relación DA y DV AAE/AANE

**Tabla 6***Perfil de aminoácidos presente en tres variedades de frijol*

Negro	Triptófano, Valina, Treonina	33-59%	60-85%	Valina	Lisina, Fenilalanina	0.89 / 0.98
Rojo	Triptófano, Valina, Treonina	29-55%	64-81%	Valina	Lisina, Fenilalanina	0.89 / 0.96
Blanco	Triptófano, Valina, Treonina	18-57%	36-86%	Valina	Lisina, Fenilalanina	0.77 / 0.90

*Nota.* AA: Aminoácidos, AAE: Aminoácidos Esenciales, AANE: Aminoácidos No Esenciales, DA: Digestibilidad Aparente, DV: Digestibilidad Verdadera, AAE: Aminoácidos Esenciales. Información tomada de (Blanco & Bressani, 1991).

### **Información Nutricional**

**Fuente de Polifenoles:** Los frijoles comunes son ricos en polifenoles, que son metabolitos vegetales con potentes propiedades antioxidantes (Ganesan & Xu, 2017).

#### *Beneficios para la Salud:*

**Propiedades Antioxidantes:** Los polifenoles presentes en los frijoles comunes actúan como antioxidantes, ayudando a reducir los efectos de enfermedades inducidas por el estrés oxidativo (Ganesan & Xu, 2017).

Prevención de Enfermedades Degenerativas: Existe evidencia que sugiere que los polifenoles dietéticos, especialmente los presentes en los frijoles comunes, pueden desempeñar un papel en la prevención de enfermedades degenerativas en humanos.

Diversos Efectos Beneficiosos: Los frijoles comunes ricos en polifenoles han demostrado tener propiedades antioxidantes, antidiabéticas, antiobesidad, antiinflamatorias, antimutagénicas y anticancerígenas (Ganesan & Xu, 2017).

### **Características botánicas**

La planta del frijol domesticado es una planta anual y herbácea que tiene un hábito arbustivo cuando se cultiva de forma individual o trepador cuando se siembra en conjunto con maíz (*Zea mays L.*). Su ciclo biológico varía de 85 a 270 días, dependiendo del hábito de crecimiento, las condiciones climáticas de la región y la época de siembra. Aunque se cultiva en una amplia gama geográfica, desde Argentina hasta Canadá y desde el nivel del mar hasta los 3200 metros de altura, esta planta termófila es susceptible a las heladas (Gepts & Debouck, 1991).

La forma silvestre de *P. vulgaris* presenta un hábito trepador indeterminado, con predominio de flores de color morado. Las vainas son pequeñas, delgadas y dehiscentes, con granos pequeños, y las semillas suelen ser de color gris, ya sea uniforme o jaspeado. Se encuentra en una distribución continua desde el norte de México hasta el noroeste de Argentina, abarcando un rango altitudinal de 500 a 2000 metros y con precipitaciones anuales que oscilan entre 500 y 1800 mm (Toro et al., 1990).

Esta planta prospera en entornos de bosques con baja densidad de árboles, mostrando preferencia por lugares con arbustos espinosos y maleza. Estos lugares pueden incluir las riberas

de los ríos y hábitats con perturbaciones causadas por vulcanismos, incendios naturales o modificaciones realizadas por actividades humanas (Toro et al., 1990).

### **Alimentos funcionales**

Los alimentos funcionales son productos alimenticios que mantienen la apariencia de la comida tradicional y forman parte de la dieta diaria. Estos productos proporcionan beneficios fisiológicos y/o pueden disminuir el riesgo de enfermedades no transmisibles. De acuerdo con los documentos de la Unión Europea, un producto alimenticio se considera funcional si se demuestra que afecta positivamente una o más funciones específicas del cuerpo. Estos alimentos contienen ingredientes añadidos que ofrecen beneficios para la salud más allá de lo que ofrecen los alimentos convencionales sin ser píldoras, suplementos, entre otros (Çakiroğlu & Uçar, 2018).

La industria de productos funcionales es actualmente innovadora, con un crecimiento dinámico y el lanzamiento continuo de nuevos productos. Estos alimentos tienen diversas acciones positivas para la salud, como el potencial de fortalecer el sistema inmunológico, reducir el riesgo de problemas cardiovasculares, osteoporosis, obesidad y ciertos tipos de cáncer, además de mejorar la memoria y la condición física (Teratanavat & Hooker, 2006).

El éxito de los alimentos funcionales depende tanto de su eficacia como de su capacidad para satisfacer las demandas de los consumidores. En este contexto, el auge del uso de los concentrados proteicos elaborados como subproducto de los procesos agroindustriales representa un avance significativo (Topolska et al., 2021). Las proteínas, esenciales para el desarrollo y la salud humanos, poseen un potencial significativo para combatir la desnutrición a nivel global. La industria alimentaria se beneficia de su alta productividad, bajo costo y variedad de fuentes, utilizándose tanto como elementos estructurales como ingredientes tecnofuncionales.

Además de su valor nutricional directo, las proteínas desempeñan un papel crucial como ingredientes en la elaboración de alimentos (Du et al., 2020).

### ***Concentrados proteicos***

La extracción del aceite de semillas de plantas oleaginosas da lugar a la generación de una gran cantidad de harina desengrasada. Esta harina presenta gran cantidad de fibra y proteínas, y es ampliamente usada como subproducto para la alimentación del ganado. No obstante, han ganado un interés para su uso en la alimentación humana luego de realizar procesos de extracción y mejoramiento (Vioque et al., 2001).

Se ha demostrado que la ingesta de proteínas en la dieta estimula la síntesis de proteínas musculares (Tang et al., 2009), de modo que la respuesta sintética a la ingesta de proteínas puede variar entre los diferentes tipos o fuentes de proteínas dietéticas y se debe en gran medida a la disponibilidad posprandial de aminoácidos esenciales (Gorissen et al., 2018).

El uso de aislados proteicos de origen vegetal en las formulaciones alimentarias se ha vuelto de interés debido a una mayor sostenibilidad y menores costos de producción. De manera que, el mercado actual ofrece una amplia selección de proteínas de origen vegetal (Gorissen et al., 2018). Además, los concentrados proteicos representan una fuente alternativa de proteína libre de alérgenos, lactosa, gluten y bajas en grasas saturadas.

### ***Métodos de extracción proteica***

Con la finalidad de incrementar el valor añadido de los subproductos de la industria aceitera, así como usarlas para la industria de alimentos humanos, las harinas se someten a procesos de extracción y mejoras de estas proteínas que culminan en la obtención de concentrados y aislados proteicos (Zafra et al., 2013).

### ***Agua ajustada al punto isoelectrico***

La técnica convencional más utilizada para producir aislados de proteínas en leguminosas es la extracción alcalina/precipitación isoelectrica. Este método aprovecha la alta solubilidad de las proteínas en condiciones alcalinas, donde el NaOH y el KOH se utilizan comúnmente para mantener un pH básico y romper los enlaces disulfuro en las proteínas, mejorando así su recuperación y rendimiento. Sin embargo, el rendimiento de la proteína está influenciado por varios factores, como el tamaño de la partícula, el disolvente utilizado, el pH de solubilización y la proporción agua-harina (del Mar Contreras et al., 2019).

Durante el proceso de extracción alcalina/precipitación isoelectrica, la harina desgrasada se disuelve en agua y se ajusta el pH a un rango alcalino. Después de un tiempo para maximizar la solubilidad de las proteínas, la mezcla se separa por centrifugación y se ajusta el pH isoelectrico. La proteína precipitada se recoge, lava, neutraliza y seca mediante liofilización. Aunque este método produce proteínas con alta digestibilidad y biodisponibilidad, puede presentar desafíos como la afectación de la digestibilidad y la aparición de reacciones químicas adversas. Estos problemas pueden abordarse equilibrando la fuerza de los álcalis y la eficiencia de extracción de proteínas (Shanthakumar et al., 2022).

Este método posibilita la remoción de la mayoría de los compuestos antinutricionales, así como una porción de las sales y compuestos nitrogenados no proteicos, a través de sucesivas extracciones con agua y centrifugaciones, preservando así las propiedades funcionales del producto (Vioque et al., 2001).

### ***Uso de soluciones hidroalcohólicas***

El uso de soluciones hidroalcohólicas posibilita una extracción adecuada de compuestos como lípidos polares y sus productos de oxidación, fenoles, isoflavonas, esteroides, azúcares,



entre otros. Por lo general, las proteínas son poco solubles en mezclas de agua y alcohol, especialmente cuando el contenido de alcohol supera el 40% en volumen. La incorporación de estas mezclas reduce la solubilidad de las proteínas en comparación con el agua o el alcohol puro. El etanol suele ser el alcohol preferido en la preparación de concentrados mediante mezclas hidroalcohólicas. El método implica la extracción contracorriente de la harina con mezclas de etanol al 50-70% en volumen, seguido de un proceso de secado del producto. Es posible destilar el extracto para recuperar el alcohol, lo que podría reducir los costos al utilizarlo. La concentración de etanol utilizada es crucial, ya que una concentración baja puede aumentar la desnaturalización de las proteínas, dificultar la recuperación del alcohol por destilación y complicar el proceso de secado del concentrado (Vioque et al., 2001).

### ***Fracción húmeda***

Aparte de extracción alcalina/precipitación isoeléctrica, otra técnica usada para el aislamiento de proteínas de suspensiones húmedas es la ultrafiltración (UF) con diafiltración. La diferencia radica en que la proteína extraída pasa a través de una membrana, presentando la ventaja de que se pueden eliminar pequeños compuestos solubles como los oligosacáridos. Varias ventajas de la UF sobre el proceso de extracción por precipitación isoeléctrica incluyen eficiencias de extracción mejoradas al cambiar el tipo de membrana utilizada, los límites de peso molecular, la concentración y el volumen del filtrado y la adición de diafiltración a las técnicas de UF (Hadnađev et al., 2017).

### ***Fracción seca***

Una alternativa que prescinde de la adición de agua y productos químicos, al tiempo que conserva la funcionalidad de los componentes, es el fraccionamiento en seco, que implica principalmente pasos de molienda y clasificación con aire. Durante el proceso de molienda, se separa el almidón mediante clasificación por aire según su densidad, tamaño y forma. Las

fracciones enriquecidas conservan parte de la estructura y funcionalidad original. Además, estas fracciones de proteínas aún contienen componentes bioactivos apenas presentes en los aislados de proteínas obtenidos mediante fraccionamiento húmedo, como fitoquímicos, fibras dietéticas y almidones resistentes, lo que las hace más atractivas para su uso en diversos alimentos (Do Carmo et al., 2020).

El principio subyacente del fraccionamiento en seco radica en la clasificación de la harina en diferentes tamaños de partículas y su composición química después de la molienda. Este método depende de la capacidad de la molienda para separar los cuerpos proteicos y otros componentes celulares en partículas de diferentes tamaños. Para lograrlo, se emplean diversas tecnologías de fresado, como el fresado con rodillo, con martillo, con piedra, con pasador y por chorro. La molienda con púas, entre estas tecnologías, se utiliza específicamente para reducir el tamaño de las partículas de harina (Shanthakumar et al., 2022).

### ***Extracción de sal y micelización***

Este método consiste en la extracción de proteínas del material de semilla utilizando una solución salina con un pH neutro. La técnica de extracción de sal presenta la ventaja de permitir la entrada y salida de sal de las proteínas, seguida de un proceso de desalación que reduce la fuerza iónica del entorno proteico. Para llevar a cabo este proceso, la harina de la leguminosa se agita en una solución salina durante un período que oscila entre 10 y 60 minutos, utilizando una proporción específica de 1:10 (p/v) de fuerza iónica (Stone et al., 2015).

Una vez finalizada la agitación, se procede a eliminar la materia insoluble mediante sedimentación, vertido, tamizado y centrifugación. El sobrenadante resultante se desala y se seca. La concentración y la mezcla de sales se eligen cuidadosamente en función de las características de sal de la proteína que se va a aislar, así como de las características de sal de

cualquier proteína no deseada, dado que las proteínas precipitan con diferentes fuerzas iónicas (Stone et al., 2015).

Entre los beneficios del método de extracción de sal se encuentra el hecho de que no se requiere un pH alcalino o ácido extremo ni una temperatura elevada. La extracción se lleva a cabo dentro del rango de pH natural, entre 5,5 y 6,5. Mientras que la extracción alcalina tiende a extraer un contenido ligeramente mayor de leguminosas, la extracción de sal es más propicia para extraer vicilina y convicilina debido a la menor solubilidad de la legumina en solución salina diluida en comparación con la vicilina (Klupšaitė & Juodeikienė, 2015).

### **Determinación bromatológica**

En la evaluación de alimentos, uno de los objetivos principales del análisis proximal consiste en identificar, entre otros factores, el contenido de humedad, cenizas, grasa y fibra cruda. Estas mediciones son de gran relevancia porque proporcionan información sobre la composición nutricional de los alimentos y aseguran la calidad de los productos comercializados. Los métodos utilizados para determinar estos componentes en los alimentos se basan en técnicas gravimétricas. A pesar de que estas técnicas son ampliamente empleadas en el análisis estándar, requieren una manipulación exhaustiva de la muestra por parte del analista, el uso de cantidades significativas de muestra, tiempos de análisis prolongados y pretratamiento de la muestra antes del secado o la incineración, los cuales varían según la naturaleza de los componentes involucrados (Vano et al., 2009).

### ***Prueba de Proteína***

El análisis del contenido proteínico en los alimentos puede llevarse a cabo mediante varios métodos, y uno de ellos es el método Kjeldahl, el cual se basa en la determinación del nitrógeno. La medición del contenido de nitrógeno en muestras de origen orgánico desempeña

un papel crucial en diversas áreas de análisis, incluyendo sectores como la industria agroalimentaria, farmacológica y ambiental (García & Fernández, 2022).

El contenido proteínico de los alimentos puede evaluarse mediante diversos métodos, siendo uno de los enfoques más comunes la cuantificación indirecta y aproximada. Esta aproximación se realiza a partir del contenido de nitrógeno en la muestra o deduciendo la cantidad de proteína a través de uno o dos aminoácidos específicos presentes en la proteína, cuya identificación y cuantificación son sencillas debido a su reactividad química específica (García & Fernández, 2022).

A lo largo de más de un siglo, el método Kjeldahl ha sido empleado para determinar el nitrógeno en diversas muestras, desde alimentos y bebidas hasta piensos, forrajes, fertilizantes, aguas residuales y suelos. La designación de "proteína bruta" o "proteína total" obtenida por este método engloba, en realidad, una fracción significativa de nitrógeno proveniente de otros compuestos nitrogenados. A pesar de su utilidad, es importante señalar que este análisis no abarca el nitrógeno nítrico, cianhídrico, hidracina, grupos azo y nitrógeno presente en un núcleo cíclico (García & Fernández, 2022).

**Etapas de Digestión:** En la primera fase del proceso, se lleva a cabo una digestión de la muestra mediante tratamiento con ácido sulfúrico concentrado y la presencia de un catalizador. Durante este procedimiento, se produce la conversión del nitrógeno orgánico en ion amonio.

**Etapas de Destilación:** En la etapa de destilación, la muestra digerida se alcaliniza y el nitrógeno se libera en forma de amoníaco. El amoníaco destilado se captura sobre una cantidad desconocida de ácido bórico.

**Etapas de Valoración:** En la última fase del procedimiento, conocida como etapa de valoración, la cuantificación del nitrógeno amoniacal se realiza mediante una volumetría ácido-

base del ion borato formato. Este proceso utiliza ácido clorhídrico o sulfúrico, y como indicador se emplea una solución alcohólica que contiene una mezcla de rojo de metilo y azul de metileno. En este contexto, los equivalentes de ácido consumidos durante la valoración corresponden a los equivalentes de amoniaco destilados (García & Fernández, 2022).

### ***Acidez titulable***

La acidez en los alimentos está estrechamente relacionada con la presencia de grupos carboxilo e hidroxilo. Por lo general, se determina mediante la titulación con una base fuerte como el NaOH hasta que se produce un cambio de color con un indicador como la fenolftaleína o se registra electrónicamente con un potenciómetro. La acidez titulable se calcula en función de la cantidad de base requerida para alcanzar el punto final de la titulación. Entre los ácidos más comunes en los alimentos que contribuyen a la acidez se encuentran el cítrico, láctico, málico y tartárico (Fenneme, 2003).

La evaluación de la acidez en las harinas desempeña un papel crucial ya que previene la proliferación de bacterias, microorganismos y hongos en los productos alimenticios. Además, permite detectar la presencia de ácidos minerales, ácidos orgánicos, sales de ácidos fuertes y bases débiles en las harinas. Este análisis se puede llevar a cabo de dos formas: mediante la determinación de la acidez soluble en alcohol neutro al 96%, la cual está asociada con la cantidad de ácidos grasos libres y refleja el grado de conservación de la harina en su composición, y a través de la medición de la acidez soluble en agua, que se relaciona con la presencia de fosfatos ácidos y el grado de extracción presente en la harina (Valdiviezo, 2019).

Según las normas INEN la acidez medida de la harina de origen vegetal es expresada convencionalmente como ácido sulfúrico y es determinada mediante procedimientos normalizados (INEN, 1980).

## Humedad

Todos los alimentos presentan una cantidad variable de agua, ya sea en mayor o menor proporción. Esta agua se encuentra en dos formas principales: como agua libre y como agua ligada. La primera, el agua libre, es la forma predominante y puede liberarse fácilmente mediante procesos de evaporación o secado. Por otro lado, el agua ligada está vinculada en alguna forma química tanto a las proteínas como a las moléculas de sacáridos, y se encuentra adsorbida en la superficie de las partículas coloidales.

Comprender este contenido acuoso resulta de suma importancia, y tener la capacidad de modificarlo tiene aplicaciones inmediatas. Conocer la composición centesimal de un producto alimenticio, supervisar las materias primas en la industria, facilitar su proceso de elaboración, prolongar su conservación para evitar el desarrollo de microorganismos y otras reacciones indeseables, mantener su textura y consistencia, así como prevenir fraudes y adulteraciones mediante el cumplimiento de los límites establecidos por la normativa vigente, son aspectos directamente influenciados por este conocimiento. No obstante, en ciertas circunstancias, determinar con precisión la cantidad exacta de agua en un alimento puede representar un desafío (García & Fernández, 2023).

El principio del método gravimétrico indirecto por desecación para analizar la humedad en alimentos implica medir la pérdida de peso de la muestra debido a la evaporación del agua, y se puede llevar a cabo en estufa con circulación forzada de aire, a presión atmosférica o a vacío (García & Fernández, 2023).

Fundamentos del método: Los métodos de secado son comunes para evaluar el contenido de humedad en alimentos, calculando el porcentaje de agua mediante la pérdida de peso debido al calentamiento bajo condiciones normalizadas. Aunque estos métodos proporcionan resultados comparativos, es importante tener en cuenta algunas consideraciones,

como la dificultad para eliminar toda la humedad, la posibilidad de descomposición del alimento a ciertas temperaturas, y la pérdida de otras sustancias volátiles aparte del agua (García & Fernández, 2023).

Principios operacionales del método: El proceso de determinación de humedad implica la preparación de la muestra, pesado, secado, enfriado y pesado nuevamente. Sin embargo, se deben considerar precauciones, como deshidratar productos con alto contenido de azúcares y carnes grasas a temperaturas controladas. Algunos productos, como las especias ricas en sustancias volátiles distintas al agua, son inadecuados para los métodos de deshidratación en estufa. Además, se destaca la importancia de un movimiento de aire controlado para eliminar el agua y se señala la necesidad de precauciones específicas para evitar errores, como el manejo rápido de muestras higroscópicas y la deshidratación cuidadosa de alimentos ricos en proteínas y azúcares reductores (García & Fernández, 2023).

## **Ceniza**

La fracción de cenizas en el análisis proximal constituye los componentes inorgánicos presentes en el alimento. Este proceso implica la colocación de la muestra en un crisol de porcelana, seguido de su incineración en una mufla a temperaturas que oscilan entre los 550° y 600°C. Durante este proceso, la materia orgánica se oxida, dejando como residuo las cenizas, que contienen los componentes minerales del alimento (Reyes & Mendieta, 2000).

La determinación de cenizas es crucial porque proporciona información sobre el contenido de materia orgánica en los alimentos. Además, las cenizas pueden ser utilizadas para la evaluación de minerales específicos y son útiles en la estimación del Extracto Libre de Nitrógeno (Reyes & Mendieta, 2000).

