



## PROYECTO DE TITULACIÓN

### CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA

**TEMA:** Evaluación mediante análisis fisicoquímico y microbiológico de distintas leguminosas liofilizadas, considerando la incorporación de bacterias ácido lácticas para la obtención de un alimento funcional.

AUTOR: Bosquez Zambrano, Johanna Carolina

TUTOR: PhD. Sánchez Llaguno, Sungey Naynee

Santo Domingo de los Tsáchilas, 1 de marzo 2024



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

## Reporte de verificación de contenido



Plagiarism report

2024 TESIS CAROLINA -BOSQUEZ COP...

### Scan details

Scan time:  
March 12th, 2024 at 0:49 UTC

Total Pages:  
70

Total Words:  
17298

### Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	0.9%	161
Minor Changes	0.1%	19
Paraphrased	1.6%	271
Omitted Words	0%	0

### AI Content Detection



Text coverage

- AI text
- Human text

### Plagiarism Results: (19)



Firmado electrónicamente por:  
SUNGEY NAYNEE  
SANCHEZ LLAGUNO

.....  
Ing. Sánchez Llaguno, Sungey

Naynee, PhD. C.C.: 1205348673

Director del Proyecto de Investigación



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

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Certificación**

Certifico que el trabajo de integración curricular “Evaluación mediante análisis fisicoquímico y microbiológico de distintas leguminosas liofilizadas, considerando la incorporación de bacterias ácido lácticas para la obtención de un alimento funcional” fue realizado por el señor Bosquez Zambrano, Johanna Carolina, 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, 06 de marzo de 2024.



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

## Responsabilidad de autoría

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

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

Yo, Bosquez Zambrano, Johanna Carolina, con cédula de ciudadanía n° 2350226987, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: "Evaluación mediante análisis fisicoquímico y microbiológico de distintas leguminosas liofilizadas, considerando la incorporación de bacterias ácido lácticas para la obtención de un alimento funcional" 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, 06 de marzo de 2024.

Bosquez Zambrano, Johanna Carolina

C.C.: 2350226987



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

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Autorización de Publicación**

Yo Bosquez Zambrano, Johanna Carolina, con cédula de ciudadanía n°2350226987, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular:

“Evaluación mediante análisis fisicoquímico y microbiológico de distintas leguminosas liofilizadas, considerando la incorporación de bacterias ácido lácticas para la obtención de un alimento funcional” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 06 de marzo de 2024.

Bosquez Zambrano, Johanna Carolina

C.C.: 2350226987

## **Dedicatoria**

A Dios, que es mi vida, amor y fortaleza. A Mi madre Gladys Zambrano Delgado por estar presente en cada paso de mi vida, acompañándome en los momentos que parecía desvanecer, por años en los que me sostuvo y como un pilar fundamental me guio en el camino, mi ejemplo de lucha constante, la alegría de mi vida.

A mí, mi perseverancia, mis ganas de avanzar, aprender, investigar, conocer y luchar por mis deseos y anhelos.

### **Agradecimiento.**

A mi madre, gracias, por tanto, por tu amor incondicional por estar conmigo y no abandonar me, por darme ánimos y siempre pedir a Dios por mí. A mis hermanas Estefanía y Cynthia Bósquez, por creer en mí, darme consejos, y por ser las hermanas mayores que necesitaba.

A mis sobrinas Emilia y Antonella que alegran mis días, y sacan una sonrisa en mí.

A mis amigos Dylan, Alexander, Brandon, Joao y Michell por aconsejarme, darme ánimos, por dejarme con muchos recuerdos lindos y queridos que guardo en mi corazón.

A mi padre que a pesar de no estar presente. Me he cuestionado que, si bien el amor de un padre es importante, no importa de donde venga por que el amor es incondicional. Esto me ha hecho invencible y he podido seguir adelante.

A mi padrino Gerardo Chunchi, quien me dio buenos consejos, y quien estuvo presente en los primeros años de universidad.

A los docentes Dr. Juan Neira y a la Dra. Sungey Sánchez que me acompañaron en el desarrollo de mi trabajo de integración curricular para que todo salga bien, acompañándome en cada paso que daba.

A la Ing. Kathy Medina. Técnica del laboratorio de bromatología por la acogida que tuve para realizar mi trabajo de integración curricular.

Y finalmente a todas las personas con quienes compartí, gratos momentos de alegría y tristeza que pudieron darme muchas experiencias tanto académicas como emocionales gracias por todo.

## Índice de Contenido

Dedicatoria .....	I
Agradecimiento .....	II
Resumen .....	1
Abstract .....	2
1. Introducción y estado de arte .....	3
Objetivos.....	5
Objetivo General.....	5
Objetivos Específicos .....	5
Hipótesis.....	5
Diseño AXB .....	5
2. Revisión de Literatura.....	7
Leguminosas .....	7
Importancia Nutricional.....	8
Composición Nutricional.....	9
Papel de las Leguminosas en la Dieta y su Contribución a la Salud .....	9
Liofilización .....	10
Ventajas de la Liofilización .....	12
Aplicaciones de la Liofilización.....	12
Bacterias Ácido Lácticas .....	13
Limosilactobacillus reuteri .....	14



Lactiplantibacillus plantarum .....	15
Funciones y Beneficios de las Bacterias Ácido Lácticas en la Alimentación .....	15
Alimentos Funcionales y Probióticos .....	16
Alimentos Funcionales y su Impacto en la Salud .....	17
Propiedades Probióticas de los Alimentos y su Papel en la Microbiota Intestinal.....	18
Beneficios para la Salud Asociados con el Consumo de Alimentos Funcionales y Probióticos .....	19
Análisis Fisicoquímico .....	20
Acidez .....	20
pH.....	20
Humedad y Cenizas .....	21
Proteína .....	21
Grasa .....	22
Análisis Microbiológicos .....	22
Aerobios Mesófilos .....	22
Coliformes.....	22
Enterobacterias.....	23
3. Metodología .....	24
Ubicación del Área de Investigación.....	24
Ubicación Política .....	24
Ubicación Ecológica .....	24
Ubicación Geográfica .....	25

Materiales .....	26
Liofilización de la Harina de Leguminosas.....	26
Preparación del Bioconservante .....	26
Colocación del Bioconservante en las Leguminosas Liofilizadas .....	27
Alimento Funcional: Hamburguesa de res con Harina de Leguminosas Liofilizadas .....	27
Análisis Físicoquímicos de las Leguminosas Liofilizadas y las hamburguesas.....	28
Evaluación de las Propiedades Microbiológicas de las Hamburguesas .....	31
Métodos.....	32
Liofilización de las Leguminosas.....	32
Preparación del Bioconservante .....	32
Colocación del Bioconservante en las Leguminosas Liofilizadas .....	33
Alimento Funcional: Hamburguesa de res con Harina de Leguminosas Liofilizadas .....	33
Evaluación de las Propiedades Microbiológicas de las Hamburguesas .....	34
Análisis Físicoquímicos de las Leguminosas Liofilizadas y Producto Final .....	35
Diseño experimental aplicado a la investigación para la obtención de un alimento funcional, a base de leguminosas y con la adición de bacterias ácido lácticas, .....	41
Factores y Niveles para el Estudio.....	42
Interacción de los Tratamientos de Estudio.....	42
Modelo Matemático del Modelo Experimental Bifactorial (A*B) .....	43
Repeticiones .....	43
Análisis Estadístico.....	43
4. Resultados y Discusión .....	45

Resultado del Análisis Físicoquímicos de las Leguminosas Liofilizadas.....	45
Análisis de Varianza para las Variables a Evaluar de Alimento Funcional: Hamburguesa ....	46
Análisis de Varianza para la Variable pH.....	46
Análisis de Varianza para la Variable Acidez. ....	47
Análisis de Varianza para la Variable Humedad .....	47
Análisis de Varianza para la Variable Grasa .....	48
Análisis de Varianza para la Variable Proteína .....	48
Análisis de Varianza para la Variable Ceniza.....	49
Resultados de la factibilidad para la utilización de Tipos de Bacteria ( <i>Limosilactobacillus reuteri</i> y <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ). Factor B (Tukey $p < 0.05$ ).....	50
Prueba de Significancia de Tukey Tipo de leguminosa*Tipo de Bacteria (Interacción AB)	54
Resultado de Análisis de Conglomerados del Alimento Funcional: Hamburguesa .....	60
Resultados de la factibilidad para la utilización de dos variedades de leguminosas (Frijol calima rojo y soja Amarilla). Factor A (Tukey $p < 0.05$ ) .....	61
Análisis de Componentes Principales .....	66
Análisis Microbiológico del Alimento Funcional: Hamburguesa.....	70
5. Conclusiones y Recomendaciones .....	73
Conclusiones.....	73
Leguminosa .....	73
Bacterias ácido lácticas.....	74
Interacción entre las leguminosas y bacterias .....	75
Recomendaciones .....	76

6. Bibliografía..... 78

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Instrumentos y equipos necesarios para la liofilización de las leguminosas.....	26
<b>Tabla 2.</b> Instrumentos y equipos necesario para la preparación del inóculo inicial de bacterias..	26
<b>Tabla 3.</b> Instrumentos y equipos necesario para la bioconservación de las leguminosas liofilizadas.....	27
<b>Tabla 4.</b> Instrumento, equipos e ingredientes necesarios para la obtención de un Alimento Funcional a Base de Leguminosas Liofilizadas. ....	27
<b>Tabla 5.</b> Instrumentos y equipos necesarios para determinar la humedad. ....	28
<b>Tabla 6.</b> Instrumentos y equipos necesarios para determinar la ceniza.....	29
<b>Tabla 7.</b> Instrumentos y equipos necesarios para determinar el porcentaje de grasa. ....	29
<b>Tabla 8.</b> Instrumentos y equipos necesarios para determinar el porcentaje de proteína.....	29
<b>Tabla 9.</b> Instrumentos y equipos necesario para determinar la acidez.....	30
<b>Tabla 10.</b> Equipos e insumos necesarios para determinar el pH.....	31
<b>Tabla 11.</b> Instrumentos y equipos necesarios para determinar las propiedades microbiológicas. ....	31
<b>Tabla 12.</b> Factores y niveles del proyecto para probar los tipos de leguminosa, el tipo de bacteria ácido láctica, la concentración de bacterias ácido lácticas y el tiempo de fermentación. ....	42
<b>Tabla 13</b> Factores y niveles del proyecto evalúa la combinación de distintos tipos de leguminosas liofilizadas y cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un alimento funcional.....	42
<b>Tabla 14.</b> Análisis de varianza (AxB).....	44
<b>Tabla 15.</b> Propiedades fisicoquímicas de las leguminosas liofilizadas.....	45
<b>Tabla 16.</b> Análisis de la varianza para pH.....	46
<b>Tabla 17.</b> Análisis de la varianza para la variable acidez.....	47
<b>Tabla 18.</b> Análisis de la varianza para humedad.....	47

<b>Tabla 19.</b> Análisis de la varianza para la variable grasa .....	48
<b>Tabla 20.</b> Análisis de la varianza para la variable proteína.....	48
<b>Tabla 21.</b> Análisis de la varianza para la variable ceniza.....	49
<b>Tabla 22 .</b> Resumen de los valores estadísticos de la Prueba de significancia de Tukey para las variables estudiadas considerando dos tipos de leguminosa (Frijol calima rojo y soja Amarilla) .....	62
<b>Tabla 23.</b> Resumen de los valores estadísticos de la Prueba de significancia de Tukey para las variables estudiadas considerando dos tipos de bacteria (Limosilactobacillus reuteri y Lactiplantibacillus plantarum). .....	50
<b>Tabla 24.</b> Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Interacción AB) .....	54
<b>Tabla 25.</b> Matriz de correlación de componentes principales de componentes principales .....	66
<b>Tabla 26.</b> Matriz de componentes.....	67
<b>Tabla 27.</b> Tabla de comunalidades.....	68
<b>Tabla 28.</b> Análisis microbiológico de los tratamientos de la investigación.....	70

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Mapa de la ubicación geográfica del lugar de investigación. ....	25
<b>Figura 2.</b> Diagrama de proceso para la elaboración de hamburguesa de res .....	34
<b>Figura 3.</b> Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Factor B: Tipo de bacteria) .....	50
<b>Figura 4.</b> Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Interacción AB: Tipo de leguminosa*tipo de bacteria) .....	55
<b>Figura 5.</b> Dendrograma a través de un análisis de clúster jerárquico similitudes entre los diferentes tratamientos examinados .....	60
<b>Figura 6.</b> Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Factor A: Tipo de leguminosa).....	62
<b>Figura 7.</b> Gráfico de sedimentación del análisis de componentes principales .....	67
<b>Figura 8.</b> Gráfico de componentes principales.....	69

## Índice de Ecuaciones

<b>Ecuación 1.</b> Educación para la determinación de unidades formadoras de colonias.....	35
<b>Ecuación 2.</b> Porcentaje de humedad para las harinas .....	35
<b>Ecuación 3.</b> Porcentaje de humedad para productos cárnicos .....	36
<b>Ecuación 4.</b> Determinación del porcentaje de ceniza.....	37
<b>Ecuación 5.</b> Determinación del porcentaje de grasa .....	38
<b>Ecuación 6.</b> Determinación del porcentaje de proteína bruta .....	39
<b>Ecuación 7.</b> Determinación de acidez.....	39
<b>Ecuación 8.</b> Porcentaje de ácido láctico .....	40



## Resumen

Este estudio se centra en la evaluación de leguminosas liofilizadas, a las cuales se les incorporo bacterias ácido lácticas (*Limosilactobacillus reuteri* y *Lactiplantibacillus plantarum*) para desarrollar un alimento funcional, se evaluaron parámetro fisicoquímicos como pH, acidez, humedad, proteína, grasa y ceniza de la harina y se procedió a preparar hamburguesas de res adicionado la harina con las bacterias, con el objetivo general de evaluar si las leguminosas liofilizadas con bacterias ácido lácticas pueden generar un alimento funcional. Los análisis estadísticos, indicaron diferencias significativas en las variables evaluadas, destacando la influencia de la elección de la leguminosa y el tipo de bacteria utilizada. El análisis de componentes principales destacó la relación inversa entre pH y proteína, así como entre acidez y proteína, y se confirmó que la incorporación de bacterias puede contribuir a mejorar la calidad nutricional y sensorial del producto final.

**Palabras clave:** *Limosilactobacillus reuteri*, *Lactiplantibacillus plantarum*, alimento, funcional.

### **Abstract**

This study focuses on the evaluation of lyophilized legumes, to which lactic acid bacteria (*Limosilactobacillus reuteri* and *Lactiplantibacillus plantarum*) were incorporated to develop a functional food. Physicochemical parameters such as pH, acidity, moisture, protein, fat, and ash of the flour were evaluated, and beef burgers were prepared by adding the flour with the bacteria, with the overall objective of assessing whether lyophilized legumes with lactic acid bacteria can generate a functional food. Statistical analyses indicated significant differences in the evaluated variables, highlighting the influence of legume choice and the type of bacteria used. Principal component analysis highlighted the inverse relationship between pH and protein, as well as between acidity and protein, and it was confirmed that the incorporation of bacteria can contribute to improving the nutritional and sensory quality of the final product.

**Keywords:** *Limosilactobacillus reuteri*, *Lactiplantibacillus plantarum*, food, functional.

## 1. Introducción y estado de arte

En Ecuador, las leguminosas desempeñan un papel fundamental en la dieta y la agricultura, destacándose por su valor nutricional, versatilidad culinaria y su capacidad para enriquecer la fertilidad del suelo. La diversidad genética presente en estas leguminosas contribuye de manera significativa a la resiliencia agrícola y a la seguridad alimentaria en la región. Este contexto brinda el escenario propicio para llevar a cabo un estudio exhaustivo que busca evaluar diversas leguminosas liofilizadas, incorporando bacterias ácido lácticas de interés (*Limosilactobacillus reuteri*, *Lactococcus lactis*, *Lactiplantibacillus plantarum*), con el propósito de desarrollar un alimento funcional de gran potencial.

El proceso de liofilización, que implica la congelación del producto seguida de su sublimación para eliminar el contenido de agua, se plantea como una técnica clave en este estudio. Se reconoce que esta técnica ofrece la ventaja de conservar de manera óptima los nutrientes y las propiedades originales de las leguminosas, prolongando su vida útil sin la necesidad de recurrir a conservantes químicos. La incorporación de las bacterias ácido lácticas en este proceso tiene un propósito específico: descomponer compuestos de difícil digestión, como ciertos azúcares y fibras, con el fin de hacer las leguminosas más fácilmente digeribles y, por ende, más beneficiosas para la salud.

El presente proyecto no se limita únicamente a la liofilización y la incorporación de bacterias ácido lácticas. También contempla la preparación adecuada de las materias primas y la realización de análisis exhaustivos, tanto fisicoquímicos como microbiológicos, con el fin de comprender en detalle los cambios que experimentan las leguminosas a lo largo del proceso y garantizar la calidad y seguridad de los productos resultantes.

El enfoque final es la creación de un alimento funcional que ofrezca ventajas significativas para la salud, al mismo tiempo que mantenga su calidad y características sensoriales. Este producto, elaborado a partir de soya y frijol mediante la incorporación de

bacterias ácido lácticas y la liofilización, puede contribuir de manera relevante a la promoción de una alimentación más saludable y sostenible en Ecuador. Además, al resaltar la riqueza cultural y culinaria del país al utilizar ingredientes locales, se fomenta una dieta que se alinea con las tradiciones alimentarias locales, ofreciendo beneficios nutricionales y sostenibles para la población ecuatoriana.

### **Estado de arte:**

En los últimos años, se ha observado un creciente interés en la creación de alimentos funcionales que no solo proporcionen los nutrientes básicos necesarios para la alimentación, sino que también contengan compuestos que ofrezcan beneficios adicionales para la salud más allá de sus propiedades nutritivas básicas. Uno de los estudios pioneros en esta área fue llevado a cabo por Polizer-Rocha et al. (2020), quienes evaluaron las propiedades fisicoquímicas y tecnológicas de las hamburguesas de ternera con la adición de fibra de guisante como sustituto parcial de carne o grasa, encontrando resultados prometedores para la mejora del perfil nutricional y la aceptabilidad sensorial. Posteriormente, otros estudios también exploraron nuevas posibilidades en la formulación de productos cárnicos, como el trabajo de Ayavaca (2020), que se centró en la sustitución parcial de la carne molida por harina de soya en hamburguesas, y el estudio realizado por Rech de Marins et al. (2022), que investigó los efectos de la adición de cepas probióticas a productos cárnicos sometidos a procesamiento térmico. Asimismo, el estudio de Argel et al. (2022) exploró la sustitución parcial de la carne de cerdo magro por harina de *Phaseolus vulgaris* L. en híbridos de hamburguesas. Estas investigaciones han abordado diversos aspectos, incluyendo análisis físico-químico, evaluación sensorial, propiedades tecnológicas, perfil de textura, viabilidad bacteriana y características microbiológicas, entre otros, abriendo nuevas oportunidades para la innovación en la formulación de productos cárnicos con mejoras significativas en su perfil nutricional y sensorial.

## Objetivos

### **Objetivo General**

Evaluar mediante análisis fisicoquímico y microbiológico de distintas leguminosas liofilizadas, considerando la incorporación de bacterias ácido lácticas para la obtención de un alimento funcional

### **Objetivos Específicos**

- Determinar el proceso tecnológico para la obtención de distintas leguminosas liofilizadas a partir de Soya amarilla y frijol calima rojo a escala de laboratorio
- Analizar la incorporación de distintas bacterias ácido lácticas (*Limosilactobacillus reuteri*, y *Lactiplantibacillus plantarum*) en las distintas leguminosas liofilizadas para la obtención de un alimento funcional.
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del alimento funcional.

## Hipótesis

Evaluación mediante análisis fisicoquímico y microbiológico de distintas leguminosas liofilizadas, considerando la incorporación de bacterias ácido lácticas para la obtención de un alimento funcional.

### **Diseño AXB**

#### **Hipótesis de Factor A (Tipo de leguminosa)**

- **H<sub>0</sub> (Hipótesis Nula):** El tipo de leguminosa no tiene un efecto significativo en los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos asociados con la obtención de un alimento funcional mediante la incorporación de bacterias ácido lácticas.
- **H<sub>1</sub> (Hipótesis Alternativa):** El tipo de leguminosa tiene un efecto significativo en los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos asociados con la obtención de un alimento funcional mediante la incorporación de bacterias ácido lácticas.

Hipótesis de Factor B (bacterias ácido lácticas)

- **H<sub>0</sub> (Hipótesis Nula):** La cepa BAL no tiene un efecto significativo en los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos asociados con la obtención de un alimento funcional con distintas leguminosas liofilizadas.
- **H<sub>1</sub> (Hipótesis Alternativa):** La cepa BAL tiene un efecto significativo en los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos asociados con la obtención de un alimento funcional con distintas leguminosas liofilizadas

#### **Hipótesis de la interacción Factores AXB (Tipo de leguminosa, bacterias)**

- **H<sub>0</sub> (Hipótesis Nula):** Los efectos de la interacción entre tipo de leguminosa, y la cepa BAL no tienen un efecto significativo en los parámetros físico-químicos y microbiológicos asociados con la obtención de un alimento funcional.
- **H<sub>1</sub> (Hipótesis Alternativa):** Los efectos de la interacción entre tipo de leguminosa, y la cepa BAL tienen un efecto significativo en los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos asociados con la obtención de un alimento funcional.