## **Alimentos probióticos**

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del huésped. Se cree que contribuyen a mejorar el equilibrio microbiano en el organismo y reducen la colonización por bacterias patógenas. Pueden ser ingeridos por vía oral, adhiriéndose al epitelio gastrointestinal objetivo y manteniendo su estabilidad frente a la acidez y la bilis (Goodman et al., 2021).

Actualmente, estos microorganismos beneficiosos se encuentran fácilmente disponibles en diversas presentaciones como cápsulas, polvos y bebidas lácteas fermentadas. Además, son promocionados en tiendas naturistas, supermercados y a través de los medios de comunicación con diversos propósitos (Goodman et al., 2021).

### **Bacterias Ácido-lácticas (BAL)**

En 1907, el biólogo ucraniano y laureado con el Premio Nobel, Elie Metchnikoff, tras descubrir la bacteria *Lactobacillus bulgaricus* y dedicar la última década de su vida al estudio de las bacterias ácido-lácticas, llegó a la conclusión de que el consumo de productos que contienen estas bacterias puede prolongar la vida (Casado, 2017).

Al revisar la historia, se evidencia que la aparente innovación de recomendar alimentos con microorganismos vivos por sus efectos beneficiosos no es más que la recuperación de un concepto que ya existía, al menos desde principios del siglo XX. Este concepto se había perdido hasta hace menos de dos décadas. Originalmente, el término "probiótico" se empleaba para referirse a sustancias esenciales para mantener una buena salud. No fue sino hasta 1989 cuando Fuller acuñó el término "probiótico" para designar exclusivamente a aquellas bacterias vivas que, al ser ingeridas, mejoran la flora intestinal (Casado, 2017).

### **Evolución de los probióticos**



Desde tiempos antiguos, se ha reconocido el impacto beneficioso de la fermentación del ácido láctico en la salud humana. Las referencias a la leche agria se remontan incluso a la época bíblica. Tanto los antiguos romanos como los griegos poseían conocimientos sobre diversas recetas de leche fermentada, mientras que, en el antiguo Egipto, se consumía una variedad específica conocida como "leben raib", elaborada a partir de leche de búfala, vaca o cabra (Hosono, 1992). En los Balcanes, era común consumir un producto similar denominado "jahurt". En la India, las bebidas lácteas fermentadas eran conocidas entre los años 800 y 300 a.C., mientras que, en Turquía, su consumo se registraba en el siglo VIII. En otras regiones, como Rusia Central en el siglo XII y Hungría en el siglo XIV, se consumían bebidas lácteas como el "ajran" y el "tarho", respectivamente (Markowiak & Śliżewska, 2017).

Los microorganismos empleados como probióticos se originan de diversos géneros y especies, y han sido objeto de estudio en relación con una amplia gama de criterios de evaluación de la salud y enfermedades (Sanders et al., 2010). En la actualidad, los probióticos incluyen tanto levaduras, como la *Saccharomyces cerevisiae*, como bacterias, que abarcan las BAL como las especies de *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, además de *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Bacillus* y *Escherichia coli*.

Estos microorganismos pueden ser naturales, como aquellos presentes en los alimentos, o bien haber sido modificados genéticamente para lograr efectos específicos. La evaluación de su seguridad debe considerar la naturaleza del microorganismo utilizado, el método de administración, el nivel de exposición, el estado de salud de los consumidores y las funciones fisiológicas que se pretenden alcanzar (Sanders et al., 2010).

### **Actividad de los probióticos en el hombre**

Entre las numerosas ventajas que tienen los probióticos en el ser humano destaca el efecto sobre el desarrollo del microbiota que habita en el organismo, asegurando un equilibrio

adecuado entre los patógenos y las bacterias que son necesarios para el funcionamiento normal del organismo (Markowiak & Śliżewska, 2017).

Los efectos estimulantes del sistema inmunológico por parte de los probióticos podrían resultar particularmente ventajosos para individuos sanos con una función inmunitaria ligeramente comprometida, como aquellos sometidos a estrés, personas de edad avanzada, recién nacidos y mujeres embarazadas. Estos grupos enfrentan un mayor riesgo de enfermedades, tanto infecciosas como no infecciosas. La investigación ha evidenciado que la suplementación con probióticos en personas mayores de 69 años no solo aumenta la presencia de bacterias intestinales potencialmente beneficiosas, como las bifidobacterias, sino que también promueve una mayor activación de la respuesta inmunitaria no específica (Sanders et al., 2010).

Los probióticos demuestran su eficacia a través de interacciones probiótico-patógeno mediante una variedad de mecanismos defensivos. Por ejemplo, generan compuestos antimicrobianos, como la secreción de ácido láctico para reducir el pH, o se adhieren directamente a bacterias Gramnegativas para inhibir su crecimiento, siendo las especies de Lactobacilos ejemplos valiosos en este aspecto. Otro mecanismo de acción es la exclusión competitiva de patógenos. Para inducir síndromes patogénicos, los patógenos necesitan adherirse al epitelio gastrointestinal, y la inhibición competitiva ocurre cuando los probióticos compiten por el espacio de colonización, la nutrición y otros factores de crecimiento en las superficies mucosas del huésped, disminuyendo así la patogenicidad de los patógenos (Ma et al., 2023).

De este modo, los probióticos pueden inhibir de manera efectiva el desarrollo de bacterias patógenas como *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli*, diversas especies de *Shigella*, *Staphylococcus* y *Yersinia*, ayudando así a prevenir la intoxicación alimentaria. Se ha demostrado que los probióticos tienen un impacto

positivo en los procesos digestivos, el tratamiento de alergias alimentarias, la candidiasis y la prevención de caries dental (Markowiak & Śliżewska, 2017).

Ciertos microorganismos probióticos como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium adolescentis* y *Bifidobacterium pseudocatenulatum* son productores naturales de vitaminas del grupo B (B1, B2, B3, B6, B8, B9, B12). Y, a su vez, mejoran la eficiencia del sistema inmunológico, la absorción de vitaminas y minerales, así como estimulan la producción de ácidos orgánicos y aminoácidos (Markowiak & Śliżewska, 2017).

Los probióticos también están implicados en interacciones probiótico-huésped mediante capacidades inmunomoduladoras. Beneficios probióticos diversos se logran al equilibrar citocinas pro y antiinflamatorias, como la limitación del aumento de células T humanas por cepas de *Lactobacillus* (Peluso et al., 2007). Se sabe que mejoran la integridad de la barrera epitelial después de daños inducidos por diversos estados patológicos, como la ruptura de la mucosa por *Escherichia coli*. Algunas cepas fortalecen la barrera mucosa al inducir la producción de gránulos de mucina a partir de células caliciformes, previniendo la penetración de patógenos. Asimismo, muestran efectos sinérgicos con la microflora autóctona en la prevención de enteropatógenos (Ma et al., 2023).

Los fundamentos del efecto beneficioso de los probióticos en el ser humano se realizan a través de cuatro mecanismos principales (Markowiak & Śliżewska, 2017):

- 1) Antagonismo a través de la producción de sustancias antimicrobianas.
- 2) Competencia con patógenos por la adhesión al epitelio y los nutrientes.
- 3) Inmunomodulación del huésped.
- 4) Inhibición de la producción de toxinas bacterianas.

## **Criterios de evaluación de los probióticos**

La metodología utilizada para seleccionar las diferentes cepas de bacterias susceptibles de ser caracterizadas como probióticos debe evaluar ciertos criterios para asegurar las características funcionales una vez en el interior del organismo. Estos criterios deben basarse, en su capacidad de llegar vivas al intestino, por eso, los principales criterios a evaluar en los candidatos a probióticos son la resistencia al ácido del estómago y a las sales biliares del intestino.

### **a) Estabilidad en el paso por el estómago**

La resistencia de los microorganismos probióticos frente a los ácidos del estómago es esencial y varía entre especies. Dada la acidez del estómago con un pH de 1.5 y el tiempo de permanencia de 90 minutos las pruebas *in vitro* deben asegurar que los probióticos pueden mantener su viabilidad en esas condiciones, la composición de los alimentos junto con los probióticos puede tener un efecto protector contra la acidez gástrica (Rivas & González, 2006).

### **b) Resistencia a las sales biliares**

En el proceso de llegar al intestino para ejercer sus efectos beneficiosos, los microorganismos probióticos deben superar no solo el pH ácido del estómago, sino también el obstáculo de las sales biliares en el intestino delgado. Estas sales biliares representan un desafío significativo, ya que actúan como un bactericida natural (Rivas & González, 2006).

La concentración de estas sales en el intestino humano es variable y difícil de predecir. Entre las transformaciones microbianas de ácidos y sales biliares, destaca la hidrólisis, una reacción común en el tracto intestinal de los animales. *Lactobacillus reuteri* es uno de los microorganismos estudiados con detalle en este contexto, ya que tiene la capacidad de neutralizar la acción biocida de las sales biliares al desconjugarlas. Este mecanismo es utilizado por muchas bacterias resistentes a estas sales y contribuye a la reducción del colesterol plasmático. Para mejorar la resistencia de los probióticos durante su paso por el estómago y la primera parte del intestino, la literatura recomienda someterlos a condiciones de estrés subletal,

como el tratamiento con ácidos o calor, que induce la expresión de genes de respuesta adaptativa al estrés, haciéndolos más resistentes (Rivas & González, 2006).

c) Capacidad de adhesión al intestino

La capacidad de adhesión a las células epiteliales intestinales es crucial para los probióticos, ya que solo las cepas que pueden adherirse logran una colonización efectiva y proporcionan beneficios al interactuar con el huésped. La adhesión es más importante que el tamaño de la bacteria al competir con la flora existente. La falta de adhesión a la mucosa intestinal resultaría en una dilución insignificante de los probióticos después de la ingestión. Además, la colonización protectora del intestino previene la adhesión de patógenos posteriores, contribuyendo al desarrollo de un microbiota favorable. En el intestino delgado, donde la comunidad microbiana es menos diversa que en el colon, las biopsias intestinales son el mejor método para evaluar la adhesión de microorganismos, siendo crucial para la estimulación del sistema inmunológico a través de la administración oral de probióticos. Por último, la viabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento en refrigeración es esencial para que los probióticos mantengan su eficacia y beneficien la salud del consumidor, ya que la falta de resistencia a las condiciones industriales y la pérdida de viabilidad invalidaron sus efectos positivos (Rivas & González, 2006).

### **Normativa INEN**

El microorganismo o bacteria debe cumplir con los siguientes requisitos:

- a) Debe estar en estado de vida, no ser patógeno y tener su hábitat natural en el tracto digestivo humano.
- b) Necesita ser capaz de resistir en el tracto intestinal, es decir, ser resistente a los jugos gástricos y ácidos biliares.
- c) Debe poseer la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal.

- d) Debe tener la habilidad de colonizar el intestino.
- e) Debe contar con la capacidad de mantenerse vivo a lo largo de la vida útil del producto al que se agrega.
- f) El alimento debe contener un número igual o superior a  $1 \times 10^6$  UFC/g de bacterias viables de origen probiótico en el producto final hasta el final de su vida útil (NTE INEN 1334-3, 2011).

**Tabla 7**

Cantidad de microorganismos específicos en leche fermentada sin tratamiento térmico posterior a la fermentación

	Yugurt, Kumis, Kéfir, leche cultivada, leches fermentadas con ingredientes y leche fermentada mínimo	Kéfir y Kumis
PRODUCTO		Mínimo
Suma de microorganismos que comprenden el cultivo definido para cada producto	$10^7$ UFC/g	
Bacterias probióticas	$10^8$ UFC/g	
Levaduras		$10^4$ UFC/g

*Nota.*

Tomado de NTE INEN 2395, (2011).

**Tabla 8**

*Requisitos microbiológicos en leche fermentada sin tratamiento térmico posterior a la fermentación*

<b>Requisito</b>	<b>N</b>	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>c</b>	<b>Método de ensayo</b>
Coliformes totales, UFG/g	5	10	100	2	NTE INEN 1529-7
Recuento de <i>E.coli</i> , UFG/g	5	<1	-	0	NTE INEN 15298
Recuento de mohos y levaduras, UFC/g	5	200	500	2	NTE INEN 1529-10

*Nota.* En donde: n= Número de muestras a examinar, m= índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad, M= Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad, c= Número de muestras permisibles con resultados entre m y M. Fuente: Tomado de NTE INEN 2395, (2011).

### **Lactobacilos**

Los lactobacilos se han usado bastante en los procesos de fermentación para la conservación de alimentos. Su principal actividad antibacteriana se debe a la liberación de ácido láctico, que reduce el pH del entorno, así como el pH interno de las células de los patógenos. Sin embargo, los lactobacilos son capaces de producir otros ácidos orgánicos como el ácido acético, propiónico y feniláctico que contribuyen a la caída del pH del medio y a la posible inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos (Abuqwider et al., 2022).

### ***Limosilactobacillus reuteri***

*L. reuteri* es una de las cepas más estudiadas del género *Lactobacillus*. Su morfología y crecimiento se ven afectados por el genotipo del huésped y a los factores ambientales tales como

la temperatura, el pH, la concentración de oxígeno y los componentes de la dieta del huésped (Rao et al., 2021).

También puede desempeñar una función regulatoria en varias enfermedades sistémicas mediante un mecanismo inmunorregulador altamente complejo. Inicialmente, coloniza y permanece en el tracto gastrointestinal aprovechando sus propiedades de adhesión y su capacidad de resistir las condiciones ácido-base. Posteriormente, interactúa con las células epiteliales intestinales (IEC) del huésped, regulando la flora intestinal, fortaleciendo la barrera de la mucosa intestinal, modulando las células inmunitarias, los factores inflamatorios, las quimiocinas y los anticuerpos. Además, produce un derivado indol del triptófano, segrega exopolisacáridos (EPS) y otros factores bioactivos, mejora las uniones estrechas, regula la expresión génica, aumenta la actividad antioxidante y modula aún más el sistema inmunológico del huésped. Por lo que, *L. reuteri* tiene el potencial de ser utilizada como una terapia y complemento en enfermedades atópicas o autoinmunes (Luo et al., 2023).

### ***Metabolismo de L. reuteri***

Las BAL son organismos que pueden funcionar tanto aeróbica como anaeróticamente, obteniendo energía metabólica a partir de carbohidratos fermentables mediante fosforilación a nivel de sustrato. Muchas de estas bacterias no pueden sintetizar hemina y son auxotróficas para la menaquinona. No obstante, cuando ambos cofactores están presentes durante el crecimiento aeróbico, la NADH deshidrogenasa, junto con los citocromos respiratorios, bombea protones y apoya la producción de ATP mediante la actividad de la  $F_0F_1$ ATPasa (Ianniello et al., 2015).

La presencia de oxígeno u otros aceptores de electrones cambia el metabolismo de los lactobacilos heterofermentativos, desviando la producción principal de etanol hacia la producción de acetato a partir del acetilfosfato. El piruvato es metabolizado por diferentes enzimas alternativas, como lactato deshidrogenasa, el piruvato formiato liasa, el piruvato oxidasa o la a-



acetolactato sintasa. La producción de lactato es preferida en condiciones aeróbicas o anaeróbicas cuando hay un suministro abundante de sustratos. Aunque el oxígeno favorece la producción de acetato a partir de lactato durante la fase estacionaria de crecimiento, el lactato sigue siendo el metabolito principal (Ianniello et al., 2015).

La producción de concentraciones aproximadamente equimolares de lactato y acetato durante el crecimiento aeróbico de *L. reuteri* confirman el papel dominante del lactato deshidrogenasa en el metabolismo del piruvato (Ianniello et al., 2015).

### ***Lactiplantibacillus plantarum***

*Lactiplantibacillus plantarum* (*L. plantarum* LP5) exhibe una notable habilidad para ajustarse a diversos entornos y se distingue por su capacidad para combatir bacterias patógenas, mostrando efectividad antibacteriana frente a distintas cepas. La utilización de *L. plantarum* LP5 como posible probiótico podría representar una alternativa efectiva para mitigar la formación de biofilms de patógenos asociados a enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en la industria alimentaria. La capacidad de *L. plantarum* para reducir los biofilms de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* se evaluó a través de tres ensayos: competencia, exclusión y desplazamiento en el estudio de Ruiz et al., (2022).

(En las pruebas de competencia y exclusión, se observó una significativa disminución en la producción de biofilms de los patógenos mencionados debido al efecto antibacteriano de *L. plantarum* LP5 ( $p < 0,01$ ). En la prueba de desplazamiento, a pesar de la resistencia mostrada por el biofilm de *S. aureus* frente a *L. plantarum* LP5 ( $p < 0,01$ ), los biofilms de *E. coli* y *Salmonella* fueron reducidos al incorporar el cultivo de *L. plantarum* LP5 ( $p < 0,01$ ). La capacidad demostrada por *L. plantarum* LP5 para reducir los biofilms de bacterias patógenas relacionadas con ETA sugiere su potencial aplicación antibacteriana en la industria alimentaria (Ruiz et al., 2022).

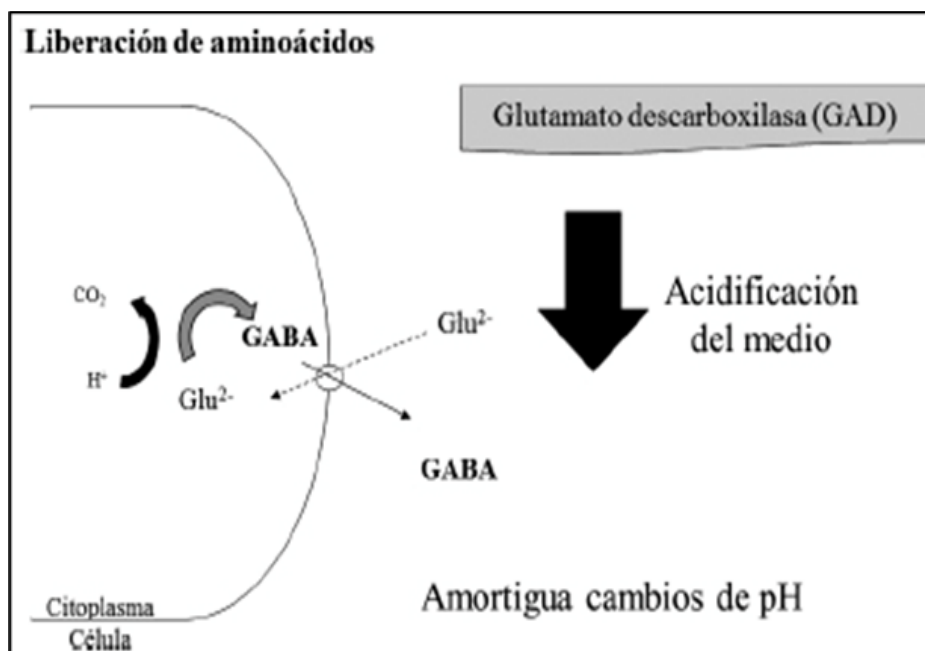
## Proceso de Obtención de Concentrados Proteicos con BAL

Las BAL son ampliamente utilizadas en la producción de alimentos fermentados debido a su capacidad para mejorar características de sabor, aroma y textura. Además, estudios han destacado que, durante el proceso de fermentación, las BAL generan compuestos bioactivos beneficiosos para la salud. Un ejemplo notable es el ácido gamma-aminobutírico (GABA), reconocido por sus efectos antihipertensivos, antidepresivos, hipoglucémicos y relajantes. *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* son géneros de BAL identificados como principales productores de GABA, aunque no todas muestran igual capacidad debido a factores como la actividad del enzima ácido glutámico descarboxilasa, la presencia del cofactor piridoxal 5' fosfato, las condiciones óptimas de crecimiento y la concentración de ácido glutámico en el alimento. La leche, rica en ácido glutámico, ha sido objeto de investigaciones centradas en evaluar la producción de GABA en productos lácteos fermentados como yogur, queso y leches fermentadas. Aunque se ha estudiado ampliamente el efecto antihipertensivo del GABA en lácteos, aún se requieren más investigaciones para comprender completamente el potencial de las BAL en el desarrollo de alimentos funcionales con beneficios asociados al GABA (Santos et al., 2018).

La síntesis de GABA por parte de las BAL tiene como principal objetivo protegerlas frente al estrés provocado por la disminución del pH. Este proceso implica la liberación de GABA desde el interior de la célula a través de un transportador glutamato-GABA, lo que resulta en un aumento del pH citoplasmático debido a la eliminación de iones hidrógeno (ver Figura 1). Aunque las BAL son conocidas por su tolerancia a ambientes ácidos y alcalinos, con capacidad para crecer en un rango de pH entre 4 y 4.5, que les permite prosperar naturalmente en medios ácidos donde otras bacterias no podrían sobrevivir (Santos et al., 2018).

**Figura 1**

Mecanismo de síntesis de GABA por las BAL



Nota. Fuente tomada de Santos et al., (2018).