## 2. Revisión de Literatura

### Leguminosas

Las leguminosas forman parte de un extenso conjunto de plantas angiospermas, ya que cuentan con flores y semillas. Estas plantas se distinguen por su fruto, que adopta la forma de legumbre y está contenido en vainas que se abren longitudinalmente en dos valvas (Foresto, 2020).

Las leguminosas son destacadas por su significativo valor nutricional. Son una fuente rica de proteínas, fibras, vitaminas y minerales esenciales. Estos alimentos desempeñan un papel crucial en la dieta humana al proporcionar nutrientes esenciales para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de la salud (Ntatsi, et al., 2018). Su composición nutricional contribuye a una dieta equilibrada y puede ser especialmente beneficiosa en dietas vegetarianas y veganas (Castro et al., 2018).

Desde una perspectiva agrícola, las leguminosas desempeñan un papel fundamental en la sostenibilidad del suelo. Muchas variedades tienen la capacidad única de fijar nitrógeno atmosférico en el suelo a través de la simbiosis con bacterias nodulíferas (Jhariya et al., 2018). Este proceso mejora la fertilidad del suelo y reduce la necesidad de fertilizantes nitrogenados sintéticos, contribuyendo así a prácticas agrícolas más sostenibles (Jurado, 2022).

Las leguminosas han sido parte integral de las dietas de diversas culturas en todo el mundo. Su versatilidad culinaria permite una variedad de preparaciones, desde guisos y sopas hasta platos principales y acompañamientos. La diversidad de legumbres disponibles en diferentes regiones también refleja la riqueza cultural de la alimentación global, brindando opciones nutritivas y deliciosas a diversas comunidades.

La diversidad genética de las leguminosas contribuye a la resiliencia agrícola al proporcionar opciones adaptables a diferentes condiciones climáticas y ambientales. Esta capacidad de adaptación es esencial para la seguridad alimentaria, ya que las leguminosas

pueden crecer en una variedad de entornos, ayudando a garantizar el suministro de alimentos en diversas circunstancias (Hernández, 2023).

### ***Importancia Nutricional***

Las leguminosas destacan como una fuente fundamental de nutrientes esenciales en la dieta humana. En primer lugar, son reconocidas por su contenido proteico, constituyendo una valiosa alternativa para aquellos que buscan fuentes de proteínas de origen vegetal (Vanlauwe, et al., 2019). La presencia de aminoácidos esenciales en las leguminosas las convierte en un componente esencial para el desarrollo y mantenimiento de tejidos corporales, así como para la síntesis de enzimas y hormonas (Cakir, 2019).

Además de su aporte proteico, las leguminosas son una excelente fuente de fibras alimentarias, tanto solubles como insolubles. Estas fibras desempeñan un papel crucial en la salud digestiva al mejorar la función intestinal, prevenir el estreñimiento y contribuir a la gestión del peso (Guinet, Nicolardot, & Voisin, 2020). La fibra también juega un papel importante en la regulación de los niveles de glucosa en sangre y en la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares (Martín, 2019).

En términos de micronutrientes, las leguminosas son ricas en vitaminas y minerales esenciales. Contienen vitaminas del complejo B, como ácido fólico, que es crucial durante el embarazo, y minerales como hierro, zinc y magnesio (Schultze, et al., 2018). Estos nutrientes desempeñan funciones vitales en el metabolismo, la formación de glóbulos rojos y la salud ósea (Kamboj & Nanda, 2018).

Otro aspecto significativo es la presencia de fitoquímicos y antioxidantes en las leguminosas. Estos compuestos contribuyen a la protección celular contra el daño oxidativo, ayudando a prevenir enfermedades crónicas y promoviendo la salud en general. Además, se ha observado que algunos fitoquímicos presentes en las leguminosas tienen propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas (Varshney, Ojiewo, & Monyo, 2019).



### ***Composición Nutricional***

Las leguminosas poseen una composición nutricional excepcional que las distingue como una valiosa fuente de nutrientes esenciales para la salud humana. En términos de macronutrientes, las leguminosas son conocidas por su contenido significativo de proteínas. Este macronutriente esencial es fundamental para la construcción y reparación de tejidos, la síntesis de enzimas y el mantenimiento general de la salud del organismo (Margier, et al., 2018). La combinación única de aminoácidos presentes en las leguminosas las convierte en una opción valiosa para aquellos que buscan fuentes de proteínas de alta calidad (Brown et al., 2018).

Además de su aporte proteico, las leguminosas son una fuente rica de carbohidratos complejos, incluyendo almidones y fibras alimentarias. Los carbohidratos proporcionan una fuente sostenida de energía, mientras que las fibras, tanto solubles como insolubles, contribuyen a la salud digestiva y al control del azúcar en la sangre. La fibra también desempeña un papel en la prevención de enfermedades cardiovasculares y la gestión del peso (Kan, et al., 2018).

En cuanto a los lípidos, las leguminosas contienen cantidades moderadas de grasas, siendo estas principalmente insaturadas. Estas grasas saludables son beneficiosas para la salud cardiovascular y ayudan en la absorción de vitaminas liposolubles. La presencia de ácidos grasos esenciales, como el ácido linoleico, agrega un componente adicional al perfil lipídico de las leguminosas (Bulyaba & Lenssen, 2019).

### ***Papel de las Leguminosas en la Dieta y su Contribución a la Salud***

Las leguminosas, al desempeñar un papel destacado en la dieta humana, contribuyen significativamente a la salud gracias a su composición nutricional única. La presencia de proteínas vegetales en las leguminosas no solo las convierte en una fuente esencial para vegetarianos y veganos, sino que también ofrece beneficios para la construcción y reparación

de tejidos en el organismo (Calleja, 2019). Esta característica las posiciona como una alternativa valiosa a las fuentes de proteínas animales, fomentando dietas más equilibradas.

Un aspecto crucial del papel de las leguminosas es su aporte abundante de fibra dietética. La fibra, tanto soluble como insoluble, desempeña un papel vital en la salud digestiva al promover la regularidad intestinal y prevenir el estreñimiento. Además, la fibra contribuye a la sensación de saciedad, lo que puede ser beneficioso para el control del peso y la gestión de la ingesta calórica (Comiotto, 2023).

En el ámbito de la salud metabólica, las leguminosas han demostrado su capacidad para regular los niveles de glucosa en sangre. La combinación de carbohidratos complejos y fibra facilita la estabilización de los niveles de azúcar en la sangre, lo que puede ser particularmente beneficioso para personas con diabetes o en riesgo de desarrollar la enfermedad (Isidra & Valdés, 2022).

La relación entre el consumo de leguminosas y la salud cardiovascular es destacada. Estas plantas contribuyen a la reducción de los niveles de colesterol LDL, promoviendo así la salud del sistema cardiovascular y disminuyendo el riesgo de enfermedades cardíacas. La inclusión regular de leguminosas en la dieta puede ser una estrategia efectiva para mantener la salud cardiovascular (Casado & Ibeas, 2021).

Además, las leguminosas poseen propiedades antiinflamatorias y antioxidantes debido a la presencia de fitoquímicos y compuestos bioactivos. Estos elementos pueden ayudar a combatir el estrés oxidativo en el cuerpo y reducir la inflamación, contribuyendo a la prevención de enfermedades crónicas, como ciertos tipos de cáncer (Villamar et al., 2022).

### **Liofilización**

La liofilización, también conocida como secado por congelación, emerge como un proceso de deshidratación altamente efectivo y versátil que encuentra aplicación en diversas industrias, desde la alimentaria hasta la farmacéutica. Este método implica la congelación de un producto seguido de la eliminación del agua mediante sublimación, un proceso en el cual el

agua pasa directamente del estado sólido al gaseoso, evitando el estado líquido (Mosquera, Ayala, & Serna, 2019).

Uno de los aspectos destacados de la liofilización es su capacidad para conservar la integridad nutricional de los alimentos. Al congelar el producto antes de la deshidratación, se reduce la velocidad de las reacciones químicas y enzimáticas, preservando así los nutrientes esenciales. Este proceso de conservación es especialmente beneficioso en la industria alimentaria, donde se busca mantener la calidad y el valor nutricional de los alimentos (Chumacero et al., 2022).

Además de su impacto en la calidad nutricional, la liofilización ofrece una ventaja significativa en términos de conservación del sabor y la textura. La estructura porosa resultante de la sublimación del agua permite una rápida rehidratación durante la preparación, manteniendo las características sensoriales del producto original. Este atributo es crucial tanto en alimentos como en productos farmacéuticos, donde la textura y el sabor son elementos fundamentales para la aceptación del consumidor (Ramírez, Cortés, & Hincapié, 2019).

La liofilización también ha encontrado aplicaciones valiosas en la conservación de productos farmacéuticos y biológicos. Al eliminar el agua, se reduce el riesgo de degradación y proliferación microbiana, permitiendo una mayor estabilidad y vida útil de los productos farmacéuticos (Falconí, Valdiviezo, & Ramírez, 2021). Este aspecto es esencial en la producción y almacenamiento de medicamentos y vacunas.

Aunque la liofilización es un proceso altamente eficaz, es importante destacar que requiere equipos especializados y suele ser más costoso que otros métodos de deshidratación. Sin embargo, sus beneficios en términos de calidad y conservación hacen que sea una opción preferida en situaciones donde la integridad del producto es de suma importancia (Flores, Ruiz, & Oscanoa, 2021).

### ***Ventajas de la Liofilización***

La liofilización, o secado por congelación, destaca por sus numerosas ventajas que la han convertido en un método de deshidratación preferido en diversas industrias. Una de las ventajas más significativas radica en la capacidad de preservar la calidad original de los productos. Al congelar y luego deshidratar, la liofilización minimiza la pérdida de textura, sabor y nutrientes, asegurando que el producto final mantenga su integridad y sea más apetecible para los consumidores (Bhatta, Stevanovic, & Ratti, 2020).

Otra ventaja clave de la liofilización es su capacidad para prolongar la vida útil de los productos. Al eliminar el agua, el principal contribuyente al deterioro y descomposición, se reducen drásticamente las posibilidades de proliferación microbiana y degradación química. Esto resulta especialmente beneficioso en la conservación de alimentos y productos farmacéuticos, donde la estabilidad a largo plazo es esencial (Oyinloye & Yoon, 2020).

La ligereza y la facilidad de transporte son ventajas adicionales de la liofilización. Al reducir el contenido de agua, se disminuye significativamente el peso del producto, facilitando su almacenamiento y transporte (Gatlin & Nail, 2019). Esta característica es particularmente valiosa en la industria alimentaria, donde la liofilización permite la producción de alimentos ligeros y de larga duración, ideales para situaciones como expediciones, campamentos o misiones espaciales (Salehi, 2023).

La liofilización también ofrece ventajas en términos de rehidratación rápida. La estructura porosa resultante del proceso de sublimación permite que el producto recupere su forma y textura originales al entrar en contacto con líquidos, acortando así los tiempos de preparación. Esta característica es esencial en situaciones donde la rapidez en la preparación es crucial, como en la producción de alimentos instantáneos (Liu, Zhang, & Hu, 2022).

### ***Aplicaciones de la Liofilización***

La liofilización, además de sus ventajas generales, encuentra aplicaciones específicas que impulsan la innovación en diversas industrias. En la industria alimentaria, este método se

utiliza para la producción de alimentos instantáneos, café liofilizado, frutas y verduras deshidratadas, así como comidas listas para el consumo (Martínez, 2023). La capacidad de preservar la calidad y el sabor original hace que los productos liofilizados sean ideales para campamentos, expediciones y situaciones donde la conveniencia y la conservación de nutrientes son prioritarias (Egas, 2019).

En el ámbito farmacéutico, la liofilización se utiliza extensamente para preservar la estabilidad de medicamentos y productos biológicos. Las vacunas, enzimas, anticuerpos y otros productos sensibles a la temperatura pueden beneficiarse de este proceso para mantener su eficacia durante el almacenamiento y transporte (Auré, Astráin, & Cebrián, 2022). La liofilización asegura que los productos farmacéuticos conserven su actividad biológica original, evitando la degradación y pérdida de potencia.

En el campo de la investigación y desarrollo, la liofilización ha encontrado aplicaciones valiosas para preservar muestras biológicas y productos químicos sensibles. La eliminación del agua permite almacenar a largo plazo materiales biológicos, como cultivos celulares y enzimas, sin comprometer su integridad. Esto facilita la investigación científica y la producción de productos biotecnológicos (Gualpa, 2021).

### **Bacterias Ácido Lácticas**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) representan un grupo diverso de microorganismos que desempeñan un papel crucial en la fermentación y conservación de alimentos. Este grupo incluye diversas especies, como *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*, que comparten la capacidad de producir ácido láctico como producto principal de la fermentación (Díaz & Salgado, 2022). La fermentación láctica realizada por estas bacterias contribuye no solo a la preservación de alimentos, sino también a la generación de sabores característicos y beneficios nutricionales (Moradi, Molaei, & Guimarães, 2021).

En el proceso de fermentación láctica, las BAL descomponen los carbohidratos presentes en los alimentos, como los azúcares, para producir ácido láctico. Este ácido

contribuye a reducir el pH del entorno, creando condiciones desfavorables para el crecimiento de patógenos y bacterias no deseadas. Esta acción antimicrobiana es esencial en la conservación de alimentos, ya que ayuda a prevenir la descomposición y alarga la vida útil del producto (Wang, et al., 2021).

La diversidad de las BAL permite su aplicación en una amplia variedad de productos fermentados, como yogur, queso, chucrut y kimchi. Cada especie de BAL aporta características únicas al proceso de fermentación, influyendo en la textura, sabor y aroma del producto final. Además, algunas BAL tienen propiedades probióticas, lo que significa que pueden tener beneficios para la salud al promover el equilibrio de la microbiota intestinal (Kieliszek et al., 2021).

### ***Limosilactobacillus reuteri***

*L. reuteri*, anteriormente conocido como *Lactobacillus reuteri*, emerge como una especie clave de bacterias ácido lácticas con un impacto significativo en la biotecnología alimentaria. Esta bacteria, perteneciente al género *Limosilactobacillus*, se distingue por su capacidad para fermentar una variedad de sustratos y su resistencia a las condiciones adversas del entorno, lo que la convierte en una opción valiosa para diversas aplicaciones en la industria alimentaria y la investigación biotecnológica (Abuqwider, Altamimi, & Mauriello).

Una de las características distintivas de *L. reuteri* es su habilidad para producir compuestos bioactivos, como reuterina y bacteriocinas, durante el proceso de fermentación. Estos compuestos tienen propiedades antimicrobianas, lo que contribuye a la preservación de alimentos al inhibir el crecimiento de bacterias indeseadas y patógenos (Piccioni, et al., 2021).

La resistencia de *L. reuteri* a condiciones adversas, como la acidez y la presencia de sales biliares, la hace especialmente adecuada para su aplicación en el tracto gastrointestinal. Esta característica es fundamental para su potencial uso como probiótico, ya que las bacterias deben superar las barreras del sistema digestivo para ejercer sus efectos beneficiosos en la

salud. La capacidad de *L. reuteri* para colonizar y persistir en el intestino confiere un valor añadido en la búsqueda de mejorar la salud intestinal y general (Li, et al., 2022).

### ***Lactiplantibacillus plantarum***

*L. plantarum*, previamente clasificado como *Lactobacillus plantarum*, emerge como una especie destacada de bacterias ácido lácticas con una presencia significativa en la biotecnología alimentaria. Este microorganismo, perteneciente al género *Lactiplantibacillus*, exhibe una versatilidad única que lo hace apto para diversas aplicaciones en la industria alimentaria y la investigación científica (Nordström et al., 2021).

La capacidad de *L. plantarum* para fermentar una amplia variedad de sustratos lo convierte en un actor clave en la producción de alimentos fermentados. Este proceso metabólico no solo contribuye a la conservación de alimentos al acidificar el medio y prevenir el crecimiento de microorganismos indeseados, sino que también genera compuestos aromáticos y sabores característicos que mejoran la calidad sensorial de los productos finales (Yilmaz, et al., 2022).

Además de su papel en la fermentación alimentaria, *L. plantarum* ha sido reconocido por su resistencia a condiciones ambientales adversas, incluyendo la acidez del estómago y la presencia de sales biliares. Esta resistencia le confiere la capacidad de llegar al tracto gastrointestinal, donde puede desempeñar funciones beneficiosas como probiótico. La capacidad de *L. plantarum* para colonizar y persistir en el intestino sugiere su potencial para influir positivamente en la salud intestinal y modular la microbiota (Fidanza, Panigrahi, & Kollmann, 2021).

### ***Funciones y Beneficios de las Bacterias Ácido Lácticas en la Alimentación***

Las bacterias ácido lácticas (BAL) desempeñan funciones vitales en la alimentación, brindando una serie de beneficios nutricionales y saludables. Estos microorganismos,

presentes en alimentos fermentados y probióticos, contribuyen significativamente a mejorar la calidad de la dieta y promover la salud gastrointestinal (Insuasti et al., 2023).

En primer lugar, las BAL participan activamente en la fermentación de alimentos, un proceso que no solo contribuye a la preservación de los productos, sino que también mejora su sabor y textura. Durante la fermentación, las BAL descomponen los azúcares y otros compuestos presentes en los alimentos, generando ácido láctico como subproducto (Pérez & Trinidad, 2022). Este ácido contribuye a acidificar el medio, inhibiendo el crecimiento de microorganismos indeseados y mejorando la estabilidad y la vida útil de los alimentos fermentados (Parra, 2020).

Uno de los beneficios más destacados de las BAL es su papel como probióticos. Algunas especies, como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, tienen la capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal, donde ejercen efectos beneficiosos para la salud. Estos efectos incluyen la mejora del equilibrio del microbiota intestinal, la producción de ácidos orgánicos que inhiben el crecimiento de patógenos y la estimulación del sistema inmunológico (Encina & Stiglich, 2021).

Las BAL también contribuyen a la digestión de los alimentos al producir enzimas que descomponen compuestos difíciles de digerir, como ciertas fibras y polisacáridos. Esta acción enzimática mejora la absorción de nutrientes en el tracto gastrointestinal, promoviendo una mejor utilización de los componentes alimentarios y, en última instancia, favoreciendo la salud nutricional (López et al., 2023).

### **Alimentos Funcionales y Probióticos**

Los alimentos funcionales y probióticos representan una evolución significativa en el paradigma de la nutrición, ya que van más allá de simplemente proporcionar nutrientes esenciales. Los alimentos funcionales son aquellos que contienen componentes biológicamente activos, como antioxidantes, fibra y ácidos grasos omega-3, que ofrecen beneficios específicos



para la salud. Estos alimentos se diseñan estratégicamente para mejorar funciones fisiológicas y contribuir a la prevención de enfermedades (Cardona & López, 2019).

Dentro de la categoría de alimentos funcionales, los probióticos son un componente esencial. Estos son microorganismos vivos, como ciertas cepas de bacterias ácido lácticas, que confieren beneficios para la salud cuando se consumen en cantidades adecuadas. Los probióticos son conocidos por su capacidad para mejorar la salud intestinal al equilibrar el microbiota, fortalecer las defensas inmunológicas y facilitar la digestión de ciertos componentes alimentarios (Zamora & Barboza, 2020).

La incorporación de probióticos en alimentos funcionales se alinea con la creciente comprensión de la importancia del microbiota intestinal en la salud general. Mantener un equilibrio adecuado de bacterias en el intestino no solo contribuye a una digestión eficiente, sino que también desempeña un papel crucial en la función inmunológica y la salud metabólica (Pedraza, 2023).

Ejemplos comunes de alimentos funcionales y probióticos incluyen yogures enriquecidos con cepas específicas de bacterias beneficiosas, kéfir, productos fermentados como el chucrut y alimentos fortificados con nutrientes clave. Estos productos no solo satisfacen las necesidades nutricionales básicas, sino que también ofrecen un impulso adicional para mejorar la salud y el bienestar (Pons & Rocher, 2020).

### **Alimentos Funcionales y su Impacto en la Salud.**

El impacto de los alimentos funcionales en la salud es diverso y se extiende a múltiples sistemas del cuerpo. Por ejemplo, alimentos ricos en antioxidantes, como frutas y verduras, ayudan a combatir el estrés oxidativo, reduciendo el riesgo de enfermedades crónicas como enfermedades cardíacas y cáncer (Matos, 2020). Las fibras dietéticas presentes en alimentos funcionales como granos enteros y legumbres no solo contribuyen a la salud digestiva, sino que también pueden ayudar a controlar el peso y regular los niveles de glucosa en sangre (De Armas, Jiménez, & Córdoba, 2023).

El enfoque en alimentos funcionales ha llevado al desarrollo de productos enriquecidos con nutrientes específicos para abordar deficiencias nutricionales y mejorar la salud. Por ejemplo, la fortificación de alimentos con ácido fólico ha sido una estrategia exitosa para prevenir defectos del tubo neural en recién nacidos (Zamora & Barboza, 2020).