Es relevante destacar que la presencia de la enzima GAD en las células de algunas especies bacterianas confiere un alto potencial para la producción de GABA (Li y otros, 2010). No obstante, la manifestación de la enzima GAD puede variar, dependiendo en gran medida del género, especie o cepa bacteriana. En consecuencia, la capacidad de una cepa específica para producir GABA es dependiente de la cepa y proporcional al contenido de ácido glutámico presente en la matriz alimentaria (Santos et al., 2018).

Las BAL se clasifican dentro del phylum *Firmicutes*, el cual engloba aproximadamente 20 géneros. Entre los principales miembros de las BAL se encuentran *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*, destacando que *Lactobacillus* es el género más extenso dentro de este grupo (Parra, 2010).

**Tabla 9***Clasificación de Información: Homofermentativas y Heterofermentativas en Bacterias Lácticas**(BAL)*

<b>Característica</b>	<b>Homofermentativas</b>	<b>Heterofermentativas</b>
<b>Definición</b>	Utilizan la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas, convierten 1 mol de glucosa en 2 moles de ácido láctico, produciendo más del 85% de ácido láctico.	Producen equimolarmente ácido láctico, CO <sub>2</sub> y etanol a partir de glucosa mediante las vías de la hexosa monofosfato o la de las pentosas. Generan solo la mitad de la energía del grupo homofermentativo.
<b>Ejemplos de Géneros</b>	Lactococcus, Pediococcus, Enterococcus, Streptococcus	Lactococcus, Lactobacillus, Enterococcus, Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus
<b>Enzimas Clave</b>	Aldolasa y Hexosa Isomerasa (sin Fosfocetolasa)	Fosfocetolasa (sin Aldolasa y Hexosa Isomerasa)
<b>Metabolismo</b>	Utilizan la ruta Embden-Meyerhoff.	Utilizan las vías de la hexosa monofosfato o la de la pentosa.
<b>Especies Heterolácticas y Homolácticas</b>	Lactobacillus plantarum, ramnosus, coryneformis (Heterolácticas); Lactobacillus acidophilus, helveticus (Homolácticas).	No especificado.

**Tabla 9***Clasificación de Información: Homofermentativas y Heterofermentativas en Bacterias**Lácticas (BAL)*

<b>Temperatura de Crecimiento</b>	Mesófilas: 20-25°C (Ejemplos: Lactococcus lactis, Leuconostoc mesenteroides). Termófilas: 40-45°C (Ejemplos: Lactobacillus delbruekii, Streptococcus thermophilus).	No especificado.
<b>Aplicaciones</b>	Quesos semimadurados (mesófilas); Yogurt y quesos maduros (termófilas).	No especificado.

*Nota.* Tomado de (Parra, 2010)**Tabla 10***Producción de Metabolitos por Bacterias Lácticas (BAL)*

<b>Metabolito</b>	<b>Función en Alimentos</b>	<b>Ejemplos de Producción</b>
Ácido Propiónico	Forma "ojos" en quesos (Emmental, suizo, Gruyere)	Producido por bacterias heterofermentativas en quesería.
Fermentación de Ácido Cítrico	Aromatizantes en mantequillas y quesos	Realizada por bacterias heterofermentativas (Leuconostoc citrovorum, Streptococcus diacetylactis)
Ácido Láctico	Preservación y fermentación de alimentos	Producido por diversas BAL como Lactobacillus, Streptococcus, Tetragenococcus, Bifidobacterium.

*Nota.* Tomado de (Parra, 2010).

**Tabla 11**

*Sustancias Antimicrobianas Producidas por BAL*

<b>Sustancia</b>	<b>Función</b>	<b>Ejemplos de Producción</b>
Peróxido de Hidrógeno	Sistema antimicrobiano natural en leche	Producido por el grupo Lactococcus.
Bacteriocinas	Componentes proteicos antibacterianos	Producidas por diversas BAL como agentes biopreservadores.

*Nota.* Tomado de (Parra, 2010)

**Otras Aplicaciones y Efectos de BAL**

EPS (Exopolisacáridos): Contribuyen a la textura y estabilidad de productos lácteos, utilizados como geles y emulsionantes.

Formación de Sabores y Olores: A través de la degradación de aminoácidos, influyendo en el sabor y olor de productos como el queso.

Producción de Endulzantes Bajos en Calorías: Conversión de lactosa en polioles como manitol y sorbitol.

Producción de Vitaminas: Algunas BAL pueden producir vitaminas B, folato, riboflavina y vitamina B12.

Bebidas Lácteas: Fermentación de lactosuero por BAL para mejorar la textura y sabor de bebidas lácteas.

Ensilaje: Uso de BAL para preservar forraje mediante la producción de ácido láctico (Parra, 2010).

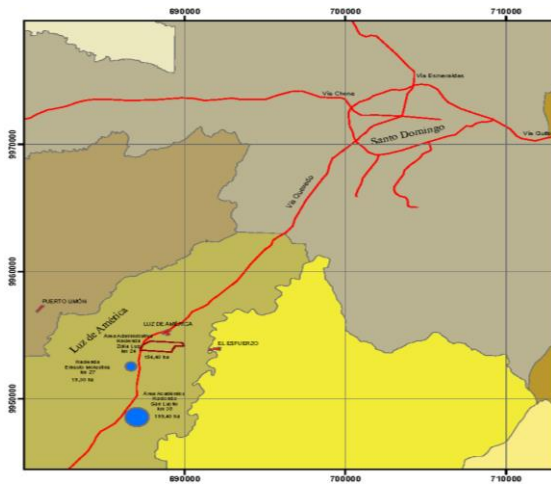
## Metodología

### Ubicación del Área de Investigación

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en el Laboratorio de Bromatología y Biociencias del Campus IASA II de la Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE", Extensión Santo Domingo de los Tsáchilas, localizada en la Parroquia Luz de América, Hacienda Zoila Luz, vía Quevedo km. 24 margen izquierdo.

### Figura 2. SEQ Ilustración \\* ARABIC 7

*Mapa de ubicación del Campus IASA II*



Nota. Adaptado de *Mapa de ubicación área administrativa, académica y de producción del IASA II*, por Uday, 2013.

### Tipo de Investigación

El presente proyecto se llevó a cabo como parte de una investigación experimental que abarcó desde la obtención de proteína a partir de dos tipos de leguminosas (soja (*Glycine max*) y frijol canario (*Phaseolus vulgaris*)) mediante dos métodos (agua ajustada al punto isoelectrico y solución hidroalcohólica) con la incorporación de bacterias ácido lácticas (*Limosilactobacillus reuteri* y *Lactiplantibacillus plantarum*) con propiedades probióticas. Se evaluó el efecto de este compuesto a lo largo del proceso

### ***Enfoque y Técnicas de Recolección de Datos***

Se utilizó un enfoque de investigación cuantitativo que empleó protocolos experimentales para seleccionar el método de obtención de proteínas a partir de dos tipos de leguminosas y a estos concentrados proteicos incorporar bacterias ácido lácticas para la producción de un alimento probiótico. Se realizaron mediciones de las variables de proteína, humedad, cenizas, acidez titulable, pH y análisis microbiológicos.

### ***Fuentes de Recopilación de Información***

Los fundamentos teóricos y la metodología experimental se recolectaron a partir de una exhaustiva revisión bibliográfica teniendo como fuentes principales de información a libros, artículos científicos y normativas técnicas y tesis de pregrado o postgrado.

### **Diseño Experimental**

#### ***Tipo de Diseño Experimental***

Para evaluar la eficacia de los concentrados proteicos derivados de leguminosas con la inclusión de bacterias ácido lácticas con propiedades probióticas, se llevó a cabo un diseño experimental de bloques completos al azar (DBCA) con un diseño factorial  $A \times B \times C$  ( $2 \times 2 \times 2$ ). El factor A representa los tipos de leguminosas, el factor B los métodos de extracción de proteínas y el factor C los tipos de bacterias ácido lácticas. Se establecieron 8 tratamientos con 3 repeticiones cada uno, totalizando 24 unidades experimentales. Los datos fueron analizados mediante ANOVA con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . El análisis estadístico y la elaboración de gráficos se llevaron a cabo utilizando Microsoft Excel y Statgraphics 19.

#### ***Variabes Dependientes del ANOVA***

- Proteína (%)
- Humedad (%)
- pH
- Cenizas (%)
- Acidez titulable (%)



## Factores y Niveles del Diseño Factorial

**Tabla 12**

Factores y niveles a evaluar en el estudio de los concentrados proteicos a partir de leguminosas con bacterias ácido lácticas.

Factores de estudio	Simbología	Niveles
Factor A: Leguminosas	a0	Soja
	a1	Frijol canario
Factor B: Métodos	b0	Punto Isoeléctrico
	b1	Solución Hidroalcohólica
Factor C: Bacterias ácido lácticas	c0	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
	c1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>

## Tratamientos del Diseño Factorial

**Tabla 13**

Tratamientos a comparar en el estudio de los métodos de obtención de concentrados proteicos a partir de leguminosas implementando bacterias ácido lácticas.

Tratamientos	Simbología	Descripción
T1	a0 + b0 + c0	Soja + Punto isoeléctrico + <i>Limosilactobacillus reuteri</i>
T2	a0 + b0 + c1	Soja + Punto isoeléctrico + <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
T3	a0 + b1 + c0	Soja + Solución Hidroalcohólica + <i>Limosilactobacillus reuteri</i>
T4	a0 + b1 + c1	Soja+Solución hidroalcohólica+ <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
T5	a1 + b0 + c0	Frijol + Punto isoeléctrico + <i>Limosilactobacillus reuteri</i>
T6	a1 + b0 + c1	Frijol + Punto isoeléctrico + <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
T7	a1 + b1 + c0	Frijol + Solución hidroalcohólica + <i>Limosilactobacillus reuteri</i>
T8	a1 + b1 + c1	Frijol+Solución hidroalcohólica+ <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>

### **Análisis Estadístico del Diseño Factorial**

**Tabla 14**

*Esquema del análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el método óptimo de obtención de concentrados proteicos a partir de leguminosas implementando bacterias ácido lácticas.*

<b>Fuente de variación</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>
Factor A	$SC_A$	1
Factor B	$SC_B$	1
Factor C	$SC_C$	1
Interacción (AxB)	$SC_{AB}$	1
Interacción (AxC)	$SC_{AC}$	1
Interacción (BxC)	$SC_{BC}$	1
I (AxBxC)	$SC_{ABC}$	1
Réplicas	$SC_R$	2
Error	$SC_E$	14
Total	$SC_T$	23

### **Análisis Funcional del Diseño Factorial**

Para evaluar los tratamientos en el diseño factorial AxBxC que obtuvieron una diferencia estadísticamente significativa, se realizó la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### **Análisis de Componentes Principales**

Con el propósito de simplificar la interpretación del conjunto de datos completo, con los resultados fisicoquímicos, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con una extracción fija de 3 factores y un método de rotación Quartimax.

## Materiales

**Tabla 15.**

Reactivos, insumos y equipos para la preparación de las muestras vegetales soja (*Glycine max*) y frijol canario (*Phaseolus vulgaris*).

Reactivos	Insumos/Materiales	Equipos
ninguno	Bandejas de metal	Molino pulverizador
	Tamiza No. 60	JIAWANSHUN
	Agua destilada	

**Tabla 16.**

Reactivos, insumos y equipos para la extracción de grasa de soja y frijol canario

Reactivos	Insumos/Materiales	Equipos
Éter de petróleo	Vasos de vidrio	Balanza analítica
	Pinza	Estufa
	Cuchara	Desecador
	Guante resistente a calor	Equipo extracción de grasa

**Tabla 17.**

Reactivos, insumos y equipos método ajuste de agua al punto isoeléctrico.

Reactivos	Insumos/Materiales	Equipos
Hidróxido de sodio	Cuchara	Potenciómetro
Ácido Clorhídrico	Vasos de precipitación	Plancha magnética
	Barra magnética	Centrífuga
	Frascos de plástico estériles	Liofilizador

**Tabla 18.**

Reactivos, insumos y equipos método solución hidroalcohólica.

Reactivos	Insumos/Materiales	Equipos
Etanol 50%	Cuchara	Potenciómetro
Ácido Clorhídrico	Vasos de precipitación	Plancha magnética
	Barra magnética	Centrífuga
	Frascos de plástico estériles	Liofilizador

**Tabla 19.**

Reactivos, insumos y equipos para la determinación de proteínas.

Reactivos	Insumos/Materiales	Equipos
Ácido sulfúrico concentrado	Papel filtro endurecido	Balanza analítica
Hidróxido de sodio 40%	Matraz Erlenmeyer 500 ml	Equipo automático
Catalizador	Tubos de muestra 300 ml	Kjeldahl
Indicador mixto (Rojo de metilo y verde de bromocresol)	Rack para tubos de muestra	Plancha de agitación magnética
Ácido bórico 2%	Magnetos	Campana extractor de gases
Agua destilada	Bureta	
Ácido clorhídrico 0,1 N		

**Tabla 20.**

Reactivos, insumos y equipos para la determinación de humedad.

Reactivos	Insumos/Materiales	Equipos
Ninguno	Crisoles de porcelana	Balanza analítica
	Pinza	Estufa
	Cuchara	Desecador
	Bandeja de metal	
	Guante resistente a calor	

**Tabla 21.**

Reactivos, insumos y equipos para la determinación de cenizas.

Reactivos	Insumos/Materiales	Equipos
Ninguno	Crisoles de porcelana	Balanza analítica
	Pinza	Mufla
	Cuchara	Desecador
	Guante resistente a calor	

**Tabla 22.**

Reactivos, insumos y equipos para la determinación de acidez titulable.

Reactivos	Insumos/Materiales	Equipos
Etanol 90%	Matraz Erlenmeyer	Plancha de agitación
Hidróxido de sodio 0,02N	Soporte universal	magnética
Fenolftaleína	Bureta 25 ml	
	Barra magnética	

**Tabla 23.**

Reactivos, insumos y equipos para la determinación de pH

Reactivos	Insumos/Materiales	Equipos
Ninguno	Vasos de precipitación	Potenciómetro
	Agua destilada	

## Métodos

### Preparación de las leguminosas.

La soja (*Glycine max*) y el frijol canario (*Phaseolus vulgaris*) fueron sometidos a un proceso detallado que incluyó varias etapas para su preparación antes de la extracción proteica:

**Limpieza:** Los granos fueron limpiados manualmente para retirar cualquier material extraño, granos pequeños o rotos, asegurando la pureza de la muestra.

**Remojo:** Los granos fueron remojados en agua destilada durante 6 horas con una relación de 1/5 (p/v). Este proceso ayudó a ablandar la estructura del grano para facilitar su procesamiento posterior.

**Descascarado:** Después del remojo, se realizó el descascarado de forma manual para eliminar la cáscara de los granos. La cáscara, al haber sido ablandada por el remojo, pudo ser retirada con mayor facilidad.

**Secado:** Los granos descascarados fueron secados en una estufa a 32°C durante 12 horas para eliminar la humedad y preparar los granos para la siguiente etapa.

**Molienda:** Los granos secos fueron molidos en un Molino pulverizador JIAWANSHUN para obtener una harina de partículas pequeñas. Este proceso facilita la extracción proteica y la separación de componentes no proteicos.

**Tamizado:** La harina resultante de la molienda fue tamizada a través de una malla número 60 para obtener una harina fina y uniforme.

Finalmente, la harina obtenida en todas estas etapas fue almacenada en bolsas de polietileno de baja densidad para su conservación hasta su uso posterior. Este proceso de

preparación garantiza la calidad y pureza de las muestras de soja y frijol canario para su posterior análisis, extracción de grasa y obtención de concentrado proteico.

### **Extracción de grasa**

Para la extracción o determinación de grasa, se utilizó el método Soxhlet de la norma técnica NTE INEN 0523 (1981).

El método es aplicable en muestras de alimentos con alto y bajo contenido en grasa, alimentos que han sido sometidos a tratamientos térmicos.

- Preparación de la muestra.
  - Preparación del material: Los vasos de vidrio se lavaron y luego se sometieron a un proceso de secado en la estufa a una temperatura de 100 °C durante 1 hora. Después de este tiempo, se trasladan los vasos al desecador hasta que alcancen la temperatura ambiente, para estar listos para su uso.
  - Preparación de la muestra: La muestra sólida fue sometida a un proceso de molienda y posteriormente tamizado para obtener una muestra fina y homogénea, que fue utilizada para el análisis.
- Proceso de análisis de la muestra.

Una vez preparados, los vasos fueron pesados, etiquetados y se registró su peso inicial (m1). Luego, se introdujeron en la cabina extractora de gases y se les añadieron 50 ml de éter de petróleo cada uno. Por otro lado, se colocó papel filtro sobre la balanza y se taró para pesar 20 gramos de muestra (m0). El papel filtro se cerró formando un cartucho, que se introdujo en un dedal junto con algodón sobre la muestra. Posteriormente, se colocó cada dedal en el equipo de extracción de grasa, ajustando los vasos con éter de petróleo debajo de cada uno. Se encendió y calibró el equipo, presionando en "set" y "↙", luego se bajó la palanca grande para sumergir el dedal en el éter de petróleo y se subió



la palanca pequeña a "Immersion (I)", abriendo la válvula para comenzar la primera fase a una temperatura de 90 °C durante 60 minutos. En la segunda fase, se bajó la palanca pequeña a "Washing (W)" a la misma temperatura durante 90 minutos. Finalmente, en la última fase, se bajó la palanca pequeña a "Recover (R)", se cerró la válvula y se continuó con el proceso a la misma temperatura durante 15 minutos. Después del tiempo establecido, se levantó el dedal con la palanca grande para retirar el vaso, que fue introducido en una estufa a 100 °C durante 30 minutos. Una vez pasado este periodo, se procedió a pesar y registrar el peso del vaso con la grasa ( $m_2$ ).

- Cálculo y expresión de resultados.
  - La determinación de grasa en la muestra, se cuantifica a partir de la diferencia de peso. De acuerdo a esto, el cálculo del contenido en porcentaje de grasa en la muestra se realiza con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Grasa} = \left( \frac{m_2 - m_1}{m_0} \right) * 100 \quad (\text{ecuación. 1})$$

Donde: % Grasa: porcentaje de grasa expresado en  $g/100 g$ .

$m_0$ : masa en gramos de la muestra.

$m_1$ : masa en gramos del vaso de vidrio vacío.

$m_2$ : masa en gramos del vaso más la grasa.

### **Métodos de obtención de proteínas de las leguminosas.**

Para la obtención de concentrados proteicos se emplearon dos métodos el primero es por medio del ajuste de agua al punto isoeléctrico descrito en el estudio de Munive Ledesma, 2009 y el segundo es con solución hidroalcohólica del estudio de Tan et al., 2023, para ambas leguminosas, la soja (*Glycine max*) y el frijol canario (*Phaseolus vulgaris*). A continuación, se describen los métodos con ciertas modificaciones:

### **Método de punto isoeléctrico.**

Extracción alcalina: La obtención de la proteína de las leguminosas se realizó en dos fases. En la primera fase, se preparó una suspensión con una proporción de harina/agua de 1:8 (p/v), y se ajustó el pH a 8 con NaOH 6N. Luego, se agitó durante 30 minutos con un agitador mecánico, se centrifugó a 9000 rpm y se recuperó el líquido sobrenadante. En la segunda fase, la fracción insoluble de la fase anterior se volvió a suspender en agua con una relación de 1:8 (p/v), se ajustó el pH a 8 con NaOH 6N, se agitó durante 30 minutos y se centrifugó a 9000 rpm. Se recuperó el líquido sobrenadante y se descartó el material insoluble.

Precipitación ácida: La precipitación de la proteína se llevó a cabo en los líquidos sobrenadantes combinados de la primera y segunda fase de la extracción. Se ajustó el pH a 4,5 con HCl 6N, se agitó durante 30 minutos y se centrifugó a 9000 rpm. Esto produjo dos fracciones: el líquido sobrenadante, que se desechó, y una pasta proteica, que luego se congeló.

### **Método de solución hidroalcohólica.**

En base al estudio de Tan et al., 2023, se utilizó etanol concentrado para diluir con agua destilada y obtener etanol 50 % v/v con. Se realizó proporción de 1:10 (p/v) entre el polvo de la muestra vegetal y etanol 50%, se almacenó en matraz erlenmeyer con tapa durante 10 días, cada dos días se agitó con una plancha magnética agitadora durante 1 hora, después de los 10 días se centrifugaron a 9000 rpm durante 20 min, se almacena el precipitado y se desecha el sobrenadante.