La investigación continua en el campo de la nutrición funcional explora cómo los alimentos y sus componentes bioactivos pueden afectar positivamente la salud en áreas como la función cognitiva, la salud ósea, la inmunidad y la longevidad (Cardona & López, 2019). La incorporación consciente de alimentos funcionales en la dieta diaria se ha convertido en una estrategia clave para promover un estilo de vida saludable y prevenir enfermedades crónicas.

### ***Propiedades Probióticas de los Alimentos y su Papel en la Microbiota Intestinal***

Las propiedades probióticas de los alimentos han emergido como una fuerza poderosa en la promoción de la salud intestinal y, por ende, en la mejora del bienestar general. Los alimentos probióticos contienen cepas específicas de bacterias beneficiosas que, cuando se consumen regularmente, establecen una alianza simbiótica en la microbiota intestinal, con efectos positivos que se extienden mucho más allá del sistema digestivo (Martínez, 2023).

En el epicentro de estas propiedades probióticas está la capacidad de las cepas probióticas para colonizar y persistir en el tracto gastrointestinal. Al resistir las condiciones adversas del estómago, estas bacterias beneficiosas alcanzan el intestino, donde despliegan su acción. Su presencia contribuye a mantener un equilibrio saludable en el microbiota, frenando el crecimiento de microorganismos perjudiciales y fomentando la diversidad microbiana (Morales, 2022).

El papel fundamental de los probióticos en la estimulación del microbiota intestinal se refleja en la producción de ácidos grasos de cadena corta, metabolitos que alimentan las células intestinales y tienen propiedades antiinflamatorias. Además, los probióticos participan activamente en la descomposición de fibras y carbohidratos no digeribles, mejorando la eficiencia del sistema digestivo y favoreciendo la absorción de nutrientes (Aisa, 2021).

La función de los probióticos se traduce en beneficios más allá del sistema digestivo. La interacción de estas bacterias beneficiosas con las células inmunológicas en la mucosa intestinal fortalece la respuesta inmune, contribuyendo así a las defensas naturales del organismo. Esta interconexión entre la salud intestinal y la inmunidad destaca el papel clave de los probióticos en el mantenimiento del equilibrio fisiológico (Alvarado & Nataren, 2022).

### ***Beneficios para la Salud Asociados con el Consumo de Alimentos Funcionales y Probióticos.***

El consumo regular de alimentos funcionales y probióticos ha demostrado una serie de beneficios significativos para la salud, estableciendo una conexión directa entre las elecciones dietéticas y el bienestar integral. Estos alimentos no solo cumplen con la función básica de nutrir el cuerpo, sino que también ofrecen una gama de efectos positivos que abarcan desde la salud digestiva hasta la mejora de la función inmunológica.

Uno de los beneficios clave asociados con el consumo de alimentos funcionales y probióticos es la promoción de la salud gastrointestinal. Las cepas probióticas presentes en estos alimentos contribuyen a mantener un equilibrio saludable en el microbiota intestinal, previniendo trastornos gastrointestinales y mejorando la digestión (Molina, 2019). La reducción del riesgo de infecciones gastrointestinales y la gestión de condiciones como el síndrome del intestino irritable son testimonios de la eficacia de estos alimentos en el cuidado del sistema digestivo.

Además de sus efectos en la salud intestinal, los alimentos funcionales y probióticos también han sido asociados con mejoras en la función inmunológica. Las interacciones entre las bacterias beneficiosas y el sistema inmunológico en la mucosa intestinal fortalecen las defensas naturales del organismo, reduciendo la susceptibilidad a enfermedades y promoviendo una respuesta inmunológica más eficaz frente a patógenos (Vinderola & Pérez, 2021).

La gestión del peso y la mejora de la salud metabólica son beneficios adicionales vinculados al consumo de estos alimentos. Algunos estudios sugieren que ciertas cepas probióticas pueden influir en la composición del microbiota de manera que favorezca la pérdida de peso y la regulación de la glucosa en sangre (Lima, 2023). Estos hallazgos respaldan la idea de que los alimentos funcionales y probióticos pueden desempeñar un papel clave en estrategias para la prevención y gestión de la obesidad y enfermedades metabólicas.

La conexión entre el estado de ánimo y la salud mental también ha sido explorada en relación con el consumo de alimentos probióticos. Se ha observado que ciertas cepas beneficiosas pueden tener efectos positivos en la salud mental, influenciando la producción de neurotransmisores y aliviando síntomas de ansiedad y depresión (De Armas, Jiménez, & Córdoba, 2023). Esta área de investigación en constante expansión sugiere que la salud del intestino podría estar intrínsecamente ligada al bienestar emocional.

### **Análisis Físicoquímico**

#### ***Acidez***

La Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 521 establece un método meticuloso para determinar la acidez en harinas de origen vegetal, expresada como porcentaje de masa de ácido sulfúrico. Este proceso implica la preparación cuidadosa de muestras, su posterior titulación con una solución estandarizada de hidróxido de sodio utilizando fenolftaleína como indicador, y cálculos precisos para determinar la acidez titulable. La norma enfatiza la importancia de la precisión, la repetibilidad y la documentación adecuada de cualquier variable que pueda influir en los resultados, asegurando así la exactitud y fiabilidad del método utilizado para la evaluación de la acidez en las harinas (NTE INEN 0521, 1981).

#### ***pH***

La Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 0526 (1981) detalla un método estandarizado para determinar la concentración de ion hidrógeno (pH) en harinas de origen vegetal,

especialmente trigo y pan. Esta metodología se centra en el uso de un potenciómetro con electrodos de vidrio para realizar mediciones precisas del pH, un parámetro esencial para evaluar la calidad y las propiedades fisicoquímicas de las harinas. La norma incluye instrucciones detalladas sobre la preparación de la muestra, los reactivos necesarios, el procedimiento de medición y la interpretación de los resultados, lo que asegura la precisión, fiabilidad y estandarización del análisis en la industria alimentaria y en la investigación científica.

### ***Humedad y Cenizas***

La metodología correspondiente a la determinación de humedad y cenizas involucra dos técnicas analíticas cruciales para la determinación de la composición de muestras agropecuarias y productos alimenticios: la determinación de humedad y la determinación de cenizas. La determinación de humedad se enfoca en medir el contenido de agua y volátiles mediante el secado de la muestra y la posterior comparación de pesos, proporcionando datos esenciales para el control de calidad y conservación. Por otro lado, la determinación de cenizas mide el contenido mineral residual después de la calcinación completa de la muestra, ofreciendo información valiosa sobre la calidad nutricional y la pureza de las muestras. Ambos métodos son fundamentales en el análisis y control de calidad en la industria agropecuaria y alimenticia, requiriendo precisión instrumental y procedimientos estandarizados para garantizar resultados confiables (García & Fernández, 2012).

### ***Proteína***

La metodología NTE INEN 0519 en la determinación de proteínas en harinas de origen vegetal emplea el método Kjeldahl, un proceso estándar y reconocido internacionalmente para medir el contenido de nitrógeno, que luego se convierte en contenido proteico mediante un factor de conversión específico. El procedimiento implica la digestión ácida de la muestra para liberar el nitrógeno como amoníaco, seguido de la destilación y titulación del amoníaco

liberado. La precisión de los reactivos, la estandarización de las soluciones y la calibración meticulosa de los instrumentos son esenciales para garantizar la exactitud y la repetibilidad de los resultados (NTE INEN 0519, 1981).

### **Grasa**

La Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 0523 (1981) prescribe un método para determinar el contenido de grasa o extracto etéreo en harinas de origen vegetal. El procedimiento implica la extracción de la grasa de una muestra de harina utilizando un solvente orgánico en un aparato tipo Soxhlet, seguido de la recuperación del disolvente por destilación y la medición del residuo graso. Este método no solo es fundamental para garantizar la calidad y consistencia de las harinas en la industria alimentaria, sino que también proporciona un estándar uniforme para la evaluación nutricional y el control de calidad en la producción y el procesamiento de alimentos a base de harina (Surco & Alvarado, 2010).

### **Análisis Microbiológicos**

#### ***Aerobios Mesófilos***

Estos microorganismos, son capaces de crecer en presencia de oxígeno a temperaturas entre 20 y 45°C, con una temperatura óptima de crecimiento de 32 °C, principalmente sirven como indicador de la calidad sanitaria del alimento, así como de las condiciones de manipulación y la higiene de la materia prima (Freitas et al., 2009). Se puede determinar mediante el uso de Petrifilm™ que cuenta con una película inferior donde están los nutrientes deshidratados y una película superior de polietileno que contiene indicadores y agentes gelificantes, una vez incubado se puede enumerar las colonias (Souza et al., 2015)

#### ***Coliformes***

Para el control microbiológico se establece la determinación de microorganismos coliformes por la técnica de placas PETRIFILM 3M se basa en el recuento de coliformes que incluye nutrientes de Bilis Rojo-Violeta (VRB), un indicador de tetrazolium, y una solución

gelificante soluble en agua a baja temperatura, que facilita el recuento de las colonias que forman los coliformes. El gas que se produce por los coliformes que se fermentan es atrapado por la película superior (3M Food Safety, 2017).

### ***Enterobacterias***

Para el análisis microbiológico de las enterobacterias se utiliza el método de las placas PETRIFILM 3M, que contiene como indicador color rojo para observar las colonias de coliformes que se atrapan en la película superior, las bacterias producen ácido/gas se conocen como enterobacteriaceae (3M Food Safety, 2017).

### 3. Metodología

#### Ubicación del Área de Investigación

##### *Ubicación Política*

La presente tesis se desarrolló en el área de Luz de América, ubicada en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, en el cantón de Santo Domingo, Ecuador. El sector de investigación se encuentra específicamente en la Vía Quevedo, Km 24. Esta zona es de gran importancia debido a su ubicación estratégica que permite el acceso a diversas comunidades y poblaciones circundantes, además de presentar una alta actividad agrícola y agroindustrial. En el marco político, la zona es parte de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, ubicada en la región Costa del Ecuador. La provincia cuenta con una superficie de 3.669 km<sup>2</sup> y una población aproximada de 494.004 habitantes, según el último censo realizado en 2010.

##### *Ubicación Ecológica*

La zona de estudio de la presente tesis se encuentra en un bosque húmedo tropical, a una altitud de 224 metros sobre el nivel del mar. La temperatura media en esta área es de 24,6 °C, mientras que la precipitación anual promedio es de 2860 mm, lo que indica un clima muy húmedo. La humedad relativa es de aproximadamente un 85%, lo que sugiere un ambiente extremadamente húmedo. En términos de la cantidad de luz solar, se registran cerca de 680 horas de heliofanía al año. El suelo de la zona de estudio es de tipo franco arenoso, lo que implica que es un suelo bien drenado, pero con una capacidad moderada para retener agua y nutrientes. Estas características hacen de esta área un lugar propicio para llevar a cabo estudios sobre la biodiversidad y ecología de los bosques tropicales, así como para analizar la relación entre el clima, el suelo y los seres vivos que habitan en esta zona.