En la segunda fase, el precipitado obtenido se añade la misma cantidad de etanol 50% indicada en la primera fase, se añade ácido clorhídrico 6N hasta llegar a pH 4,5, agitando durante 1 hora, después del tiempo se centrifugó obteniendo el sólido insoluble y se procedió a congelar.

### **Activación de las bacterias ácido lácticas.**

**Preparación del caldo:** En un matraz erlenmeyer se pesaron 55,25 gramos del polvo del caldo MRS y se añadió 1 litro de agua destilada. Se dejó reposar 5 minutos. Con una plancha magnética de calentamiento se agitó constantemente hasta que llegar a ebullición durante 1 o 2 minutos para la disolución total del polvo. Se distribuye en cuatro matraces erlenmeyer de 250 ml y se tapan con tapones de algodón forrados con gasa, se esterilizaron en la autoclave a  $121^{\circ}C$  durante 15 minutos

**Activación de las bacterias:** Dentro de la cámara de flujo laminar se introducen los erlenmeyer con el caldo a temperatura ambiente, las puntas esterilizadas, micropipeta, dos mecheros, tubo eppendorf con la bacteria *Limosilactobacillus reuteri* y el otro tubo eppendorf con la bacteria *Lactiplantibacillus plantarum*. Se usaron dos erlenmeyers para cada bacteria ácido láctica. El proceso que se describe de Bustos Gutierrez, 2013 a continuación es en término general para los dos tipos de bacterias:

En la cámara de flujo laminar, se destapó el matraz erlenmeyer cerca de la llama para evitar la contaminación. Con la micropipeta, se tomaron 200 microlitros del tubo eppendorf con la bacteria ácido láctica y se introdujo en el matraz erlenmeyer. Luego, se tapó nuevamente el matraz, sellándolo con parafilm alrededor de la boquilla.

Se almacenó el matraz en la estufa a  $37^{\circ}C$  durante 12 horas en el caso de *Lactiplantibacillus plantarum* y durante 48 horas para la *Limosilactobacillus reuteri*. Este tiempo de incubación permite que las bacterias se desarrollen y crezcan en el caldo.

### **Incorporación de bacterias al concentrado proteico.**

En el estudio de Huang et al., 2017, indicó que las bacterias por su potencial probiótico, dan beneficios para la salud cuando se administran en vivo y en cantidades adecuadas. Los efectos beneficiosos de los probióticos dependen de la cepa o especie específica, la dosis y la viabilidad de la bacteria ingerida. De acuerdo a Corona-Hernandez et al., 2013, la Federación

Internacional de Productos Lácteos (IDF) recomienda un mínimo de  $10^6$  células bacterianas probióticas vivas por gramo o mililitro de producto en el momento del consumo.

Por lo tanto, para llevar a cabo el siguiente paso del proceso, se colocaron los concentrados proteicos en frascos de plástico estériles dentro de la cámara de flujo laminar. Estos concentrados fueron preparados previamente de la siguiente manera: Concentrado proteico de soja obtenido mediante el método de ajuste del agua al punto isoeléctrico; Concentrado proteico de frijol canario obtenido mediante el método de ajuste del agua al punto isoeléctrico; Concentrado proteico de soja obtenido mediante el método de solución hidroalcohólica; y Concentrado proteico de frijol canario obtenido mediante el método de solución hidroalcohólica.

A cada uno de estos concentrados se les añadió una bacteria ácido láctica (*Limosilactobacillus reuteri* y *Lactiplantibacillus plantarum*) en una relación de 1:1 (v/m), lo que resultó en un total de ocho frascos, cuatro para cada bacteria y se taparon los frascos.

## **Liofilización**

Después de la incorporación de las bacterias a los concentrados proteicos se realizó el proceso de liofilización descrito por Navas Ramirez, 2006:

**Congelación:** El material a liofilizar se congela a temperaturas muy bajas, generalmente entre  $-40^{\circ}\text{C}$  y  $-50^{\circ}\text{C}$ . Esta congelación rápida ayuda a preservar la estructura celular y evitar la formación de grandes cristales de hielo que puedan dañar la estructura del producto.

**Sublimación:** Una vez congelado, el material se somete a vacío, lo que reduce la presión y provoca que el agua congelada pase directamente del estado sólido al estado gaseoso, sin pasar por el estado líquido (proceso de sublimación). Este paso elimina el agua del producto, dejando una matriz sólida con la estructura y propiedades originales del material.

Desorción: Después de la sublimación, se aplica un ligero calentamiento al material para eliminar cualquier agua residual que pueda quedar. Este paso, conocido como desorción, ayuda a asegurar que el producto final esté completamente seco y estable durante el almacenamiento.

Sellado: Una vez completado el proceso de liofilización, el producto se sella herméticamente en envases adecuados para protegerlo de la humedad y otros factores que puedan afectar su calidad durante el almacenamiento y transporte.

### **Determinación de humedad**

Se utilizó el método gravimétrico de la norma técnica ecuatoriana NTE INEN 518:1981.

El método es aplicable a alimentos sólidos, líquidos o pastosos con un contenido de humedad superior a 0,2 %. Se basa principalmente en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa de la muestra desecada a una temperatura determinada.

- Preparación de los materiales y muestra.
  - Preparación de materiales: Se lavaron los crisoles de porcelana y luego se sometieron a un proceso de secado en la estufa a 133 °C durante 30 minutos. Una vez completado el secado, se usaron guantes y pinzas para trasladar los crisoles a un desecador, donde se enfriaron hasta alcanzar la temperatura ambiente. Este procedimiento garantizó que los crisoles estuvieran limpios, secos y a temperatura ambiente antes de su uso.
  - La preparación de la muestra: La muestra sólida se mezcla para homogeneizar y ser analizada.
- Proceso de análisis de la muestra.
  - Una vez listo el material, se llevó a cabo la medición de su masa del crisol vacío ( $m_0$ ). Posteriormente, se taro inmediatamente para eliminar cualquier variación en la masa inicial y se procedió a pesar 2 gramos de la muestra ( $m_1$ ). Seguidamente,

se introdujo el crisol con la muestra en la estufa a 133 °C durante 2 horas para su secado. Una vez completado el tiempo de secado, el crisol fue retirado de la estufa con la ayuda de una pinza y se dejó enfriar dentro del desecador durante 30 minutos, hasta alcanzar la temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se procedió de inmediato a pesar y registrar la masa del crisol con la muestra seca ( $m_2$ ).

- Cálculos y expresión de resultados.
  - Lo que se determinó fue el contenido de agua en la muestra por diferencia de peso, expresado en porcentaje (%) de humedad. Se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \left( \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \right) * 100 \quad (\text{ecuación. 2})$$

Donde: % *Humedad*: porcentaje de humedad expresado en  $g/100 g$ .

$m_0$ : masa en gramos del crisol vacío.

$m_1$ : masa en gramos del crisol más la muestra.

$m_2$ : masa en gramos del crisol más la muestra seca.

### **Determinación de ceniza**

Para la determinación de cenizas en muestras, se utilizó el método gravimétrico de la norma técnica ecuatoriana NTE INEN 520:2012.

Este método se fundamenta en la destrucción de la materia orgánica presente en la muestra mediante calcinación, seguida de la determinación gravimétrica del residuo.

- Preparación de la muestra.
  - Preparación del material: Los crisoles de porcelana se preparan para el análisis de la siguiente forma, se limpian cuidadosamente y luego se someten a un

proceso de secado en la mufla a 550 °C durante 30 minutos. Después de este tiempo, se utilizan guantes resistentes al calor y pinzas para trasladar los crisoles al desecador, donde se dejan enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente.

- Preparación de la muestra: La muestra sólida fue sometida a un proceso de molienda y posteriormente tamizado para obtener una muestra fina y homogénea, que fue utilizada para el análisis.
- Proceso de análisis de la muestra.

Una vez preparados los crisoles, se procedió a pesarlos y se registró su masa ( $m_0$ ). Luego, se taró y se pesaron 2 g de muestra ( $m_1$ ), registrando su masa. Los crisoles con la muestra se colocaron en la mufla y se calentaron a una temperatura de hasta 666 °C durante un período de 3 horas. Concluido el programa, se apagó la mufla y se retiraron los crisoles con las cenizas, dejándolos enfriar en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente. Con las pinzas se tomó el crisol con la ceniza para luego pesar y registrar su masa ( $m_2$ ).

- Cálculos y expresión de resultados.
  - El contenido de cenizas de la muestra se calcula por diferencia de peso y se expresa en porcentaje de cenizas. El cálculo de los resultados se realiza con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \left( \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \right) * 100 \quad (\text{ecuación. 3})$$

Donde: % *Cenizas*: porcentaje de cenizas expresado en  $g/100 g$ .

$m_0$ : masa en gramos del crisol.

$m_1$ : masa en gramos del crisol más la muestra.

$m_2$ : masa en gramos del crisol más las cenizas.

### Determinación de proteína.

Para la determinación de proteína, se utilizó el método titulometría, digestión Kjeldahl de la norma técnica NTE INEN 0519 (empleando coeficiente 6,25).

El método descrito es aplicable a alimentos sólidos, líquidos o pastosos con contenido alto o bajo en grasa, y que contengan 0,8 g de proteínas por cada 100 g. Se fundamenta principalmente en el procesamiento de la muestra mediante la destrucción de la materia orgánica hasta su disolución y oxidación. La destrucción se llevó a cabo mediante la ebullición de ácido sulfúrico concentrado, al que se le añadió un catalizador. Esto resultó en la formación de sulfato de amonio, el cual, al estar en exceso y al reaccionar con hidróxido de sodio, libera amoníaco, el cual es destilado y recolectado en ácido bórico. El borato de amonio obtenido se titula con ácido clorhídrico.

- Preparación de soluciones

- Solución de ácido bórico 2% (p/v).

Se disolvieron 20 g de ácido bórico en 80 ml de agua destilada y se completó el volumen hasta 1000 ml con más agua destilada en un matraz aforado.

- Solución de ácido clorhídrico 0.1 N.

Se procedió a verter 8,3 ml de ácido clorhídrico concentrado en el cuello de un matraz y se completó el volumen hasta 1000 ml con agua destilada. La mezcla se agitó de manera adecuada para lograr una homogeneización completa.

- Solución de hidróxido de sodio 40% (p/v).

Se llenó una bandeja con agua fría. Luego, se colocó un vaso de precipitados de 900 ml en la bandeja y en el vaso de precipitación se introdujeron 200 g de hidróxido de sodio (NaOH), el cual se disuelve gradualmente con 300 ml de agua



destilada. Se esperó a que la reacción exotérmica alcanzara la temperatura ambiente y luego se completó el volumen hasta los 500 ml con agua destilada, aforando así la solución.

- Preparación de la muestra
  - La muestra sólida fue sometida a un proceso de molienda y posteriormente tamizada para obtener una muestra fina y homogénea, que fue utilizada para el análisis.
- Proceso de análisis
  - Digestión: Se llevó a cabo la preparación de la muestra de manera cuidadosa y precisa. Se pesaron 0,3 g de la muestra y se registró este peso para garantizar la exactitud en las mediciones. Posteriormente, en un ambiente controlado dentro de la campana extractora de gases, se añadió una tableta del catalizador a la muestra. Luego, se procedió a verter lentamente 5 ml de ácido sulfúrico concentrado sobre la muestra. Es importante destacar que este paso se realizó con precaución debido a la naturaleza corrosiva del ácido sulfúrico.

Una vez preparada la muestra con los reactivos, se colocó en el equipo digestor y se activó el colector de humos para asegurar un ambiente seguro. El proceso de digestión se llevó a cabo a una temperatura de 420 °C durante 30 minutos, controlando cuidadosamente las condiciones en el proceso. Tras la digestión, se observó que la muestra se encontraba completamente cristalina, con un color verde o azul característico y sin presencia de vapores. Se permitió que la muestra se enfriara naturalmente durante aprox. 2 horas hasta alcanzar la temperatura ambiente, evitando la formación de precipitados mediante una agitación ocasional.

- Destilación: Por otra parte, se conectó el tubo con la muestra al equipo destilador y se adicionaron 10 ml de agua destilada, asegurándose de conectar el equipo inmediatamente para evitar la pérdida de vapores. Posteriormente, en un matraz erlenmeyer se colocaron 50 ml de ácido bórico al 2%, el cual se conectó al sistema de destilación, asegurándose de que la salida del destilador quedará sumergida en la solución de ácido bórico. A continuación, se adaptó herméticamente el tubo que contiene la muestra digerida, y se agregaron un total de 30 ml de hidróxido de sodio al 40%, observando la reacción hasta que no se observó cambio en la coloración y el fin del burbujeo. Se recogieron aproximadamente 200 ml del destilado para su posterior análisis. Una vez finalizado el proceso de destilación, se procedió a lavar el sistema conectando un tubo con agua destilada y destilando solo con agua durante 2 minutos, repitiendo este paso si fuera necesario.
- Titulación: Después, se obtuvo un destilado que se colocó en el matraz Erlenmeyer con el ácido bórico. Luego, se agregaron 4 gotas de indicador mixto al destilado. Posteriormente, se tituló el destilado con ácido clorhídrico 0.1 N hasta que el indicador cambió de color, pasando de verde a rosado pálido. Se registró el volumen del ácido consumido durante la titulación.
- Cálculo y expresión de resultados.
  - La determinación de proteína en la muestra, se cuantifica a partir del contenido de nitrógeno en la muestra. De acuerdo a esto, el cálculo del contenido de proteína en la muestra se realiza con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Proteínas} = \%N * F \quad (\text{ecuación. 4})$$

Donde: %N: nitrógeno presente en la muestra

F: factor de proteínas

El cálculo del porcentaje de nitrógeno presente en la muestra se realiza según la siguiente fórmula:

$$\% N = 1,4 * N * (V_1 - V_0) / m \quad (\text{ecuación. 5})$$

Donde: 1,4: factor de nitrógeno.

N: normalidad del ácido clorhídrico.

$V_1$ : volumen gastado de ácido clorhídrico en la titulación en la muestra en ml.

$V_0$ : volumen gastado de ácido clorhídrico en la titulación en el blanco en ml.

$m$ : masa de la muestra

### **Determinación de acidez,**

Para la determinación de acidez titulable en muestras vegetales se utilizó la norma técnica NTE INEN 521 (2013).

El método es aplicable en muestras sólidas, líquidas o pastosas, Se basa principalmente en la acidez titulable como ácido sulfúrico y determinada mediante procedimientos normalizados.

- Proceso de análisis de la muestra.
  - Se pesa 5 g de la muestra y se transfiere al matraz Erlenmeyer, se agrega 50 ml de alcohol de 90% (V/V) neutralizado, luego se tapa el matraz Erlenmeyer y se agita. Se deja en durante 24 horas y se mezcla de vez en cuando. Pasado el tiempo, se procede a recolectar con la pipeta una alícuota de 10 ml del

sobrenadante y se transfiere a otro matraz Erlenmeyer y se agregó 2 ml de la solución indicadora de fenolftaleína. Se hace la titulación con la solución 0.02 N de hidróxido de sodio hasta conseguir un color rosado pálido que persista durante 30 s.

- Cálculo y expresión de resultados.
  - La determinación de acidez en la muestra, se cuantifica a partir de la siguiente fórmula.

$$\% \textit{Acidez titulable} = \left( \frac{490 NV}{m(100-H)} \right) \frac{V_1}{V_2} \quad (\text{ecuación. 6})$$

Donde: % A = contenido de acidez en la muestra de origen vegetal, en porcentaje de masa de ácido sulfúrico.

N = normalidad de la solución de hidróxido de sodio.

V = volumen de la solución de hidróxido de sodio empleado en la titulación, en cm.

V1 = volumen del alcohol empleado en ml.

V2= volumen de la alícuota tomada para la titulación.

m = masa de la muestra, en g.

H = porcentaje de humedad en la muestra

### **Determinación de potencial de hidrógeno,**

Para la determinación del concentrado de ion hidrógeno (pH) utilizando potenciómetro de la norma NTE INEN526:2012.

- Proceso de análisis de la muestra.
  - Se pesó 10 g de la muestra y se transfirieron al vaso de precipitación, se agregaron 100 ml de agua destilada y se mezcló durante 30 minutos hasta que

esté homogénea. Pasado el tiempo, se procede a dejar en reposo durante 10 minutos para que se genere la decantación, se realiza la lectura directa del pH con el potenciómetro.

### **Análisis Microbiológico**

**Preparación de las Muestras.** El concentrado proteico de la leguminosa con la implementación de bacteria ácido láctica, al ser un producto en polvo se procedió realizó una relación 1:10 (p/v) en agua de peptona tamponada (autoclavada).

**Cultivo en 3M Placas Petrifilm™ para Recuento de Enterobacterias (EB).** Dentro de la cámara de flujo laminar, se tomó una alícuota de 1 mL de la muestra diluida con una micropipeta, se colocó en el segundo tubo con agua de peptona, del segundo tubo se tomó 1 ml de la muestra diluida y se colocó en el tercer tubo siendo esta dilución para análisis de estudio. Se levantó la lámina de protección de la placa Petrifilm™ para añadir la alícuota en el centro de la placa. Se volvió a colocar la lámina protectora y utilizando el molde circular de plástico se presiona cuidadosamente para su expansión uniforme, posteriormente se dejó durante 1 minuto para que se solidifique, finalmente se incubó la placa en una estufa a 28 °C durante 24 horas.

**Cultivo en 3M Placas Petrifilm™ para Recuento Rápido de Aerobios (RAC).** En una cámara de flujo laminar, se tomó una alícuota de 1 mL de la muestra diluida con una micropipeta, se levantó de forma parcial la lámina de protección de la placa y se añadió la alícuota en el centro de la lámina inferior. Se levantó la lámina de protección de la placa Petrifilm™ para añadir la alícuota en el centro de la placa. Se volvió a colocar la lámina protectora y utilizando el molde circular de plástico se presiona cuidadosamente para su expansión uniforme, posteriormente se dejó durante 1 minuto para que se solidifique, finalmente se incubó la placa en una estufa a 30 °C durante 72 horas.

**Cultivo en 3M Placas Petrifilm™ para Recuento de Coliformes (CC).** Dentro de la cámara de flujo laminar, se tomó una alícuota de 1 mL de la muestra diluida con una micropipeta,

se colocó en el segundo tubo con agua de peptona, del segundo tubo se tomó 1 ml de la muestra diluida y se colocó en el tercer tubo siendo esta dilución para análisis de estudio. Se levantó la lámina de protección de la placa Petrifilm™ para añadir la alícuota en el centro de la placa. Se volvió a colocar la lámina protectora y utilizando el molde circular de plástico se presiona cuidadosamente para su expansión uniforme, posteriormente se dejó durante 1 minuto para que se solidifique, finalmente se incubó la placa en una estufa a 28 °C durante 24 horas.

**Recuento de Microorganismos.** Se estimó la cantidad total de UFC por mililitro de muestra diluida para cada una de las 3M Placas Petrifilm™ empleando un contador de colonias digital aplicando la siguiente ecuación:

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{N \times F}{V}$$

Donde: N: Número de colonias identificadas.

F: Factor de dilución.

V: Volumen de la alícuota (1 mL).

## Resultados

### Resultados del estudio del método de optimización para obtención de concentrados proteicos de distintas leguminosas, mediante la incorporación de distintas bacterias ácido lácticas.

La tabla 24, indica que existe diferencia significativa en la interacción de los factores Factor A (Leguminosas), Factor B (Métodos) y su interacción, respecto al factor C y las interacciones AC y BC, no se encontró diferencia significativa, en cuanto a la réplica no se encontró diferencia significativa, por lo que se asume que existe normalidad en la toma de datos del experimento.

**Tabla 24**

Análisis de ANOVA para el resultado de proteína del concentrado proteico de leguminosas enriquecido con bacterias ácido lácticas para fines probióticos.

<i>F.V</i>	<i>S.C</i>	<i>Gl</i>	<i>C.M</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
FACTOR A: LEGUMINOSAS	800,29	1	800,36	19023771,66	<0,0001
FACTOR B: MÉTODOS	677,80	1	677,80	16110712,77	<0,0001
FACTOR C: BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	4,5E-05	1	4,5E-05	1,08	
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	576,13	1	576,13	13694144,08	<0,0001
AC	9,4E-06	1	9,4E-06	0,22	
BC	3,0E-05	1	3,0E-05	0,72	

**Tabla 24**

Análisis de ANOVA para el resultado de proteína del concentrado proteico de leguminosas enriquecido con bacterias ácido lácticas para fines probióticos.