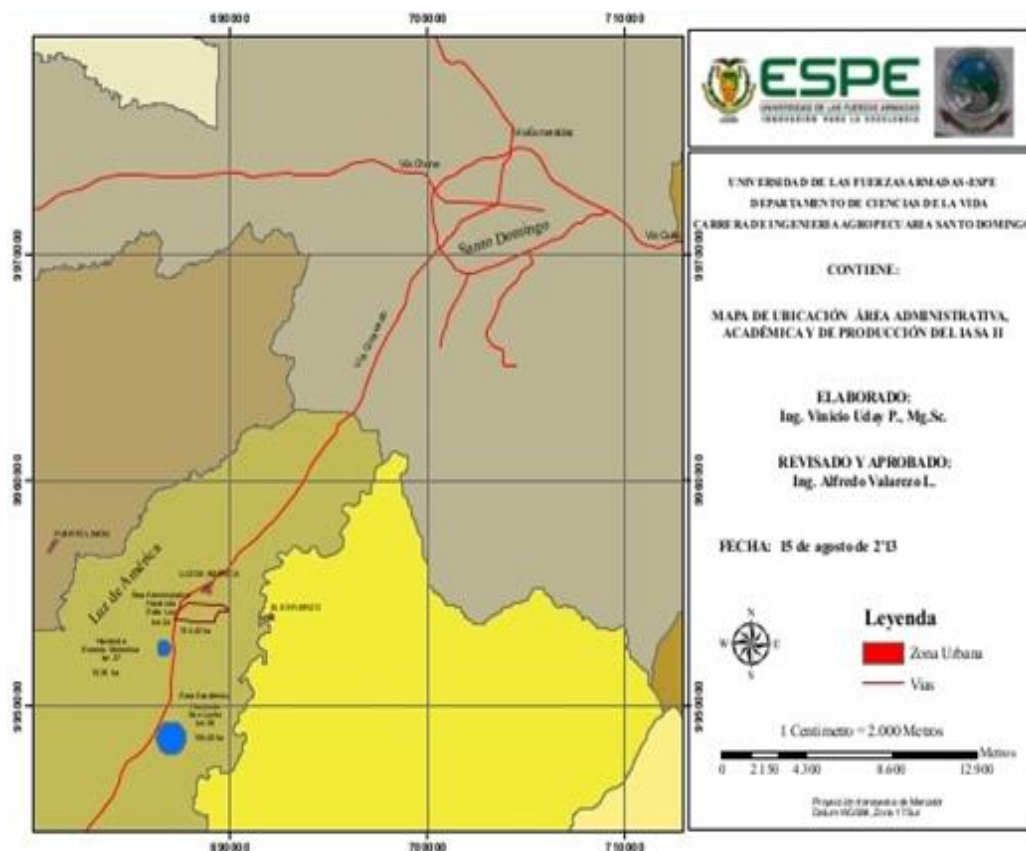
Fuente: Estación Agro Meteorológica "Puerto Ila", Vía Quevedo km 34.



### ***Ubicación Geográfica***

El presente proyecto de Integración Curricular se llevó a cabo en la Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE" Extensión Santo Domingo, en los laboratorios de Bromatología y Microbiología de los Alimentos. La universidad se encuentra en la latitud  $00^{\circ} 24' 36''$  y la longitud  $79^{\circ} 18' 43''$ , en una altitud de 270 metros sobre el nivel del mar. Estas coordenadas sitúan la universidad en una zona climática cálida y húmeda, típica de la región costera del Ecuador. En términos geográficos, la universidad se encuentra en la región oriental del país, en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. La ubicación de la universidad y de los laboratorios de investigación en ella, ofrece una excelente oportunidad para llevar a cabo estudios académicos rigurosos y avanzados en el campo de la bromatología y microbiología de los alimentos.

**Figura 1.** *Mapa de la ubicación geográfica del lugar de investigación.*



## Materiales y Métodos

### Materiales

#### Liofilización de la Harina de Leguminosas

**Tabla 1.** Instrumentos y equipos necesarios para la liofilización de las leguminosas.

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Vasos de precipitación (20 ml)	Liofilizador		Soja amarilla pulverizada
Espátula	Balanza analítica		Fréjol calima
Fundas ziploc			rojo pulverizada

#### Preparación del Bioconservante

##### Preparación de Inoculo Inicial y Obtención de la Solución Bacteriana

**Tabla 2.** Instrumentos y equipos necesario para la preparación del inoculo inicial de bacterias

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Mechero	Incubadora	Agar MRS	<i>Limosilactobacillus</i>
Cajas Petri estériles	Autoclave	Caldo MRS	<i>reuteri</i>
Hisopos estériles	pH-metro	Solución tampón	<i>Lactiplantibacillus</i>
Tubo de ensayo	Centrifuga	de ácido cítrico-	<i>plantarum</i>
Pipetas automáticas	Espectrofotómetro	Citrato de sodio	
Portaobjetos		(pH 3.8 : 0.1M)	
Petrifilm		Agua destilada	
Algodón			
Probetas			

### **Colocación del Bioconservante en las Leguminosas Liofilizadas**

**Tabla 3.** Instrumentos y equipos necesario para la bioconservación de las leguminosas liofilizadas.

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Frascos estériles	Cámara de flujo	Solución de	Leguminosas
Fundas de vacío metalizadas		bacterias (10 ml)	liofilizadas (100 g)

*Nota:* Se dejó a las leguminosas con la solución de bacterias durante 24 horas para posteriormente volver a liofilizar.

### **Alimento Funcional: Hamburguesa de res con Harina de Leguminosas Liofilizadas**

**Tabla 4.** Instrumento, equipos e ingredientes necesarios para la obtención de un Alimento Funcional a Base de Leguminosas Liofilizadas.

Insumos	Equipos	Ingredientes
Fundas de	Molino	Carne de res (225 g)

Insumos	Equipos	Ingredientes
plástico		
Marcador	Balanza	Tocino (112,5 g)
Vasos de plástico	Procesadora de alimentos	Proteína (Harinas liofilizadas con bacterias ácido lácticas 7,5 g)
	Sellador	Condimento de hamburguesa (7,5 g)
	Refrigeradora	Sal (1,87 g)
		Agua (60 g)
		Miga de pan (5,25 g)
		Humo líquido (1 g)
		Almidón de yuca (15 g)
		Cebolla en rama (7,5 g)
		Ajo en polvo (2,25 g)

### ***Análisis Fisicoquímicos de las Leguminosas Liofilizadas y las hamburguesas***

#### **Determinación de la Humedad.**

**Tabla 5.** *Instrumentos y equipos necesarios para determinar la humedad.*

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Pinza	Balanza		Soja amarilla
Crisoles de porcelana	analítica		pulverizada
Espátula	Estufa		Fréjol calima
Vasos de precipitación (20 ml)	Desecador		rojo pulverizada

Nota: Se describen los instrumentos y equipos necesarios para determinar la humedad tanto para las leguminosas liofilizadas como para las hamburguesas de res que es el producto final.

### Determinación de la Ceniza.

**Tabla 6.** Instrumentos y equipos necesarios para determinar la ceniza.

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Pinza	Balanza	Agua	Soja amarilla
Vasos de precipitación (20 ml)	analítica	destilada	pulverizada
Crisoles de porcelana	Mufla		Fréjol calima
Espátula	Estufa		rojo pulverizada
	Desecador		

Nota: Se describen los instrumentos y equipos necesarios para determinar de la ceniza tanto para las leguminosas liofilizadas como para el producto final.

### Evaluación del Porcentaje de Grasa.

**Tabla 7.** Instrumentos y equipos necesarios para determinar el porcentaje de grasa.

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Probeta (100 ml)	Extractor de	Éter etílico	Soja amarilla
Vaso de precipitación (50 ml)	grasa	Agua	pulverizada
Mortero	Balanza	destilada	Fréjol calima
Pisetas	analítica		rojo pulverizada
Pipetas	Estufa		
Papel filtro	Desecador		
Algodón			
Dedal			

Nota: Se describen los instrumentos y equipos necesarios para determinar de la ceniza tanto para las leguminosas liofilizadas como para el producto final a partir del método Soxhlet, de la guía de laboratorio de Sánchez, S (2020).

### Determinación del Porcentaje de Proteína.

**Tabla 8.** Instrumentos y equipos necesarios para determinar el porcentaje de proteína.

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
---------	---------	-----------	---------

Tubos de ensayo de digestión	Balanza analítica	Ácido sulfúrico 96% - 10 ml	Leguminosas 0,5 g
Gotero	Unidad	Hidróxido de sodio	
Mortero	digestora	40% -30ml	
Matraz Erlenmeyer	Plancha de calentamiento	Ácido bórico 2%-50 ml	
Vaso de precipitación (50 ml)	o	Ácido clorhídrico 0.1 N	
Bureta		Agua destilada	
Soporte universal			

Nota: Se describen los instrumentos y equipos necesarios para determinar de proteína tanto para las leguminosas liofilizadas como para el producto final.

#### Evaluación de la Acidez.

**Tabla 9.** Instrumentos y equipos necesario para determinar la acidez.

Insumos/Equipos	Reactivos	Concentración de muestra	Concentración de reactivo
Pipeta volumétrica	Agua destilada	-	-
Bureta	Solución de hidróxido de sodio (NaOH)	-	0,1N
Erlenmeyer	Fenolftaleína	-	1%
Agitador magnético	Harinas vegetales	10g	-
	Solución de ácido clorhídrico (HCl)	100 ml	0,1N

Nota: Se describen los instrumentos y equipos necesarios para determinar de la acidez tanto para las leguminosas liofilizadas como para el producto final.

### **Análisis del pH.**

**Tabla 10.** *Equipos e insumos necesarios para determinar el pH.*

<b>Insumos</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Probeta (100 ml)	Potenciómetro	Agua destilada	Leguminosas
Vaso de precipitación (10 ml)			

Nota: Se describen los instrumentos y equipos necesarios para determinar del pH tanto para las leguminosas liofilizadas como para el producto final.