ABC	3,4E-06	2	3,4E-06	0,08
RÉPLICA	3,3E-07	1	1,7E-07	4,0E-03
ERROR	5,9E-04	14	4,2E-05	
TOTAL	2054,29	23		

La tabla 25, indica que no se encontró diferencia significativa en los factores: A, B, C y las interacciones AB, AC, BC y ABC, en cuanto a la réplica no se encontró diferencia significativa, por lo que asumimos que existe normalidad en la toma de datos del experimento.

**Tabla 25**

Análisis de ANOVA para el resultado de humedad del concentrado proteico de leguminosas enriquecido con bacterias ácido lácticas para fines probióticos ( $p < 0,05$ ).

<i>F.V</i>	<i>S.C</i>	<i>Gl</i>	<i>C.M</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
FACTOR A: LEGUMINOSAS	5,4E-05	1	5,4E-05	2,2E-03	0,9636
FACTOR B: MÉTODOS	0,02	1	0,02	0,82	0,3815
FACTOR C: BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	2,6E-03	1	2,6E-03	0,11	0,7498



**Tabla 25**

Análisis de ANOVA para el resultado de humedad del concentrado proteico de leguminosas enriquecido con bacterias ácido lácticas para fines probióticos ( $p < 0,05$ ).

**INTERACCIONES**

AB	1,9E-04	1	1,9E-04	0,01	0,9313
AC	1,9E-03	1	1,9E-03	0,08	0,7844
BC	1,1E-04	1	1,1E-04	4,5E-03	0,9474
ABC	0,35	2	0,35	13,82	0,0023
RÉPLICA	0,01	1	3,9E-03	0,16	0,8569
ERROR	0,35	14	0,03		
TOTAL	0,73	23			

La tabla 26, indica que no se encontró diferencia significativa en los factores: A,B,C y las interacciones AB, AC, BC y ABC, en cuanto a la réplica no se encontró diferencia significativa, por lo que se asume que existe normalidad en la toma de datos del experimento.

**Tabla 26**

Análisis de ANOVA para el resultado de cenizas del concentrado proteico de leguminosas enriquecido con bacterias ácido lácticas para fines probióticos ( $p < 0,05$ ).

<i>F.V</i>	<i>S.C</i>	<i>Gl</i>	<i>C.M</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
FACTOR A: LEGUMINOSAS	0,00	1	0,00	0,00	0,0000

**Tabla 26**

Análisis de ANOVA para el resultado de cenizas del concentrado proteico de leguminosas enriquecido con bacterias ácido lácticas para fines probióticos ( $p < 0,05$ ).

FACTOR B: MÉTODOS	9,26	1	9,26	0,00	0,0000
FACTOR C:	0,00	1	0,00	0,00	0,0000
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS					
<b>INTERACCIONES</b>				0,00	
AB	0,00	1	0,00	0,00	0,0000
AC	0,00	1	0,00	0,00	0,0000
BC	0,00	1	0,00	0,00	0,0000
ABC	0,00	2	0,00	0,00	0,0000
RÉPLICA	0,00	1	0,00	0,00	0,0000
ERROR	0,00	14	0,00		
TOTAL	9,26	23			

La tabla 27, indica que no se encontró diferencia significativa en los factores: A,B,C y las interacciones AB, AC, BC y ABC, en cuanto a la réplica no se encontró diferencia significativa, por lo que se asume que existe normalidad en la toma de datos del experimento.

**Tabla 27**

Análisis de ANOVA para el resultado de acidez titulable del concentrado proteico de leguminosas enriquecido con bacterias ácido lácticas para fines probióticos ( $p < 0,05$ ).

<i>F.V</i>	<i>S.C</i>	<i>Gl</i>	<i>C.M</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
FACTOR A: LEGUMINOSAS	7,0E-04	1	7,0E-04	0,31	0,5877
FACTOR B: MÉTODOS	2,8E-03	1	2,8E-03	1,21	0,2893
FACTOR C: BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	0,01	1	0,01	4,59	0,0502
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	4,5E-04	1	4,5E-04	0,20	0,6638
AC	0,01	1	0,01	2,21	0,1596
BC	0,02	1	0,02	7,94	0,0137
ABC	0,01	2	0,01	2,23	0,1573
RÉPLICA	0,01	1	4,1E-03	1,78	0,2043
ERROR	0,03	14	2,3E-03		
TOTAL	0,08	23			

La tabla 28, indica que existe diferencia significativa en la interacción en el Factor C (Bacterias), respecto al factor A, B y las interacciones AB, AC, BC y ABC, no se encontró

diferencia significativa, en cuanto a la réplica no se encontró diferencia significativa, por lo que se asume que existe normalidad en la toma de datos del experimento.

**Tabla 28**

Análisis de ANOVA para el resultado de pH del concentrado proteico de leguminosas enriquecido con bacterias ácido lácticas para fines probióticos ( $p < 0,05$ ).

<i>F.V</i>	<i>S.C</i>	<i>Gl</i>	<i>C.M</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
FACTOR A: LEGUMINOSAS	3,4E-04	1	3,4E-04	0,14	0,7167
FACTOR B: MÉTODOS	3,4E-04	1	3,4E-04	0,14	0,7167
FACTOR C: BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	0,18	1	0,18	71,14	> 0,0001
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	7,0E-04	1	7,0E-04	0,29	0,6011
AC	9,4E-04	1	9,4E-04	0,38	0,5470
BC	1,5E-03	1	1,5E-03	0,61	0,4474
ABC	2,0E-04	2	2,0E-04	0,08	0,7776
RÉPLICA	2,0E-3	1	1,0E-03	0,41	0,6726
ERROR	0,03	14	2,5E-03		
TOTAL	0,22	23			

**Resultados de la comparación de dos leguminosas en la elaboración de concentrado proteico con la adición de bacterias ácido lácticas (factor A).**

**Tabla 29**

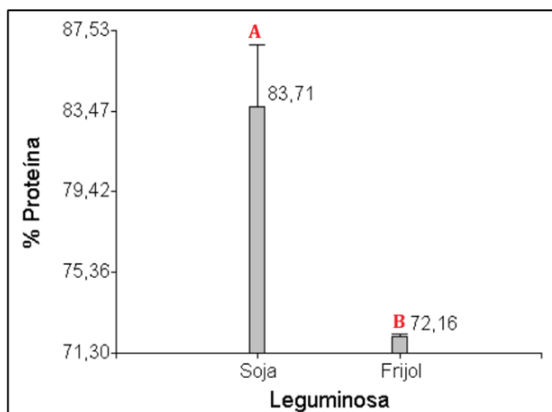
*Resultados de la evaluación de prueba de grupos homogéneos de los tipos de leguminosas con prueba Tukey ( $p \leq 0.05$ ).*

	Factor A: Leguminosas	
	Soja	Frijol
Proteína (%)	83,71 <sup>A</sup>	72,16 <sup>B</sup>
Humedad (%)	6,28 <sup>A</sup>	6,28 <sup>A</sup>
Cenizas (%)	3,38 <sup>A</sup>	3,38 <sup>A</sup>
Acidez titulable (%)	0,41 <sup>A</sup>	0,40 <sup>A</sup>
pH	4,58 <sup>A</sup>	4,57 <sup>A</sup>

*Nota.* Nivel de significancia:  $p < 0.05$ .

**Figura 3.**

Comparación de la proteína de dos leguminosas en la elaboración de concentrado proteico con la adición de bacterias ácido lácticas (factor A).



Al examinar el tipo de leguminosa utilizado, (ver tabla 29) podemos establecer que: En porcentaje de proteína, se establecieron dos grupos independientes donde el grupo A (Soja) mostró un mayor contenido de proteína en comparación con el grupo B (Frijol Canario), con medias de 83,71 % y 72,16% respectivamente. Se puede considerar esta diferencia por el contenido principal de las leguminosas (soja y frijol canario) en base seca sin la interferencia de ningún método de acuerdo a los estudios de Guamán J. et al., 2008; INIAP, 1994.

En cuanto al contenido de humedad, no se observaron diferencia significativa, ya que se obtuvieron valores medios de Soja (6,28%) y Frijol Canario (6,28%), estos valores no difieren debido a que la implementación de Soja y Frijol fue en forma de Harinas y presentan una humedad de 6 a 8 % según reporta Munive P. 2009.

Para la cantidad de cenizas, también se formó un único grupo (A) que incluyó a ambas leguminosas, con un valor de media de 3,38%, sin que se indique diferencia significativa.

En el caso de la acidez titulable, se formó un único grupo (A) que incluyó a ambas leguminosas, con un valor de media de 0,41% y 0,40% respectivamente, sin diferencia significativa entre ellas

Respecto al pH, no se observó diferencia significativa, formando un grupo A (soja y frijol canario) con un valor de medias de 4,58% y 4,57% respectivamente.

**Resultados de la comparación de dos métodos de extracción de proteína en la elaboración de concentrado proteico con la adición de bacterias ácido lácticas (factor B).**

**Tabla 30**

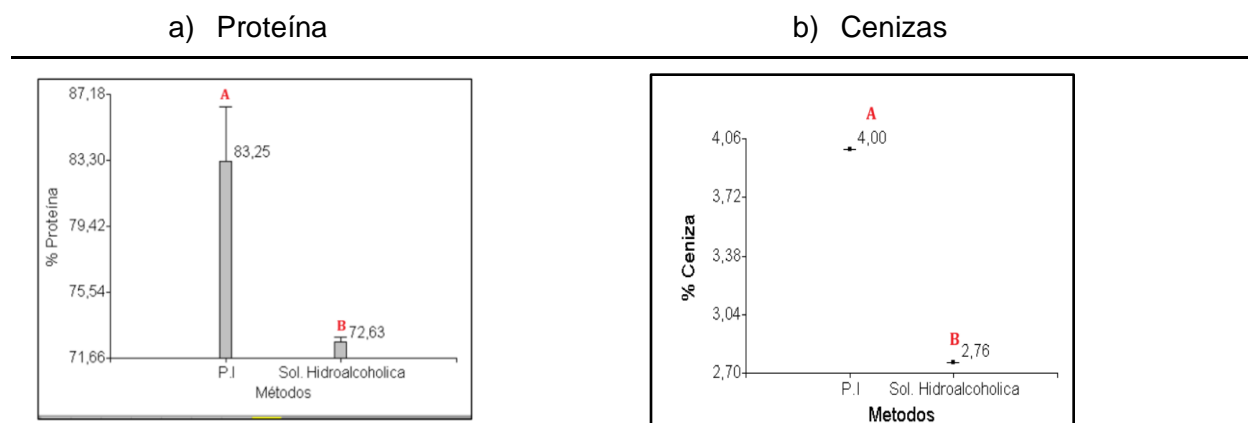
*Resultados de la evaluación de las propiedades bromatológicas de las dos leguminosas para la extracción de proteínas implementando bacterias ácido lácticas.*

<b>Factor B: Métodos</b>		
	Agua Ajustada al Punto Isoeléctrico	Solución Hidroalcohólica
Proteína (%)	83,25 <sup>A</sup>	72,63 <sup>B</sup>
Humedad (%)	6,31 <sup>A</sup>	6,25 <sup>A</sup>
Cenizas (%)	4,00 <sup>A</sup>	2,76 <sup>B</sup>
Acidez titulable (%)	0,41 <sup>A</sup>	0,40 <sup>A</sup>
pH	4,58 <sup>A</sup>	4,57 <sup>A</sup>

*Nota.* Nivel de significancia:  $p < 0.05$ .

**Figura 4.**

Comparación en las variables proteína y cenizas de dos métodos de extracción de proteína en la elaboración de concentrado proteico con la adición de bacterias ácido lácticas (factor B).



Al examinar el tipo de método utilizado, (ver tabla 30) podemos establecer que:

En porcentaje de proteína, se establecieron dos grupos independientes donde el grupo A (Agua ajustada al punto isoeléctrico) mostró un mayor contenido de proteína en comparación con el grupo B (solución hidroalcohólica), con medias de 83,25 % y 72,63% respectivamente. Se asume el mejor método es el grupo A, va a la par como el estudio de Jiménez, 2006, el cual indica que se produce una extracción alcalina del polvo de leguminosa desangrada para luego ser sometida a precipitación en pH ácido, obteniendo un producto refinado.

En cuanto al contenido de humedad, no se observaron diferencia significativa, y se obtuvieron valores medios en el agua ajustada al punto isoeléctrico (6,31%) y solución hidroalcohólica (6,25%), se considera que estos valores no difieren porque en ambos métodos se sometieron al proceso de liofilización por lo cual el contenido de agua se redujo siendo congruente con Ramírez Navas, 2006.

Para la cantidad de cenizas, se formaron dos grupos A (ajuste de agua al punto isoeléctrico) mostró mayor contenido de cenizas en comparación con el grupo B (solución hidroalcohólica), con medias de 4,00 % y 2,76 % respectivamente, por lo que se asume que existe diferencia significativa. El contenido de cenizas es indicador de material inorgánico presente en las muestras, en el caso del grupo A es entendible que sea mayor ya que al usar sustancias químicas básicas y ácidas es la presencia de residuos inorgánicos que quedaron después de la combustión de la materia orgánica indicado en el estudio de Márquez Sigvas, 2014.

En el caso de la acidez titulable, no se observó diferencia significativa, por lo tanto, se formó un único grupo (A) que incluyó a ambos métodos, con un valor de media de 0,40% y 0,41% respectivamente. En ambos métodos se reguló a un pH bajo, por lo tanto, es considerable que el nivel de acidez sea ácido (FiB, 2015; Martínez Nobrega, 1997).



Respecto al pH, no se observó diferencia significativa, formando un grupo A (ajuste de agua al punto isoeléctrico y solución hidroalcohólica) con un valor de medias de 4,58% y 4,57% respectivamente. De acuerdo al estudio de Martínez Nobrega, 1997, indica que el valor de pH es un indicador de la acidez, lo cual es entendible ya que se tiene un porcentaje de acidez alto en comparación a las leguminosas naturales como lo indica Guamán J. et al., 2008 y INIAP, 1994.

**Resultados de la comparación de dos bacterias en la elaboración de concentrado proteico de leguminosas con la adición de bacterias ácido lácticas (factor C).**

**Tabla 31**

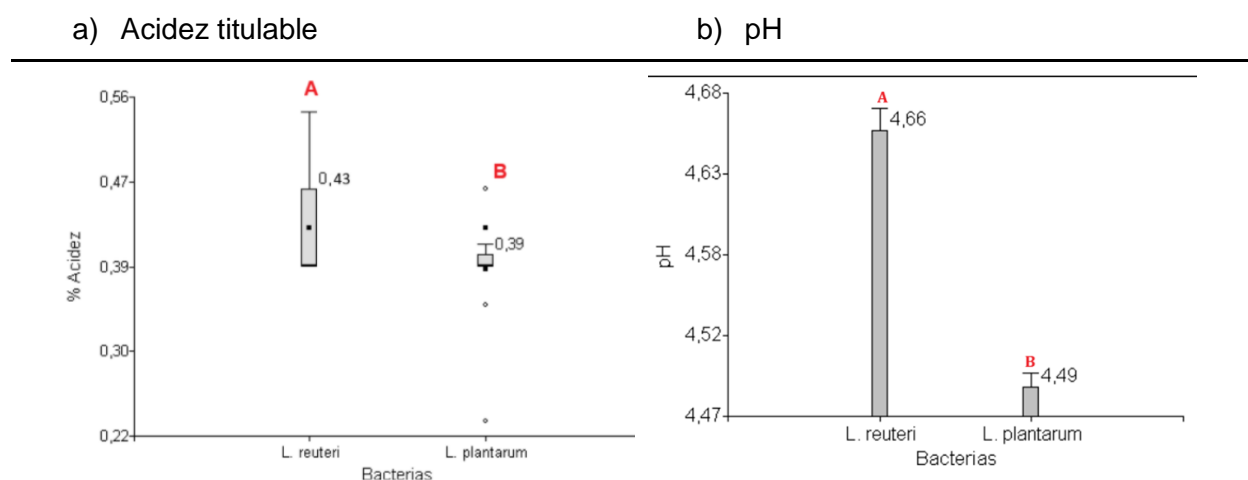
*Resultados de la evaluación de las propiedades bromatológicas de las dos leguminosas para la extracción de proteínas implementando bacterias ácido lácticas.*

<b>Factor C: Bacterias ácido lácticas</b>		
	<i>L. reuteri</i>	<i>L. plantarum</i>
Proteína (%)	77,94 <sup>A</sup>	77,94 <sup>A</sup>
Humedad (%)	6,29 <sup>A</sup>	6,27 <sup>A</sup>
Cenizas (%)	3,38 <sup>A</sup>	3,38 <sup>A</sup>
Acidez titulable (%)	0,43 <sup>A</sup>	0,39 <sup>B</sup>
pH	4,66 <sup>A</sup>	4,49 <sup>B</sup>

*Nota.* Nivel de significancia:  $p < 0.05$ .

## Figura 5

Comparación de las variables acidez titulable y pH de dos bacterias en la elaboración de concentrado proteico de leguminosas con la adición de bacterias ácido lácticas (factor C).



Al examinar el tipo de bacterias ácido lácticas utilizadas, (ver tabla 31) podemos establecer que:

En porcentaje de proteína, no se observó diferencia significativa, y se obtuvo un único grupo A con valores medios entre la bacteria *L. reuteri* (77,94%) y la bacteria *L. plantarum* (77,94%). Las bacterias ácido lácticas no difieren en el contenido de proteína (Ramos-Izquierdo et al., 2009)

En cuanto al contenido de humedad, no se observó diferencia significativa, formando un solo grupo A con valores medios de 6,29 % en la bacteria *L. reuteri* (77,94%) y 6,27 % en la bacteria *L. plantarum* (77,94%). Los resultados están relacionados en que no exista diferencia de humedad con el estudio de Ramos-Izquierdo et al., 2009.

En cuanto al contenido de cenizas, no se observó diferencia significativa, y se obtuvieron valores medios de 3,38 % para ambas bacterias *L. reuteri* y *L. plantarum*. Los resultados están relacionados en que no exista diferencia en cenizas con el estudio de Ramos-Izquierdo et al., 2009.

En el contenido de acidez titulable, no se observó diferencia significativa, y se obtuvieron valores medios en la bacteria *L. reuteri* y la bacteria *L. reuteri* de 0,43% y 0,39% respectivamente. Según Castro Crespo, 2020, las condiciones ácidas son importantes para la viabilidad y actividad de las bacterias probióticas, ya que ayudan a inhibir el crecimiento de bacterias no deseadas y a mantener la estabilidad del producto.

En cuanto al contenido de pH, se establecieron dos grupos independientes donde el grupo A (*L. reuteri*) mostró un mayor contenido de pH en comparación con el grupo B (*L. plantarum*), con medias de 4,66 y 4,49 respectivamente. Las bacterias ácido lácticas, como *L. reuteri*, son capaces de fermentar azúcares y producir ácido láctico, lo que generalmente disminuye el pH de los alimentos. Sin embargo, dado que *L. reuteri* es una bacteria hetero fermentativa, también puede producir otros productos, además de ácido láctico, como ácido acético y dióxido de carbono, que pueden influir en el pH final del producto. Según Castro Crespo, 2020, indica que la capacidad de *L. reuteri* para crecer en un rango de pH más amplio (entre 5 y 7,5) podría contribuir a un aumento del pH en comparación con la bacteria *L. plantarum* más limitada en este aspecto. Estos resultados indican que ambos productos finales tienen un pH ácido, lo cual es típico de los productos fermentados con bacterias ácido lácticas, como *L. reuteri* y *L. plantarum*.

**Resultados de la relación entre dos tipos de leguminosas y métodos de extracción  
(Interacción AxB).**

**Tabla 32**

*Resultados de la evaluación de las propiedades bromatológicas de las dos leguminosas para la extracción de proteínas implementando bacterias ácido lácticas.*

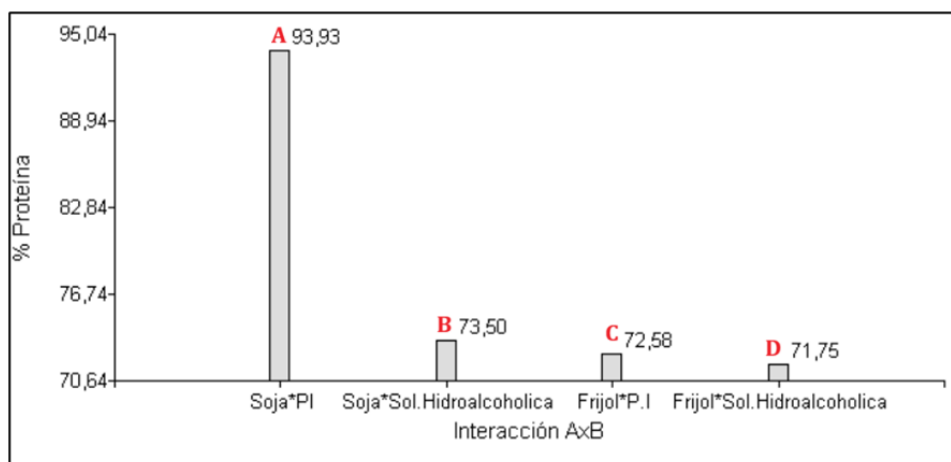
	<b>Interacción de Factor A * Factor B</b>			
	Soja		Frijol Canario	
	Agua Ajustada al Punto Isoeléctrico	Sol. Hidroalcohólica	Agua Ajustada al Punto Isoeléctrico	Sol. Hidroalcohólica
Proteína (%)	93,93 <sup>A</sup>	73,50 <sup>B</sup>	72,28 <sup>C</sup>	71,75 <sup>D</sup>
Humedad (%)	6,31 <sup>A</sup>	6,25 <sup>A</sup>	6,31 <sup>A</sup>	6,26 <sup>A</sup>
Cenizas (%)	4,00 <sup>A</sup>	2,76 <sup>B</sup>	4,00 <sup>A</sup>	2,76 <sup>B</sup>
Acidez titulable (%)	0,43 <sup>A</sup>	0,40 <sup>A</sup>	0,41 <sup>A</sup>	0,39 <sup>A</sup>
pH	4,58 <sup>A</sup>	4,58 <sup>A</sup>	4,58 <sup>A</sup>	4,56 <sup>A</sup>

*Nota.* Nivel de significancia:  $p < 0.05$ .

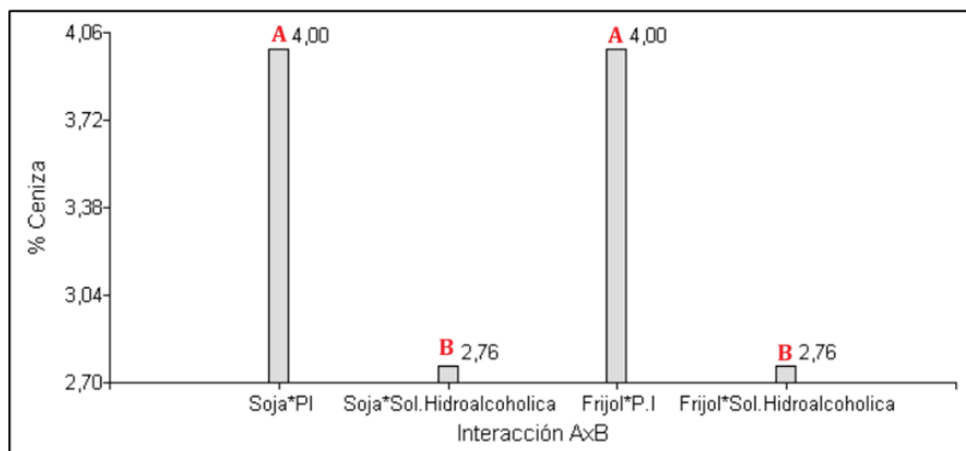
**Figura 6.**

Comparación de las variables proteína y cenizas de la relación entre dos tipos de leguminosas y métodos de extracción (Interacción AxB).

a) Proteína



b) Cenizas



Al examinar la interacción entre dos leguminosas y dos métodos de extracción, (ver tabla 32) podemos establecer que:

En porcentaje de proteína, se establecieron cuatro grupos independientes donde el grupo A (Soja\*Agua Ajustada al Punto Isoeléctrico), grupo B (Soja\*solución hidroalcohólica), grupo C (Frijol Canario\*Agua Ajustada al Punto Isoeléctrico) y grupo C (Frijol Canario\*solución hidroalcohólica) con medias de 93,93 %, 73,50%, 72,28% y 71,75% respectivamente.

El contenido de humedad entre los diferentes tipos de leguminosas y métodos de obtención de proteína. No se observó diferencia significativa, formando un solo grupo A (Soja\*Agua Ajustada al Punto Isoeléctrico (6,31%), Soja\*solución hidroalcohólica (6,25%), Frijol Canario\*Agua Ajustada al Punto Isoeléctrico (6,31%) y Frijol Canario\*solución hidroalcohólica (6,26%). La diferencia que no existe en ambos métodos es por la implementación del proceso de liofilización como lo indica (Caballero et al., 2017) existe pérdida en el peso con una reducción del agua presente en la muestra de un 98-99%.

El contenido de cenizas, entre los diferentes tipos de leguminosas y métodos Ku de obtención de proteína, se observó diferencia significativa, formando dos grupos independientes grupo A (Agua Ajustada al Punto Isoeléctrico con soja y frijol canario) con medias de superiores (4,00%) frente al grupo B (Solución hidroalcohólica con soja y frijol canario) (2,76%).

Por otro lado, el contenido de cenizas se ve influido por el método de obtención, siendo la extracción por solución hidroalcohólica (2,76 %) más efectiva en general. No se observan diferencias significativas en cuanto a la acidez titulable y el pH para la interacción entre los tipos de leguminosas y los métodos de extracción, lo que sugiere que estos factores no influyen en la acidez ni el pH de los concentrados proteicos.

Por lo tanto, la soja tiende a tener un mayor contenido de proteínas y cenizas en comparación con el frijol canario, y el método de obtención de proteínas puede influir en estos contenidos. Mientras que las variables de humedad, pH y acidez titulable no se ven influidas en la interacción.

Perales et al., 2013, indica que la soja es considerada la leguminosa con mayor porcentaje de proteínas en comparación con el frijol canario sin tratamientos previos. Al realizar el concentrado proteico, se apreció que el método de agua ajustada al punto isoeléctrico fue el más adecuado tanto para soja como el frijol canario. Ledesma Munive, 2009 obtuvo un porcentaje de 82,96% de proteína siendo inferior al obtenido en este estudio (93,93%), por el contrario, se reportó un contenido proteico ligeramente menor en el frijol canario (72,28%) comparado con el reportado por Sosa-Espinosa et al., 2009 (73,03%). En ambos estudios no existe diferencia en las condiciones del proceso con respecto a la relación harina: agua, pH y tiempo de agitación con este estudio.

**Resultados de la relación entre dos leguminosas y dos tipos de bacterias (Interacción AxC).**

**Tabla 33**

*Resultados de la evaluación de las propiedades bromatológicas de las dos leguminosas para la extracción de proteínas implementando bacterias ácido lácticas.*

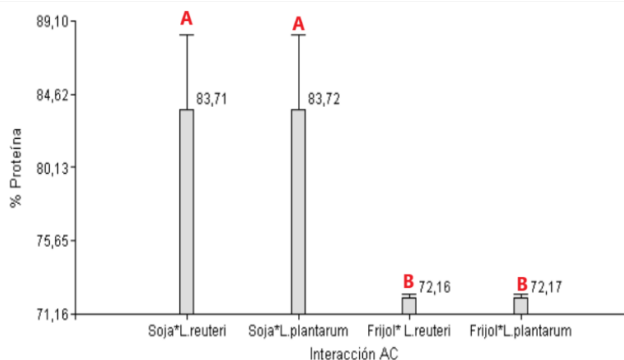
Parámetro	Interacción de Factor A * Factor C			
	Soja		Frijol	
	<i>L. reuteri</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. plantarum</i>
Proteína (%)	83,71 <sup>A</sup>	83,72 <sup>A</sup>	72,16 <sup>B</sup>	72,17 <sup>B</sup>
Humedad (%)	6,28 <sup>A</sup>	6,28 <sup>A</sup>	6,28 <sup>A</sup>	6,27 <sup>A</sup>
Cenizas (%)	3,38 <sup>A</sup>	3,38 <sup>A</sup>	3,38 <sup>A</sup>	3,38 <sup>A</sup>
Acidez titulable (%)	0,45 <sup>A</sup>	0,38 <sup>A</sup>	0,41 <sup>A</sup>	0,39 <sup>A</sup>
pH	4,67 <sup>A</sup>	4,49 <sup>B</sup>	4,65 <sup>A</sup>	4,49 <sup>B</sup>

*Nota.* Nivel de significancia:  $p < 0.05$ .

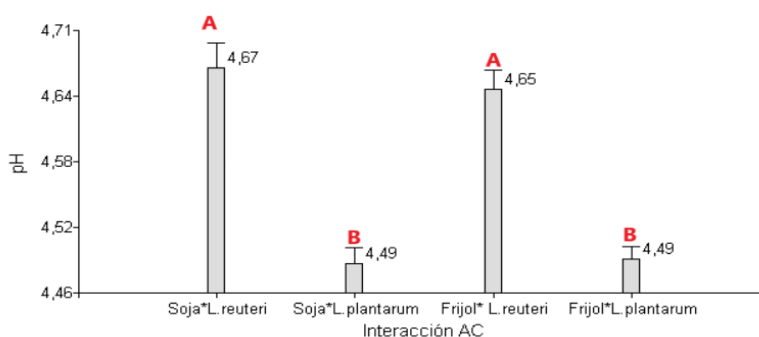
## Figura 7.

Comparación de las variables proteína y pH de la relación entre dos leguminosas y dos tipos de bacterias (Interacción AxC).

### a) Proteína



### b) pH



Los resultados de la **tabla 33** del análisis de la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) en los tipos de leguminosas para la obtención de concentrado proteico enriquecido con bacterias ácido lácticas para fines probióticos. Respecto a la proteína (%) existe diferencia significativa entre las leguminosas, pero entre la implementación de las bacterias *L. reuteri* y *L. plantarum* en la soja (83,71 % y 83,72% respectivamente) no existe diferencia significativa frente al frijol canario (72,16% y 72,17% respectivamente). En el pH existe diferencia significativa entre la bacteria *L. reuteri* con la soja (4,67) y el frijol canario (4,65) frente a la bacteria *L. plantarum* con la soja (4,65) y el frijol canario (4,49). Respecto a la humedad (%), cenizas (%), acidez titulable (%) no presentan diferencia significativa entre las leguminosas y los tipos de bacterias.



Lugo-Zarate et al., 2021, indica que la implementación de las bacterias ácido lácticas en los tipos de leguminos es considerado un producto fermentado, por lo tanto, la diferencia de pH y acidez varía por la presencia de las bacterias ácido lácticas en el alimento dando una funcionalidad importante y de acuerdo al mecanismo que cada bacteria tiene para desarrollarse. Zarate & Saez, 2020, indicó que a fermentación con BAL produjo cambios significativos con respecto a las harinas sin fermentar y fermentadas espontáneamente, como el incremento de la microbiota láctico, polifenoles, actividad antioxidante y disminución de ciertos compuestos anti nutricionales.

**Resultados de la relación entre dos métodos de extracción y dos tipos de bacterias (Interacción BxC).**

**Tabla 34**

*Resultados de la evaluación de las propiedades bromatológicas de las dos leguminosas para la extracción de proteínas implementando bacterias ácido lácticas.*

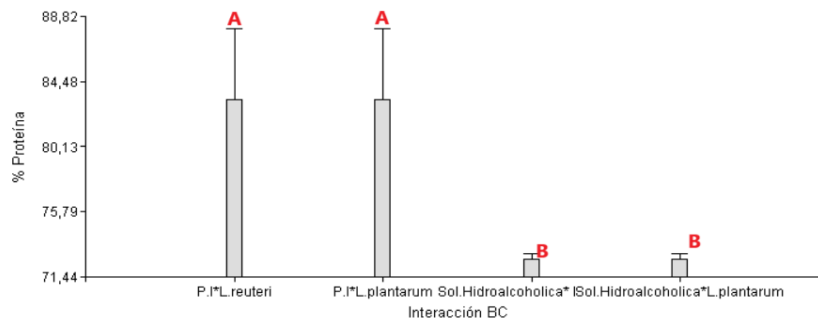
Parámetro	Interacción de Factor B * Factor C			
	Agua Ajustada al Punto Isoeléctrico		Solución Hidroalcohólica	
	<i>L. reuteri</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. plantarum</i>
Proteína (%)	83,25 <sup>A</sup>	83,26 <sup>A</sup>	72,63 <sup>B</sup>	72,63 <sup>B</sup>
Humedad (%)	6,32 <sup>A</sup>	6,30 <sup>A</sup>	6,27 <sup>A</sup>	6,24 <sup>A</sup>
Cenizas (%)	3,38 <sup>A</sup>	3,38 <sup>A</sup>	3,38 <sup>A</sup>	3,38 <sup>A</sup>
Acidez titulable (%)	0,47 <sup>A</sup>	0,37 <sup>B</sup>	0,39 <sup>AB</sup>	0,40 <sup>AB</sup>
pH	4,67 <sup>A</sup>	4,49 <sup>B</sup>	4,65 <sup>A</sup>	4,49 <sup>B</sup>

*Nota.* Nivel de significancia: p < 0.05.

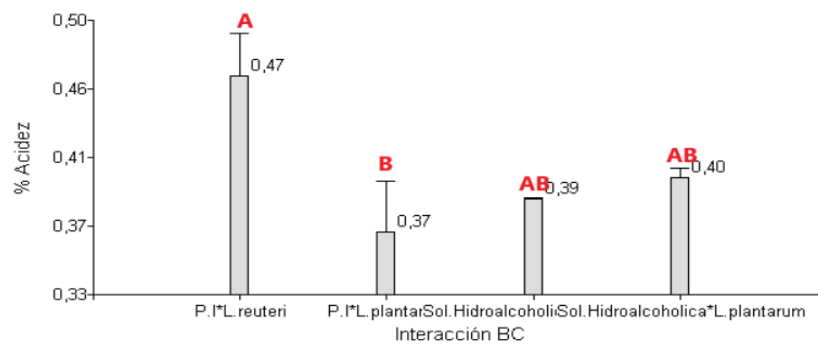
**Figura 8.**

Comparación de las variables proteína y acidez titulable de la relación entre dos métodos de extracción y dos tipos de bacterias (Interacción BxC).

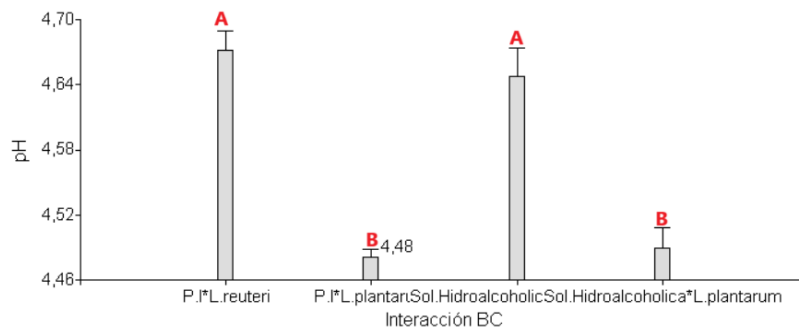
a) Proteína



b) Acidez titulable



c) pH



Los resultados de la **tabla 34** del análisis de la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ), indica que existe diferencia significativa entre la bacteria *L. reuteri* con el método agua ajustada al punto isoelectrico (83,25%) y solución hidroalcohólica (72,63%), de igual forma existe diferencia significativa entre la bacteria *L. plantarum* con el método agua ajustada al punto isoelectrico (83,26%) y solución hidroalcohólica (72,63%). Respecto a humedad (%) y cenizas (%) no existe diferencia significativa en la interacción entre los métodos y las bacterias ácido lácticas. En la acidez titulable (%) en el método de agua ajustada al punto isoelectrico existe diferencia entre la bacteria *L. reuteri* (0,47 %) frente *L. plantarum* (0,37 %) y en el método solución hidroalcohólica no existe diferencia significativa. Existe una relación entre los métodos de obtención de proteínas. En relación al pH existe diferencia significativa entre los métodos (agua ajustada al punto isoelectrico y solución hidroalcohólica) con la bacteria *L. reuteri* (4,67 y 4,65) frente a los métodos con la *L. plantarum* (4,49 para ambos métodos).

En cuanto al contenido de proteína, se observa una diferencia significativa entre los dos métodos para ambas bacterias. Estos resultados son consistentes con estudios previos que han demostrado que el método de obtención de proteínas puede influir en el contenido de proteínas de los alimentos (Tello Fonseca, 2018). La diferencia en el contenido de proteínas puede deberse a las diferentes condiciones de extracción y procesamiento que afectan la solubilidad y la estabilidad de las proteínas. En cuanto a la humedad y cenizas, no se encontraron diferencias significativas entre los métodos y las bacterias ácido lácticas. Esto sugiere que estos parámetros no son afectados significativamente por el método de obtención de proteínas ni por el tipo de bacteria utilizada. En relación a la acidez titulable, se observó una diferencia significativa entre las bacterias *L. reuteri* y *L. plantarum* en el método de agua ajustada al punto isoelectrico, lo cual podría estar relacionado con las propiedades metabólicas de las bacterias ácido lácticas y su capacidad para producir ácidos orgánicos (Bravo et al., 2018). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el método de solución hidroalcohólica, lo que sugiere que este

método puede afectar menos la acidez del producto final. En cuanto al pH, se encontraron diferencias significativas entre los métodos de obtención de proteínas para ambas bacterias. Esto podría deberse a las diferentes condiciones de pH utilizadas en los métodos de extracción, lo que afecta la solubilidad de las proteínas y, por lo tanto, el pH del producto final (Kusumah et al., 2020).

Por lo tanto, los resultados sugieren que tanto el tipo de bacteria ácido láctica como el método de obtención de proteínas pueden influir en las características fisicoquímicas del producto final. Estos hallazgos son consistentes con la literatura previa y resaltan la importancia de seleccionar cuidadosamente tanto la bacteria como el método de obtención de proteínas en la producción de alimentos probióticos de alta calidad.

***Resultados de la relación entre tipos de leguminosas, métodos de extracción y dos tipos de bacterias (Interacción AxBxC).***

**Tabla 35**

*Resultados de la evaluación de las propiedades bromatológicas de las dos leguminosas para la extracción de proteínas implementando bacterias ácido lácticas.*

	<b>Interacción AxBxC</b>	<b>Proteína (%)</b>	<b>Humedad (%)</b>	<b>Cenizas (%)</b>	<b>Acidez titulable (%)</b>	<b>pH</b>
a0b0c0	S*PI*R	93,92 <sup>A</sup>	6,43 <sup>A</sup>	4,00 <sup>A</sup>	0,50 <sup>A</sup>	4,67 <sup>A</sup>
a0b0c1	S*PI*P	93,93 <sup>A</sup>	6,19 <sup>A</sup>	4,00 <sup>A</sup>	0,35 <sup>B</sup>	4,48 <sup>C</sup>
a0b1c0	S*SH*R	73,50 <sup>B</sup>	6,13 <sup>A</sup>	2,76 <sup>B</sup>	0,39 <sup>AB</sup>	4,67 <sup>A</sup>

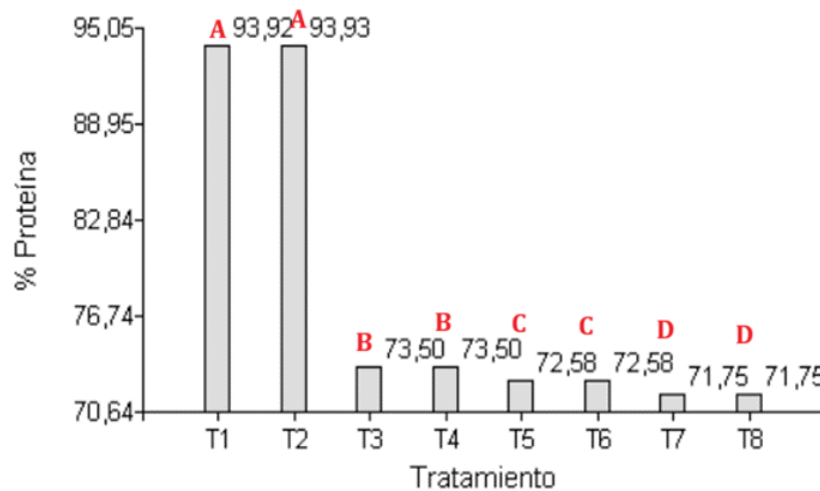
a0b1c1	S*SH*P	73,50 <sup>B</sup>	6,12 <sup>A</sup>	2,76 <sup>B</sup>	0,40 <sup>AB</sup>	4,49 <sup>BC</sup>
a1b0c0	F*PI*R	72,58 <sup>C</sup>	6,21 <sup>A</sup>	4,00 <sup>A</sup>	0,43 <sup>AB</sup>	4,67 <sup>A</sup>
a1b0c1	F*PI*P	72,58 <sup>C</sup>	6,41 <sup>A</sup>	4,00 <sup>A</sup>	0,39 <sup>AB</sup>	4,49 <sup>BC</sup>
a1b1c0	F*SH*R	71,75 <sup>D</sup>	6,40 <sup>A</sup>	2,76 <sup>B</sup>	0,39 <sup>AB</sup>	4,67 <sup>AB</sup>
a1b1c1	F*SH*P	71,75 <sup>D</sup>	6,37 <sup>A</sup>	2,76 <sup>B</sup>	0,40 <sup>AB</sup>	4,49 <sup>BC</sup>

Nota. Nivel de significancia:  $p < 0.05$ .