### **Evaluación de las Propiedades Microbiológicas de las Hamburguesas**

**Tabla 11.** *Instrumentos y equipos necesarios para determinar las propiedades microbiológicas.*

<b>Insumos</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Mechero	Incubadora	Agua destilada	Producto
Tubos de ensayo	Vórtex	Peptona	final 20 g
Pipetas automáticas			
Petrifilm			
Funda plástica			

Nota: Se determinó con petrifilm la carga microbiológica de aerobios, enterobacterias y coliformes del producto final (hamburguesas)

## **Métodos**

### ***Liofilización de las Leguminosas***

El proceso de liofilización de harina de soja amarilla y frejol rojo, se inició con la obtención de las mejores leguminosas de soja amarilla y frejol rojo Calima, las cuales fueron adquiridas en bolsas selladas de un mercado local. Estas leguminosas se colocaron en papel absorbente y se dejaron secar, posteriormente con ayuda de un molino se procedió a pulverizar aproximadamente 907,185 g de cada una de las leguminosas, para obtener un polvo fino. Posteriormente, fueron llevadas al proceso de liofilización en balones del liofilizador. En el caso de la harina de frejol rojo, se liofilizaron en 8 balones con pesos individuales de 110.407 g, 110.807 g, 110.33 g, 112.78 g, 112.112 g, 110.003 g, 109.733 g, 111 g y 221 g, sumando un peso total de 887,393 g. En cuanto a la soja amarilla, el proceso fue similar, utilizando 8 balones con pesos individuales de 82.304 g, 100.158 g, 80.634 g, 83.353 g, 83.353 g, 82.384 g, 84.297 g, 82.00 g y 184.00, g peso total de 678,667. La liofilización contribuyó a la conservación de las leguminosas al eliminar el agua de manera controlada.

### ***Preparación del Bioconservante***

#### **Preparación de Inoculo Inicial y Obtención de la Solución Bacteriana**

Se pesaron 110,3 g de caldo MRS con ayuda de una balanza analítica, y se colocó en 2 L de agua destilada, se dejó reposar durante 5 minutos, se calentó con agitación en una plancha de calentamiento por 2 minutos, se distribuyó el medio en matraces Erlenmeyer y se autoclavó a 121 °C durante 15 minutos. Una vez esterilizado el medio se dejó enfriar.

A partir de viales aislados de *Limosilactobacillus reuteri* y *Lactiplantibacillus plantarum*, se procedió a inocular 3 veces con un asa esterilizada al caldo MRS con cada una de las bacterias que contenían los tubos eppendorf de 1,5 ml dentro de la cámara de flujo laminar, se tapó con algodón y Parafilm cada uno de los matraces Erlenmeyer que contenían el caldo MRS



con las bacterias inoculadas y se incubaron durante 24 horas a 37°C, posteriormente, se midió la absorbancia.

Para la obtención de la solución bacteriana, pasado las 24 horas de incubación, se centrifugó el caldo MRS, se descartó el sobrenadante y se conservó el sedimento. A continuación, se preparó una solución tampón de ácido cítrico-citrato de sodio con las siguientes proporciones: 1270 ml de agua destilada y 24,40 g de ácido cítrico, así como 730 ml de agua destilada y 18,34 g de citrato de sodio. Posteriormente, los tubos que contenían el sedimento bacteriano se lavaron meticulosamente tres veces con 5 ml de la solución tampón preparado. Después de cada lavado, se procedió a centrifugar los tubos a 10 000 rpm por 15 minutos, asegurándose de que la solución estuviera completamente clara al finalizar este paso. En el tercer lavado, las bacterias fueron resuspendidas en la misma solución tampón, manteniendo una proporción de 1:1 v/v.

#### ***Colocación del Bioconservante en las Leguminosas Liofilizadas***

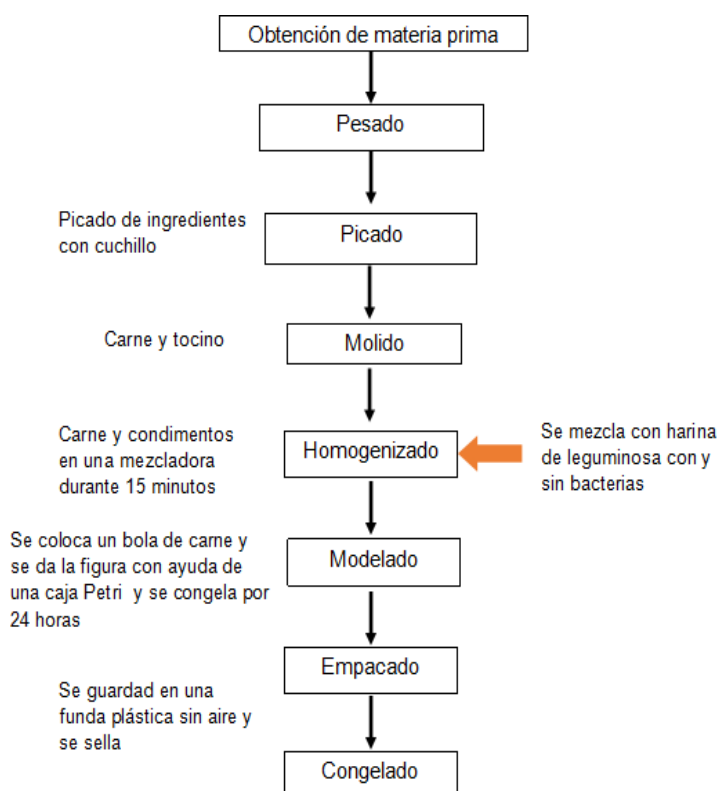
Se roció 10 ml de solución bacteriana de *Limosilactobacillus reuteri* en 100 g de harina de soya amarilla. Esta mezcla fue transferida a frascos estériles y se dejó reposar durante 24 horas. De manera similar, se repitió el procedimiento utilizando 100 g de harina de soya, pero esta vez se mezcló con 10 ml de *Lactiplantibacillus plantarum*. Transcurrido las 24 horas, las mezclas resultantes se sometieron al proceso de liofilización. Este mismo procedimiento se replicó con 100 g de harina de frejol, tanto con *Limosilactobacillus reuteri* como con *Lactiplantibacillus plantarum*, seguido de la liofilización. El resultado fue la obtención de leguminosas liofilizadas impregnadas con el bioconservante.

#### ***Alimento Funcional: Hamburguesa de res con Harina de Leguminosas Liofilizadas***

Se llevó a cabo el pesado de la carne de res, tocino, proteína (harinas de leguminosas liofilizadas con bacterias ácido lácticas y sin bacterias ácido lácticas), condimento de hamburguesa, sal, agua, miga de pan, humo líquido, almidón de yuca, cebolla en rama y ajo en polvo, con los siguientes gramajes respectivos: 225 g, 112.5 g, 7.5 g, 7.5 g, 1.87 g, 60 g, 5.25

g, 1 g, 15 g, 7.5 g y 2.25 g. Posteriormente, se homogenizó la carne y los condimentos en una mezcladora durante 15 minutos. Las hamburguesas fueron formadas con ayuda de una caja Petri y se dejaron en congelación durante 24 horas. Finalmente, se realizó el empacado del producto resultante.

**Figura 2.** Diagrama de proceso para la elaboración de hamburguesa de res



### ***Evaluación de las Propiedades Microbiológicas de las Hamburguesas***

Para la determinación de aerobios mesófilos, se cogió 2 g de muestras de carne de hamburguesa que contenían la proteína de las leguminosas con y sin bacterias lácticas, fueron diluidas en 18 ml de solución Peptonada, se mezcló en vórtex y obtuvo la solución madre. Se realizó una dilución de  $A^{-1}$  (dilución 1 a 10), 1 ml de solución madre y 9 ml de agua Peptona. Se depositó en la placa Petrifilm, llevándola a incubar a 48 horas a  $38^{\circ}\text{C}$ , para luego, por medio de un contador de colonias hacer el conteo de las colonias. Se reportaron los resultados en UFC por gramo de alimento. El mismo proceso se aplicó para enterobacterias y coliformes, pero se

realizó soluciones seriadas con factor de 10 de permitiendo que la serie de diluciones sea de: 1/10 ( $A^{-1}$ ), 1/100 ( $A^{-2}$ ), 1/1000 ( $A^{-3}$ ). La solución 1/1000 ( $A^{-3}$ ) se colocó en el Petrifilm durante 72 horas a temperatura ambiente. Para el cálculo del número de microorganismos se utilizó la ecuación 1 preestablecida:

**Ecuación 1.** *Educación para la determinación de unidades formadoras de colonias*

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{n * f}{v}$$

Donde:

n= número de colonias por placa

f= factor de dilución

v= volumen inoculado en la placa

Este proceso se lo realizó tanto para las hamburguesas que tenían harina de leguminosa con *Limosilactobacillus reuteri*, como hamburguesas con harina de leguminosa con *Lactiplantibacillus plantarum* y para las hamburguesas que tenían harina de leguminosa sin microorganismos.

### ***Análisis Fisicoquímicos de las Leguminosas Liofilizadas y Producto Final***

#### **Determinación de la Humedad.**

Se calentó el crisol de porcelana donde se colocó la muestra en la estufa durante 30 minutos, se dejó enfriar y con ayuda una balanza analítica se pesó el crisol vacío. A continuación, se encendió la balanza y se pesó 2 g de la harina de leguminosa liofilizada homogenizada. El crisol con la muestra se colocó dentro de la estufa a 130°C durante dos horas, tras este período, se enfrió el crisol con la muestra en el desecador durante 30 minutos y se volvió a pesaron. Con cada harina de leguminosa se realizó el procedimiento por triplicado. Los cálculos para determinar el contenido de humedad se llevaron a cabo aplicando la ecuación 1 correspondiente:

**Ecuación 2.** *Porcentaje de humedad para las harinas*

$$\text{Porcentaje de humedad (H\%)} = \frac{W_2 - W_1}{W_0} \times 100$$

Donde:

$W_0$  = Peso de la Muestra (g.)

$W_1$  = Peso del crisol más la muestra después del secado.

$W_2$  = Peso del crisol más la muestra antes del secado

Porcentaje de material seca (MS%) = 100 – Humedad Total (HT)

Para el producto final en la determinación de humedad, se procedió como la metodología de las leguminosas liofilizadas, pero se pesaron 10 g de carne de hamburguesa, los cuales se extendieron uniformemente en una cápsula de porcelana. Posteriormente, la muestra se sometió a un proceso de secado en una estufa a 100°C por un período de 24 horas, con el cuidado de evitar un exceso de secado que pudiera llevar a la volatilización de otros compuestos. Transcurrido este tiempo, la cápsula con la muestra se colocó en un desecador durante 30 minutos para garantizar condiciones ambientales estables. Finalmente, se procedió a pesar nuevamente la muestra y se informó el porcentaje de humedad, con la ecuación 3:

**Ecuación 3.** *Porcentaje de humedad para productos cárnicos*

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M}$$

Dónde:

$M_1$  = Peso de la cápsula antes de ingresar a la estufa

$M_2$  = Peso de la cápsula después de la estufa.