### Figura 9.

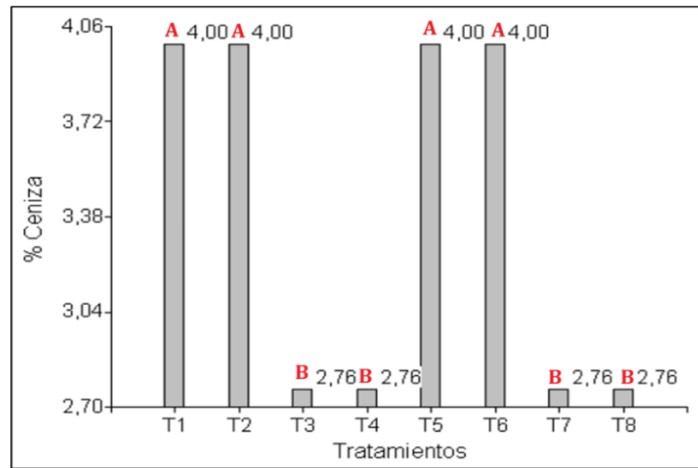
Comparación de las variables proteína, ceniza, acidez y pH de la relación entre tipos de leguminosa, métodos de extracción y dos tipos de bacterias (Interacción AxBxC).

#### a) Proteína



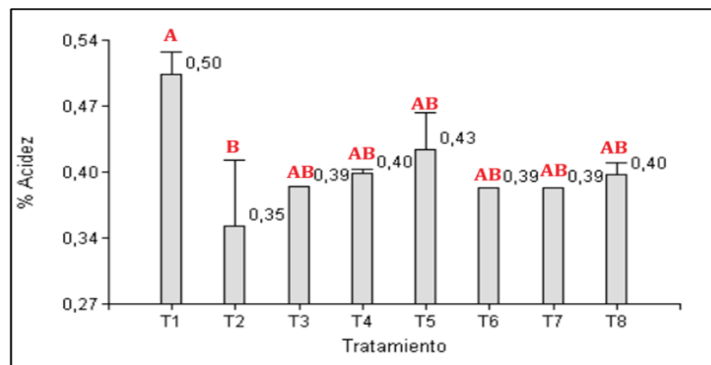
b) Ceniza

---



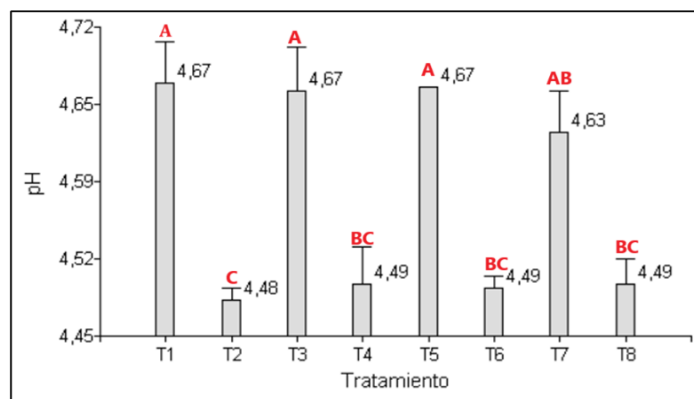
c) Acidez titulable

---



d) pH

---



La **tabla 35** presenta los grupos homogéneos de todas las interacciones con cada variable estudiada,

En la variable proteína (%) encontramos cuatro grupos simples siendo el grupo A con los tratamientos, Soja\*Punto Isoeléctrico\*L. reuteri (93.92%) y Soja\*Punto Isoeléctrico\*L. plantarum (93,93 %), el que mejor resultado presentó. Thenawidjaja et al (2017) señala que, las sustancias alcalinas como el hidróxido de sodio provocan la disolución de proteínas al aumentar la solubilidad de los solutos principales presentes en el solvente, lo que permite separar la proteína de los materiales no proteicos. Por otro lado, los ácidos fuertes, como el ácido clorhídrico, se disocian completamente en agua, lo que facilita la precipitación de proteínas al alcanzar rápidamente un equilibrio de cargas positivas y negativas.

Un estudio (Shanthakumar et al., 2022) informó que el mayor rendimiento de proteína se obtuvo con un pH de 9.96 y una proporción de agua y harina de 15 (p/v). Sin embargo, la extracción de proteína a un pH superior a 10 puede causar una grave hinchazón del almidón, contaminando así el aislado/concentrado de proteína de leguminosas.

En cambio, con el concentrado proteico de las leguminosas con la solución hidroalcohólica Vioque et al. (2001) indica que, mediante la extracción hidroalcohólica, al emplear dos disolventes de polaridades dispares (alcohol-agua) permite una extracción adecuada de compuestos tales como lípidos polares y productos de oxidación, fenoles, isoflavonas, esteroides, azúcares, por consiguiente, genera un mejor enriquecimiento proteico mejorando su calidad y disminuyendo el porcentaje de cenizas.

En las variables humedad (%) se formó un solo grupo A, sus medias varían en el rango de 6,12% a 6,43% lo que indica que el contenido de humedad no presentó diferencia significativa sin importar el tipo de leguminosa, el método de obtención de proteína o bacteria utilizada.

En cenizas (%) encontramos dos grupos significativos. El grupo que menor contenido de cenizas presentó fue el grupo B (2,76%) con el método de solución hidroalcohólica aplicado para ambos tipos de leguminosas y ambos tipos de bacterias.

En la variable acidez titulable (%) encontramos dos grupos simples y un grupo multifactorial de la siguiente forma, grupo A (soja\*agua ajusta al punto isoeléctrico\**L. reuteri*) y grupo B (Soja\*agua ajusta al punto isoeléctrico\**L. plantarum*) y grupo AB (a0b1c0, a0b1c1, a1b0c0, a1b0c1, a1b1c0), El grupo que mejor resultado se considera es el grupo B que es de 0,35% por un bajo nivel de acidez.

En la variable pH encontramos dos grupos simples y un grupo multifactorial de la siguiente forma, grupo A (a0b0c0, a0b1c0 y a1b0c0) con media de 4,67, grupo C (a0b0c1) con media de 4,48, grupo AB (a1b1c0) con media de 4,67 y el grupo BC (a0b1c1, a1b0c1 y a1b1c1) con media de 4,49. Considerando el tratamiento más adecuado es el grupo C: Soja\*Punto Isoeléctrico\**L. plantarum*.

De acuerdo a los resultados obtenidos se considera que el mejor tratamiento es Soja\*Punto Isoeléctrico\**L. plantarum*. De acuerdo a los análisis de factor A la soja es considerada la leguminosa con más porcentaje de proteína en base a estudio de Martín Salinas, 2017, la soja cumplió con los requisitos de calidad indicadas en NTE INEN 452:2012. El producto obtenido está dentro de las normas establecidas por el CODEX STAN 175-1989, indicando que el porcentaje de proteína (93,93 %) se considera un aislado proteínico (AP) el cual supera el 90 %, en el contenido de humedad (6,19 %) no excede del 10 % (m/m), en cenizas (4,00 %) que se obtiene mediante incineración no excede del 8 % referido al peso en seco y en relación a pH (4,48) y acidez titulable (0,35) son aceptados de acuerdo al estudio de Díaz, 2001 a las condiciones de un alimento probiótico. Los resultados obtenidos permiten considerar a este procesamiento biológico como una estrategia interesante y promisoría para el mejoramiento de



harinas de legumbres aplicables al desarrollo de nuevos alimentos de alta calidad nutricional y funcional.

En ambos métodos (ajuste de agua del punto isoeléctrico y solución hidroalcohólica) al final se realizó una regulación de pH 4,5 con ambos tipos de leguminosas, con el objetivo que las bacterias estén un pH ácido para su estabilidad.

La acidez también es alta en ambos casos, lo que sugiere una fermentación efectiva y la producción de ácidos orgánicos por parte de las bacterias probióticas. Estas condiciones ácidas son importantes para la viabilidad y actividad de las bacterias probióticas, ya que ayudan a inhibir el crecimiento de bacterias no deseadas y a mantener la estabilidad del producto. Por lo tanto, los resultados sugieren que ambos productos probióticos están bien fermentados y podrían ser beneficiosos para la salud intestinal (Castro Crespo, 2020).

### ***Análisis de componentes principales***

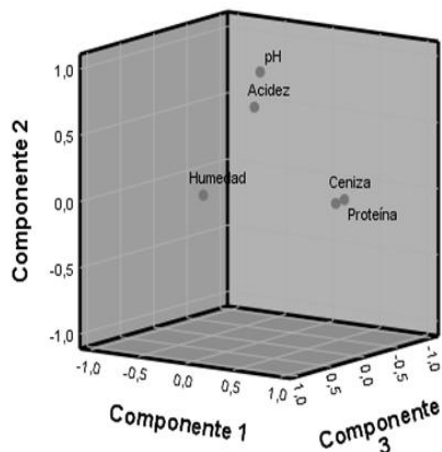
En la **figura 10**. Según el análisis del gráfico de componentes principales rotado, se observan varias asociaciones y no asociaciones entre las variables analizadas. Las variables Proteína y Ceniza están altamente correlacionadas, ya que se sitúan muy próximas en el componente 1 con valores positivos, lo que sugiere una fuerte asociación entre ellas. En contraste, la variable Acidez se destaca sola en el componente 2, indicando una baja asociación con las demás variables. Asimismo, el pH aparece aislado en el componente 3 con un valor alto, señalando una escasa relación con las otras variables.

Por otro lado, las variables no muestran asociación entre sí. La variable Humedad, aunque se encuentra cerca del componente 1, su valor cercano a cero indica una débil asociación con las variables Proteína y Ceniza en este componente. Además, tanto Acidez como pH están en componentes diferentes con valores altos, lo que confirma la falta de asociación entre ellas. En resumen, Proteína y Ceniza exhiben una asociación fuerte, mientras que Acidez y pH están

desvinculadas entre sí y con las demás variables. Humedad no presenta una asociación clara con ninguna de las otras variables en este análisis de componentes principales.

**Figura 10.**

Componentes principales en espacio rotado de variables estudiadas.



**Análisis Microbiológico**

**Tabla 36**

*Resultados del análisis microbiológico para el mejor tratamiento*

Prueba microbiológica	UFC/mL
	Soja* Ajuste del Agua al Punto Isoeléctrico* <i>L. plantarum</i>
Petrifilm™ para Recuento de Enterobacterias (EB)	Ausencia
Petrifilm™ para Recuento Rápido de Aerobios (RAC)	1x10 <sup>6</sup>
Petrifilm™ para Recuento de Coliformes (CC)	Ausencia

*Nota.* UFC/mL: Unidades formadoras de colonias por mililitro.

La **Tabla 36** establece que el concentrado proteico con la bacteria ácido láctica *L. plantarum* definido después del análisis fisicoquímico, indicó que no existe crecimiento de enterobacterias y coliformes. En cambio, en aerobios se visualizó crecimiento de aerobios ( $1 \times 10^6$  UFC/mL) esto es congruente con los resultados de Parra Huerta, 2010, indica que la concentración sugerida de bacterias ácido lácticas está en el rango  $10^6$ -  $10^7$  ufc/g de producto. En otro estudio (Perez et al., 2020) indica que para considerar la dosis requerida para generar un impacto positivo en la salud del huésped, es importante establecer la dosis terapéutica cepa-específica. Esta dosis es muy variable, dependiendo de la cepa y de las indicaciones, pero oscilan entre  $1 \times 10^6$  –  $10^{11}$  UFC/dosis (suele ser entre 1 millón y 10000 millones de UFC/dosis), y deben llegar viables  $\geq 1 \times 10^6$  UFC/dosis al intestino delgado y de  $\geq 1 \times 10^8$  UFC/dosis al colon. Estos alimentos con actividad probiótica pueden ser seleccionados para utilizarse tanto en la prevención, como en el tratamiento de diferentes procesos patológicos, y es por ello que se considera necesario establecer una dosis diaria recomendada de microorganismos.

## Conclusiones

### Factor A: Leguminosas

Respecto a la hipótesis nula ( $H_0$ ), que afirmaba que los dos tipos de leguminosas (soja y frijol canario) no influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico, los resultados muestran que existen diferencias significativas en el contenido de proteína entre las dos leguminosas, lo que indica que la  $H_0$  debe ser rechazada. La hipótesis alternativa ( $H_1$ ), que sugiere que los dos tipos de leguminosas influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico, se confirma debido a las diferencias significativas encontradas en el contenido de proteína entre la soja y el frijol canario. Por lo tanto, los resultados respaldan la idea de que el tipo de leguminosa utilizada tiene un impacto significativo en las características bromatológicas del concentrado proteico enriquecido con bacterias ácido lácticas para fines probióticos.

### Factor B: Métodos

Los resultados muestran que el método de extracción por agua ajustada al punto isoelectrico presenta diferencias significativas en el contenido de proteína y cenizas en comparación con el método por solución hidroalcohólica. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en humedad, acidez titulable y pH entre ambos métodos. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula ( $H_0$ ) y se acepta la hipótesis alternativa ( $H_1$ ), que indica que los métodos de extracción por agua ajustada al punto isoelectrico y solución hidroalcohólica sí influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

### Factor C: Bacterias ácido lácticas

Los resultados obtenidos indican que hay diferencias significativas en el contenido de acidez y pH entre las dos bacterias ácido lácticas, *L. reuteri* y *L. plantarum*, mientras que no hay diferencias significativas en proteína, humedad y cenizas. Estos hallazgos sugieren que la

bacteria utilizada puede influir en algunas características del concentrado proteico, pero no en todas.

Dado que se encontraron diferencias significativas en algunas variables, se rechaza la hipótesis nula (H<sub>0</sub>) de que las dos bacterias ácido lácticas no influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico. En cambio, se acepta la hipótesis alternativa (H<sub>1</sub>) de que las bacterias ácido lácticas *L. reuteri* y *L. plantarum* influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico. Por lo tanto, la elección de la bacteria ácido láctica utilizada en la producción de concentrado proteico enriquecido con bacterias ácido lácticas para fines probióticos puede tener un impacto en ciertas características del producto final, como la acidez y el pH.

#### **Interacción AB:** Leguminosas\*Métodos

De los resultados obtenidos, se acepta la hipótesis alternativa (H<sub>1</sub>) de que la interacción entre los tipos de leguminosas y los métodos de extracción proteica influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico. Se observó que la soja tuvo un contenido significativamente mayor de proteínas y cenizas en comparación con el frijol canario, independientemente del método de extracción de proteínas. Además, el método de extracción influyó en el contenido de proteínas y cenizas, siendo el agua ajustada al punto isoelectrico más efectiva en general. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la humedad, acidez titulable y pH en la interacción entre los tipos de leguminosas y los métodos de extracción. Estos hallazgos sugieren que la elección del tipo de leguminosa y el método de extracción puede afectar la composición bromatológica del alimento probiótico.

#### **Interacción AC:** Leguminosas\*Bacterias Ácido Lácticas

En base a los resultados presentados, se acepta la hipótesis alternativa (H<sub>1</sub>) que establece que la interacción entre los tipos de leguminosas y la aplicación de bacterias ácido

lácticas influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico. Esto se evidencia en las diferencias significativas encontradas en la proteína (%) y el pH, donde se observan variaciones entre las leguminosas y las bacterias utilizadas. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la humedad (%), cenizas (%), y acidez titulable (%), lo que sugiere que estas variables no se ven afectadas por la interacción entre los tipos de leguminosas y las bacterias ácido lácticas.

#### **Interacción BC: Métodos\*Bacterias Ácido Lácticas**

En este estudio, se encontraron diferencias significativas en la concentración de proteínas entre los métodos de extracción de proteínas (agua ajustada al punto isoeléctrico y solución hidroalcohólica) y las bacterias ácido lácticas utilizadas (*L. reuteri* y *L. plantarum*). Esto sugiere que la interacción entre los métodos de extracción proteica y las bacterias ácido lácticas sí influye en los análisis bromatológicos del alimento probiótico, lo que respalda la hipótesis alternativa (H1). Además, se observaron diferencias significativas en la acidez titulable y el pH, lo que también indica que la interacción entre los métodos de extracción de proteínas y las bacterias ácido lácticas influye en estas características del alimento probiótico. Por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa (H1) y se concluye que la interacción entre los métodos de extracción proteica y la aplicación de bacterias ácido lácticas sí influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico.

#### **Interacción ABC: Leguminosas\*Métodos\*Bacterias Ácido Lácticas**

basada en los resultados obtenidos es que se acepta la hipótesis alternativa (H1), que establece que la interacción entre los tipos de leguminosas, los métodos de extracción y la aplicación de bacterias ácido lácticas influyen en los análisis bromatológicos del alimento probiótico. Esto se deduce de los grupos homogéneos encontrados en las variables estudiadas,

donde se observaron diferencias significativas en el contenido de proteína, humedad, cenizas, acidez titulable y pH en función de los diferentes tratamientos aplicados. En particular, el tratamiento con Soja con Punto Isoeléctrico y *L. plantarum* se destacó como el más adecuado en base a los resultados analizados.

### **Recomendaciones**

Utilizar leguminosas de alta calidad y libres de contaminantes para garantizar la calidad y seguridad del producto final.

Utilizar métodos de extracción eficientes para obtener concentrados proteicos de alta pureza y rendimiento. El punto isoeléctrico de las proteínas y la extracción no proteica con etanol son aspectos clave a considerar en este proceso.

Realizar pruebas para evaluar las propiedades funcionales de los concentrados proteicos, como la capacidad de emulsificación, capacidad de retención de agua y capacidad espumante, para garantizar su adecuado desempeño en aplicaciones alimentarias.

Realizar pruebas en campo sobre la viabilidad del producto en una población de personas o en animales.

## Bibliografías

- Abuqwider, J., Altamimi, M., & Mauriello, G. (2022). *Limosilactobacillus reuteri* in Health and Disease. *Microorganisms*, 10(3), 522. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/microorganisms10030522>
- Blanco, A., & Bressani, R. (1991). Bioavailability of amino acids in beans (*Phaseolus vulgaris*). *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 48(1), 38-52.
- Boukid, F., Rosell, C. M., & Castellari, M. (2021). Pea protein ingredients: A mainstream ingredient to (re) formulate innovative foods and beverages. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 729-742.
- Bravo, J., Morales, A., Lefimil, C., Galaz, C., & Gamonal, J. (2018). Efectos clínicos de *Lactobacillus reuteri* en el tratamiento de la gingivitis: Ensayo clínico aleatorizado controlado. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 11(1), 32–35. <https://doi.org/10.4067/s0719-01072018000100032>
- Bravo, J., Morales, A., Lefimil, C., Galaz, C., & Gamonal, J. (2018). Efectos clínicos de *Lactobacillus reuteri* en el tratamiento de la gingivitis: Ensayo clínico aleatorizado controlado. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 11(1), 32–35. <https://doi.org/10.4067/s0719-01072018000100032>
- Bustos Gutierrez, P. D. (2013). Estudio del cultivo y concentración de una cepa autóctona empleando un reactor y membranas semipermeables. Secado y estabilización de biomasa. Udec.cl. [http://repositorio.udec.cl/bitstream/11594/1526/1/Tesis\\_Estudio\\_del\\_Cultivo\\_y\\_Concentracion\\_de\\_una\\_Cepa.Image.Marked.pdf](http://repositorio.udec.cl/bitstream/11594/1526/1/Tesis_Estudio_del_Cultivo_y_Concentracion_de_una_Cepa.Image.Marked.pdf)



- Caballero, B. L., Márquez, C. J., & Betancur, M. I. (2017). Efecto de la liofilización sobre las características físico-químicas del ají rocoto (*Capsicum pubescens* R & P) con o sin semilla. *Bioagro-*, 29(3), 225–234. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-33612017000300008](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612017000300008)
- Caballero, B. L., Márquez, C. J., & Betancur, M. I. (2017). Efecto de la liofilización sobre las características físico-químicas del ají rocoto (*Capsicum pubescens* R & P) con o sin semilla. *Bioagro-*, 29(3), 225–234. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-33612017000300008](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612017000300008)
- Çakiroğlu, F., & Uçar, A. (2018). Consumer attitudes towards purchasing functional products. *Progress in Nutrition*, 20(2), 257-262. <https://doi.org/10.23751/pn.v20i2.5859>
- Casado, J. M. (2017). Centenario de Elie Metchnikoff (1845-1916). *Educación Médica*, 18(2), 136-143.
- Castro Crespo, A. (2020). CULTIVO DE LACTOBACILLUS REUTERI EN SOLITARIO Y EN COCULTIVO CON ESCHERICHIA COLI A 37oC. Uva.Es. <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/42163/TFG-M-N2012.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Castro Crespo, A. (2020). CULTIVO DE LACTOBACILLUS REUTERI EN SOLITARIO Y EN COCULTIVO CON ESCHERICHIA COLI A 37oC. Uva.Es. <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/42163/TFG-M-N2012.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Chito Trujillo, D., Ortega Bonilla, R., Ahumada Mamián, A., & Rosero López, B. (2017). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) versus soja (*Glycine max* [L.] Merr.) en la nutrición humana: revisión sobre las características agroecológicas, de composición y tecnológicas. *Revista*

Española de Nutrición Humana y Dietética, 21(2), 184-198.  
<https://dx.doi.org/10.14306/renhyd.21.2.256>

Corona-Hernandez, R. I., Álvarez-Parrilla, E., Lizardi-Mendoza, J., Islas-Rubio, A. R., de la Rosa, L. A., & Wall-Medrano, A. (2013). Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(6), 614–628. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12030>

Del Mar Contreras, M., Lama-Muñoz, A., Gutiérrez-Pérez, J. M., Espínola, F., Moya, M., & Castro, E. (2019). Protein extraction from agri-food residues for integration in biorefinery: Potential techniques and current status. *Bioresource Technology*, 280, 459-477.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.040>

Diaz, R. V. (2001). OBTENCIÓN DE HARINA A PARTIR HOJA DE ERYTHRINA (*Phaseolus* edulis) PARA ALIMENTACIÓN HUMANA. Edu.Pe.  
<https://repositorio.unas.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14292/188/FIA-111.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Diaz, R. V. (2001). OBTENCIÓN DE HARINA A PARTIR HOJA DE ERYTHRINA (*Phaseolus* edulis) PARA ALIMENTACIÓN HUMANA. Edu.Pe.  
<https://repositorio.unas.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14292/188/FIA-111.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Dini, Cecilia; Quiroga, Alejandra; Viña, Sonia; García, María. (2015). Caracterización de un concentrado proteico obtenido a partir de harina de *Pachyrhizus ahipa*: potenciales aplicaciones en la industria alimentaria. IV Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas (CLICAP).

- Do Carmo, C. S., Silventoinen, P., Nordgård, C. T., Poudroux, C., Dessev, T., Zobel, H., ... & Sahlstrøm, S. (2020). Is dehulling of peas and faba beans necessary prior to dry fractionation for the production of protein-and starch-rich fractions? Impact on physical properties, chemical composition and techno-functional properties. *Journal of food engineering*, 278, 109937.
- Du, L., Arauzo, P., Meza, M. F., Cao, Z., Olszewski, M., & Kruse, A. (2020). Towards the Properties of Different Biomass-Derived Proteins via Various Extraction Methods. *Molecules*, 25(3), 488. <https://doi.org/10.3390/molecules25030488>.
- Fenneme, O. R. (2003). *Análisis de los alimentos*. Edit. Acribia, Zaragoza, España.
- FiB. (2015). Los acidos en la industria alimentaria. *Revista-fi.com*. <https://revista-fi.com/artigos/todos/los-acido-en-la-industria-alimentaria#>
- Ganesan, K. r., & Xu, B. (2017, noviembre 4). Polyphenol-Rich Dry Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Health Benefits. *International journal of molecular sciences*, 18, 2331. <https://doi.org/10.3390/ijms18112331>
- Gepts, P., & Debouck, D. (1991). Origin, domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). (C. I. Tropical, Ed.) Cali: A. van Schoonhoven & O. Voysest.
- Godfray, C., Beddington, J., Crute, I., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S., & Toulmin, C. (2010). Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science*, 327(5927), 812-218. <https://doi.org/10.1126/science.1185383>
- Goodman, C., Keating, G., Georgousopoulou, E., Hespe, C., & Levett, K. (2021). Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhoea: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology and hepatology*, 11(8), e043054. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-043054>

- Gorissen, S., Crombag, J., Senden, J., Waterval, H., Bierau, J., Verdijk, L., & van Loon, L. (2018). Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates. *Amino Acids*, 50, 1685–1695. <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2640-5>
- Guamán J., R., Tapia Francia, F., Bolaños Zúñiga, V., Sarmiento Calva, L. (2008). INIAP 310: Variedad de soya de alto rendimiento y calidad de grano. Gob.Ec. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2012>
- Guamán J., R., Tapia Francia, F., Bolaños Zúñiga, V., Sarmiento Calva, L. (2008). INIAP 310: Variedad de soya de alto rendimiento y calidad de grano. Gob.Ec. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2012>
- Guel García, G. P., Hernández Mendoza, J. L., & Rodríguez Castillejos, G. (2018). Uso de bacterias obtenidas a partir de suero de leche y su uso potencial como probióticos en la industria alimentaria. *Revista Boliviana de Química*, 35(1), 40-45. <https://www.redalyc.org/journal/4263/426355610006/html/>
- Hadnađev, M. S., Hadnađev, D. T., Pojić, M. M., Šarić, B. M., Mišan, A. Č., Jovanov, P. T., & Sakač, M. B. (2017). Progress in vegetable proteins isolation techniques: A review. *Food and Feed research*, 44(1), 11-21.
- Hanan, A. M., & Pichardo, J. M. (2009, July 22). *Phaseolus vulgaris* - ficha informativa. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Retrieved February 22, 2024, from <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/phaseolus-vulgaris/fichas/ficha.htm>
- Hosono, A. (1992). Functions of fermented milk. Challenges for the health sciences. In Y. Nakazawa, & A. Hosono, *Fermented milk in the orient*. (pp. 61-78). Elsevier Applied Science.

- Huang, S., Vignolles, M.-L., Chen, X. D., Le Loir, Y., Jan, G., Schuck, P., & Jeantet, R. (2017). Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 63, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.007>
- Ianniello, R., Zheng, J., Zotta, T., Ricciardi, A., & Ganzle, M. (2015). Biochemical analysis of respiratory metabolism in the heterofermentative *Lactobacillus spicheri* and *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Applied Microbiology*, 119(3), 763-775. <https://doi.org/10.1111/jam.12853>
- INIAP. (1994). Estación Experimental Santa Catalina-INIAP 416 Canario. Gob.Ec. <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2568/4/iniapscpl141.pdf>
- INIAP. (1994). Estación Experimental Santa Catalina-INIAP 416 Canario. Gob.Ec. <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2568/4/iniapscpl141.pdf>
- Jiménez, A. L. (2006). Valor nutritivo de la soja. Redalyc.org. <https://www.redalyc.org/pdf/674/67403606.pdf>
- Kim, J. H., Kim, D. H., Jo, S., Cho, M. J., Cho, Y. R., Lee, Y. J., & Byun, S. (2022). Immunomodulatory functional foods and their molecular mechanisms. *Experimental & molecular medicine*, 54(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00724-0>
- Klupšaitė, D., & Juodeikienė, G. (2015). Legume: Composition, protein extraction and functional properties. A review. *Chemical Technology*, 66(1), 5-12.
- Kong, X. J., Liu, K., Zhuang, P., Tian, R., Liu, S., Clairmont, C., Lin, X., Sherman, H., Zhu, J., Wang, Y., Fong, M., Li, A., Wang, B., Wang, J., Yu, Z., Shen, C., Cui, X., Cao, H., Du, T., Wan, G., & ... Cao, X. (2021). Effects of *Limosilactobacillus reuteri* LR-99 Supplementation on Body Mass Index, Social Communication, Fine Motor Function, and Gut Microbiome Composition in Individuals with Prader-Willi Syndrome: a Randomized

- Double-Blinded Placebo-Controlled Trial. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 13(6), 1508-1520. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12602-021-09800-9>
- Kusumah, S. H., Andoyo, R., & Rialita, T. (2020). Protein isolation techniques of beans using different methods: A review. *IOP Conference Series. Earth and Environmental Science*, 443(1), 012053. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/443/1/012053>
- Ledesma Munive, A. P. (2009). Elaboración de un suplemento alimenticio en polvo para consumo humano a partir de una mezcla de hidrolizado de soya y almidón de maíz. *Edu.Ec.* <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/1666/1/CD-2258.pdf>
- Los alimentos liofilizados son mejores que los deshidratados. (2020, November 17). *Integrada.* <https://www.integrana.es/alimentos-liofilizados-mejor-deshidratados/>
- Lugo-Zarate, L., del Socorro Cruz-Cansino, N., Cervantes-Elizarrarás, A., Delgado-Olivares, L., Zafra-Rojas., A.-O. J. A. Q. (2021). Bacterias ácido lácticas de bebidas vegetales fermentadas: Producción de metabolitos y propiedades antimicrobianas. *Salud Educación* ISSN: 2007-4573. <https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/ICSA/issue/archive>
- Luo, Z., Chen, A., Xie, A., Liu, X., Jiang, S., & Yu, R. (2023). *Limosilactobacillus reuteri* in immunomodulation: molecular mechanisms and potential applications. *Frontiers in immunology*, 14, 1228754. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1228754>
- Ma, L., Tu, H., & Chen, T. (2023). Postbiotics in Human Health: A Narrative Review. *Nutrients*, 15(2), 291. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/nu15020291>
- Marioli Nobile, C. (2016). Variabilidad de la calidad nutricional de soja en Argentina por efecto ambiental. Evaluación nutricional y sensorial de tofu como producto derivado. [Tesis de grado, Universidad Nacional de Córdoba].

- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, 9(9), 1021. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Marquez Sigwas, B. M. (2014). EFRIGERACIÓN Y CONGELACIÓN DE ALIMENTOS: TERMINOLOGÍA, DEFINICIONES Y EXPLICACIONES. Edu.pe. <https://repositorio.unsa.edu.pe/server/api/core/bitstreams/e8bd5b97-f205-4b7e-bcd6-b34d7ab4fbe2/content#:~:text=Las%20cenizas%20de%20un%20alimento,de%20calcin ar%20la%20materia%20orgánica>.
- Martín Salinas, C. (2017). Beneficios de la soja en la salud femenina. *Nutrición Hospitalaria: Organo Oficial de La Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral*, 34(4). <https://doi.org/10.20960/nh.1569>
- Martinez Nobrega, M. (1997). Ministerio de la Secretaría de Vigilancia Sanitaria. Gov.br. [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1997/prt0540\\_27\\_10\\_1997.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1997/prt0540_27_10_1997.html)
- Munive Ledesma, P. A. (2009). Elaboración de un suplemento alimentario en polvo para consumo humano a partir de una mezcla de hidrolizado de soja y almidón de maíz. Edu.ec. <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/1666/1/CD-2258.pdf>
- Munive P. (2009). Elaboración de un suplemento alimenticio en polvo para el consumo humano a partir de una mezcla de hidrolizado de soja y almidón de maíz. Escuela politécnica Nacional. <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/1666/1/CD-2258.pdf>
- Navas Ramirez, S. J. (2006). liofilización. *Revista ReCiTeIA* 6(2):1-39. [https://www.researchgate.net/publication/259620189\\_Liofilizacion\\_de\\_alimentos](https://www.researchgate.net/publication/259620189_Liofilizacion_de_alimentos)
- Olmedilla Alonso, B., Farré Rovira, R., Asensio Vegas, C., & Martín Pedrosa, M. (2010). Papel de las leguminosas en la alimentación actual. *Revista española de nutrición humana y dietética*, 14(2), 72–76. <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-nutricion->

humana-dietetica-283-articulo-papel-leguminosas-alimentacion-actual-  
X2173129210523381

Parra Huerta, R. A. (2010). BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS: PAPEL FUNCIONAL EN LOS ALIMENTOS. Scielo. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612010000100012](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612010000100012)

Parra Huerta, R. A. (2010). BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS: PAPEL FUNCIONAL EN LOS ALIMENTOS. Scielo. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612010000100012](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612010000100012)

Peluso, I., Fina, D., Caruso, R., Stolfi, C., Caprioli, F., Fantini, M., Caspani, G., Grossi, E., Di Iorio, L., Paone, F. M., Pallone, F., & Monteleone, G. (2007). *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* B21060 Suppresses Human T-Cell Proliferation. *Infection and Immunity*, 75(4), 1730-1737. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/iai.01172-06>

Perales, L. E., Alonso, P. R., Gaspar, T. V., Moreno, E. R., Ávila Torres, J. M., & Varela Moreiras, G. V. M. (2013). Adaptado al Reglamento relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. Org.Es. <https://www.fen.org.es/storage/app/media/imgPublicaciones/informe-legumbres-nutricion-y-saludvw.pdf>

Ramírez Navas, J. S. (2006). Liofilización de alimentos. Researchgate.net. [https://www.researchgate.net/publication/259620189\\_Liofilizacion\\_de\\_alimentos](https://www.researchgate.net/publication/259620189_Liofilizacion_de_alimentos)

Ramos-Izquierdo, C., Bucio-Galindo, A., Bautista-Muñoz, C., Aranda-Ibáñez, E., Izquierdo-Reyes, & F. (2009). AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PARA LA ELABORACIÓN DE QUESO CREMA TROPICAL. Org.mx. <https://www.scielo.org.mx/pdf/uc/v25n2/v25n2a6.pdf>



- Rao, N. S., Lundberg, L., Palmkron, S., Håkansson, S., Bergenståhl, B., & Carlquist, M. (2021). Flow cytometric analysis reveals culture condition dependent variations in phenotypic heterogeneity of *Limosilactobacillus reuteri*. *Scientific reports*, 11(1), 23567. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-021-02919-3>
- Reyes, J. (2022). Composición nutricional y compuestos con actividad biológica de la soja [Tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato]. Repositorio institucional <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/34940>
- Reyes, Nadir & Mendieta, Bryan. (2000). Determinación del valor nutritivo de los alimentos. Universidad Nacional Agraria.
- Rivas, F. G., & González, B. E. (2006). Criterios de Calidad de los Microorganismos Probióticos y evidencias sobre efectos Hipocolesterolémicos. *Revista Salud pública y nutrición*, 7(1).
- Rosón, Fernando R. (2017). Antinutrientes de la soja [Tesis de grado, Universidad de Valladolid].
- Ruiz, M.J., García, M.D., Padola, N.L., & Etcheverría, A.I. (2022). Capacidad de *Lactiplantibacillus plantarum* de reducir biofilms de bacterias patógenas transmitidas por alimentos. *Revista veterinaria*, 33(1), 48-52. <https://dx.doi.org/10.30972/vet.3315879>
- Sánchez, Ana M., Vayas, T., Mayorga, F. (2020). Soya en Ecuador [en línea]. Observatorio económico y social de Tungurahua. En Universidad Técnica de Ambato.
- Sanders, M. E., Akkermans, L., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J., Hörmannspurger, G., Huys, G., Levy, D., Lutgendorff, F. M., Phothirath, P., Solano-Aguilar, G., & Vaughan, E. (2010). Safety assessment of probiotics for human use. *Gut microbes*, 1(3), 164-185. <https://doi.org/https://doi.org/10.4161/gmic.1.3.12127>

Santos-Espinosa, A., Manzanarez-Quin, C. G., Reyes-Díaz, R., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B., & González-Córdova, A. F. (2018). Ácido  $\gamma$ -Aminobutírico (GABA) producido por bacterias ácido-lácticas en alimentos fermentados. *Interciencia*, 43(3), 175-181. <https://www.redalyc.org/journal/339/33957185004/>

Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN). (1980). Determinación de la acidez titulable (Norma núm. 521).

Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN). (2011). Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2395: Leches fermentadas. Requisitos (p. 4).

Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN). (2011). Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1334-3: Rotulado de productos alimenticios para consumo humano. Parte 3. Requisitos para declaraciones nutricionales y declaraciones saludables (pp. 5-6).

Shanthakumar, P., Klepacka, J., Bains, A., Chawla, P., Dhull, S. B., & Najda, A. (2022). The Current Situation of Pea Protein and Its Application in the Food Industry. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(16), 5354. <https://doi.org/10.3390/molecules27165354>

SIOVM. (n.d.). Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados.

Sosa-Espinosa, T., Ruiz-Fuiz, J., Catellanos-Ruelas, A., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2009). Extracción de proteína de la harina de frijol común endurecido por fraccionamiento húmedo. *Researchgate.net*. [https://www.researchgate.net/publication/275951679\\_Extraccion\\_de\\_proteinas\\_de\\_la\\_harina\\_de\\_frijol\\_comun\\_endurecido\\_por\\_fraccionamiento\\_humedo](https://www.researchgate.net/publication/275951679_Extraccion_de_proteinas_de_la_harina_de_frijol_comun_endurecido_por_fraccionamiento_humedo)

Stone, A. K., Karalash, A., Tyler, R. T., Warkentin, T. D., & Nickerson, M. T. (2015). Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food research international*, 76, 31-38.

- Tan, J. X., Tan, C.-C., Dharmawan, J., & Jan Leong, S. S. (2023). Effects of ethanol washing on off-flavours removal and protein functionalities of pea protein concentrate. *Food and Bioproducts Processing*, 141, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2023.07.004>
- Tang, J., Moore, D., Kujbida, G., Tarnopolsky, M., & Phillips, S. (2009). Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md.: 1985), 107(3), 987–992. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00076.2009>
- Tello Fonseca, A. G. (2018). Estudio de la actividad antioxidante de aislados proteicos de harina de haba pallar (*Phaseolus lunatus* L.) y su digestibilidad gástrica y duodenal (in vitro). *Edu.Ec.* <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/28380/3/BQ%20160.pdf>
- Teratanavat, R., & Hooker, N. (2006). Consumer Valuations and Preference. *Journal of Food Science*, 71(7), 533-541. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00120.x>
- Thenawidjaja, M., Wangsa, T., & Retnoningrum, D. (2017). Protein : serial biokimia mudah dan menggugah. *UNTUK MAHASISWA DAN UMUM*, 228–241. <https://opac.perpusnas.go.id/DetailOpac.aspx?id=1165337>
- Topolska, K., Florkiewicz, A., & Filipiak-Florkiewicz, A. (2021). Functional Food-Consumer Motivations and Expectations. *International journal of environmental research and public health*, 18(10), 5327. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijerph18105327>
- Toro, O., Tohme, J., & Debouck, D. G. (1990). Wild bean (*Phaseolus vulgaris* L.): description and distribution. Cali, Colombia: International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) and Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

- Ulloa, J. A., Ulloa, P. R., Ramírez, J. C., & Ulloa, B. E. (2011, Julio 8). El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente*, 5-6. <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-08/1.pdf>
- Valdiviezo, L. (2019). Análisis de acidez en la harina de trigo [Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Machala].
- Vano, Kelim, Jiménez, Ygmar, Núñez, Maira. (2009). Evaluación de la incertidumbre en la determinación gravimétrica de humedad, cenizas, grasa y fibra cruda. *Revista Ingeniería UC*, 16(2), 27-33.
- Vásquez, C. (2020). Importancia de la soja (*Glycine max*) en la industria alimentaria [Tesis de grado, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo]. Repositorio institucional <https://hdl.handle.net/20.500.12893/10397>
- Vioque, J., Sánchez, R., Pedroche, J., Yust, M. d. M., & Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos. *Grasas y Aceites*, 52(2), 127-131.
- Voysest, O. (2000). Mejoramiento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Legado de variedades de América Latina 1930-1999. CIAT.
- Zafra, A., Zienkiewicz, A., Clemente, A., Al-lach, S., Fernández Márquez, A., Martín Aznarte, I., ... & Alché Ramírez, J. (8-11 de mayo 2013). Aislados proteicos de semillas de olivo: composición química, propiedades funcionales y caracterización proteica. Simposio Expoliva. Fundación del Olivar, España.
- Zarate, G. del V., & Saez, G. D. (2020). Fermentación de harinas de legumbres con bacterias lácticas: alternativa de procesamiento para potenciar sus características nutricionales y tecnofuncionales. Zarate, Gabriela del Valle; Saez, Gabriel Dario; Fermentación de harinas de legumbres con bacterias lácticas: alternativa de procesamiento para potenciar

sus características nutricionales y tecnofuncionales; Universidad de San Pablo-Tucumán.  
Instituto de Desarrollo e Innovación Tecnológica para la Competitividad Territorial;  
IDITEC, 9, 12. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/143352>