$M$  = Peso de la cápsula vacía.

#### **Determinación de la Ceniza.**

La determinación se llevó a cabo por duplicado sobre la misma muestra previamente preparada. En primer lugar, se procedió a lavar y secar el crisol de porcelana en la estufa, ajustada a 100°C durante 30 minutos. Posteriormente, se dejó enfriar en el desecador y se pesó. Acto seguido, sobre el crisol, se dispusieron alrededor de 2 g de muestra. Para evitar

pérdidas por proyección de material, el crisol con su contenido se colocó cerca de la puerta de la mufla abierta durante unos minutos antes de ser introducido a  $600^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Se mantuvo en la mufla hasta obtener cenizas libres de partículas de carbón, lo cual se logró después de aproximadamente 3 horas. Finalmente, se retiró el crisol con las cenizas, se dejó enfriar en el desecador y se pesó.

Los cálculos para determinar la ceniza se lograron aplica la ecuación 4:

**Ecuación 4.** *Determinación del porcentaje de ceniza.*

$$\text{Porcentaje de ceniza (C\%)} = \frac{W_2 - W_1}{W_0} \times 100$$

Donde:

$W_0$  = Peso de la Muestra (g)

$W_1$  = Peso del crisol vacío.

$W_2$  = Peso del crisol más la muestra calcinada

Para determinar la ceniza en el producto final, se realizó el mismo procedimiento descrito para leguminosas liofilizadas.

#### **Evaluación del Porcentaje de Grasa.**

Se pesó primero los vasos que se iban a utilizar, posteriormente se pesó 5 g de la muestra triturada. La muestra pesada fue colocada en un papel filtro y dispuesta en un dedal. Se colocó algodón sobre la muestra y el dedal se ubicó en el extractor de grasa. Se procedió a verter 50 ml de éter etílico en el vaso del extractor de grasa y se encendió y calibró la máquina. Acto seguido, el dedal fue sumergido en el éter etílico, se bajó la palanca y se contabilizaron los procesos a diferentes temperaturas, siendo  $90^{\circ}\text{C}$  durante la mayor parte del procedimiento y  $60^{\circ}\text{C}$  en una etapa específica. Luego, se movió la palanca a la posición "W" y posteriormente a "R", cerrando la válvula. Finalmente, los vasos de la extractora se colocaron en una estufa a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos para completar el proceso de extracción.

Los cálculos para determinar el porcentaje de grasa se obtuvieron aplicando la ecuación 5:

**Ecuación 5. Determinación del porcentaje de grasa**

$$\text{Porcentaje de grasa (G\%)} = \frac{W_2 - W_1}{W_0} \times 100$$

Donde:

$W_0$  = Peso de la Muestra (g.)

$W_1$  = Peso del crisol vacío.

$W_2$  = Peso del crisol más la muestra

Para el caso del producto final la determinación del porcentaje de grasa, se hizo de la misma forma que el procedimiento descrito para leguminosas liofilizadas

**Determinación del Porcentaje de Proteína.**

Primero se llevó a cabo la etapa de digestión, se pesó aproximadamente 0,3 g de la muestra preparada sobre un papel exento de nitrógeno, colocándola en el microtubo digestor. Se añadió al microtubo una tableta catalizadora y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, y se ubicaron los tubos de digestión en el block-digest con el colector de humos en funcionamiento. La digestión se llevó a cabo a una temperatura de 420°C durante 30 minutos. Al concluir, el líquido resultante presentaba un color azul transparente.

Posteriormente, la muestra se enfrió a temperatura ambiente, evitando la precipitación mediante agitación ocasional. Seguido de la etapa de destilación, donde se adicionaron 10 ml de agua destilada a cada microtubo, y se colocaron tanto el microtubo como el matraz de recepción con 50 ml de ácido bórico al 2% en el sistema de destilación. Se encendió el sistema, se añadieron 30 ml de hidróxido de sodio al 40%, asegurando un flujo normal de agua, y se recogieron aproximadamente 200 ml de destilado antes de retirar los accesorios y apagar el sistema.

Por último, en la fase de titulación, se agregaron tres gotas de indicador al destilado recogido en el matraz, y se tituló con ácido clorhídrico 0.1 N utilizando un agitador mecánico, registrando el volumen de ácido consumido como parte del proceso analítico.

Para determinar el contenido de proteína se utiliza la ecuación 6:

**Ecuación 6. Determinación del porcentaje de proteína bruta**

$$\text{Porcentaje proteína bruta (PB\%)} = \frac{(\text{VHCl}) - 1.401 * \text{NHCl} * F}{\text{gr muestra}}$$

Donde:

1.401= Peso atómico del nitrógeno

NHCl= Normalidad de Ácido Clorhídrico 0.1 N

F = Factor de conversión (6.25)

VHCl = Volumen del ácido clorhídrico consumido en la titulación

Vb = Volumen del Blanco (0.3)

**Evaluación de la Acidez.**

Para la haría de leguminosa liofilizada se pesó 5 g en matraz Erlenmeyer de 100 ml, y a continuación se colocó gradualmente 50 ml de alcohol de 90% (V/V) neutralizado, se tapó el matraz Erlenmeyer y se agitó vigorosamente. El sistema se dejó en reposo durante 24 horas, agitándolo de manera intermitente. Luego, se tomó una alícuota de 10 ml del líquido claro sobrenadante con una pipeta, y se añadió 2 ml de la solución indicadora de fenolftaleína. Se procedió a agregar gradualmente, con agitación, la solución 0,02 N de NaOH hasta lograr un color rosado que desaparecía poco a poco. La adición de la solución continuó hasta que el color rosado persistió durante 30 segundos. Finalmente, se leyó en la bureta el volumen de solución empleada.

La acidez se calculó mediante la ecuación 7:

**Ecuación 7. Determinación de acidez**

$$\text{Acidez} = \frac{490 \text{ NV}}{m(100 - H)} \times \frac{V_1}{V_2}$$

Donde:

N= normalidad de la solución de NaOH

V= volumen de la solución de NaOH usada en la titulación

V<sub>1</sub>= volumen de alcohol empleado

V<sub>2</sub>= volumen de la alícuota tomada para la titulación

m= masa de muestra en g

H= porcentaje de humedad de la muestra

Para el producto final la acidez se midió a partir de 10 g de carne, los cuales fueron colocados en un vaso de licuadora, junto con 200 ml de agua destilada, para posteriormente ser licuados. La muestra resultante fue filtrada a través de un lienzo con el propósito de eliminar el tejido conectivo, y el filtrado se transfirió a un matraz de 250 ml, aforándolo con agua destilada. De esta solución, se tomó una alícuota de 25 ml y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 150 ml.

Se añadieron 75 ml de agua destilada y cinco gotas de fenolftaleína. La titulación con NaOH 0,01 N se llevó a cabo, y esta determinación se realizó en triplicado para asegurar la precisión de los resultados. Además, se preparó un blanco utilizando 100 ml de agua destilada, al cual se le añadieron cinco gotas de fenolftaleína y se procedió a titular. Finalmente, los resultados se informaron como porcentaje de ácido láctico de acuerdo a la ecuación 8:

**Ecuación 8.** *Porcentaje de ácido láctico*

$$\text{Ácido Láctico \%} = \frac{V_{NaOH} * N_{NaOH} * Meq_{\text{ácido láctico}} * \text{Factor de dilución}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

Donde:

$M_{eq} = 0,01$

Factor de dilución=0,09

### **Análisis del pH.**

Se procedió a pesar 10 g de leguminosa liofilizada, primero la del frejol y después de soja, la muestra se colocó en el vaso de precipitación. Se agregaron 100 ml de agua destilada, previamente hervida y enfriada, y se agitó durante 30 minutos a una temperatura de 25°C. Pasado los 30 minutos se paró la agitación y se insertaron los electrodos del potenciómetro en el vaso de precipitación con la muestra, cuidando de que no hicieran contacto con las paredes del recipiente ni con las partículas sólidas presentes.



Para el producto final en cambio se llevó a cabo el pesaje de 10 g de muestra, seguido por la adición de 100 ml de agua destilada y se licuó la mezcla durante 1 minuto. La mezcla resultante se filtró a través de un lienzo y finalmente se llevó a cabo la determinación del pH introduciendo el potenciómetro en el filtrado resultante. Cada lectura se la realizó por duplicado

***Diseño experimental aplicado a la investigación para la obtención de un alimento funcional, a base de leguminosas y con la adición de bacterias ácido lácticas,***

El presente estudio se realizó mediante la aplicación de un ANOVA con modelo bifactorial (AxB DBCA), para establecer los parámetros en la obtención de un alimento con propiedades funcionales.

**Análisis funcional**

Se aplica la prueba de Tukey al 5% para evaluar la significancia estadística de los resultados obtenidos en los análisis fisicoquímicos y microbiológicos. La prueba de Tukey permite determinar la significancia estadística de los factores A (tipo de leguminosa) y B (cepas de bacterias ácido lácticas), así como su interacción, en los resultados obtenidos para cada variable medida.

**Variables a medir**

- Contenido de Humedad
- Contenido de Ceniza
- Porcentaje de grasa
- Concentración de proteínas
- Acidez titulable
- pH
- Contenido de indicadores de contaminación

### **Factores y Niveles para el Estudio**

Los análisis fisicoquímicos se realizan de la harina de los dos tipos de leguminosas y del alimento funcional suplementado con la harina de leguminosa inoculada con las bacterias ácido láctico. Los valores obtenidos en los análisis se compararon con los estándares de calidad establecidos en la norma INEN correspondiente.

**Tabla 12.** Factores y niveles del proyecto para probar los tipos de leguminosa, el tipo de bacteria ácido láctica, la concentración de bacterias ácido lácticas y el tiempo de fermentación.

<b>Factores</b>	<b>Niveles</b>
Tipo de leguminosa (A)	A1: Frijol calima rojo A2: Soya Amarilla
Tipo de cepa de bacterias ácido lácticas (B)	B1: <i>Lactobacillus reuteri</i> B2: <i>Lactobacillus plantarum</i> B3: Sin Microorganismos

### **Interacción de los Tratamientos de Estudio**

**Tabla 13**

Factores y niveles del proyecto evalúa la combinación de distintos tipos de leguminosas liofilizadas y cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un alimento funcional

<b>Tratamiento</b>	<b>Interacción</b>	<b>Combinación</b>
T1	A1B1	Frijol calima rojo + <i>Lactobacillus reuteri</i>
T2	A1B2	Frijol calima rojo + <i>Lactobacillus plantarum</i>
T3	A1B3	Frijol calima rojo + Sin Microorganismos
T4	A2B1	Soya amarilla + <i>Lactobacillus reuteri</i>
T5	A2B2	Soya amarilla + <i>Lactobacillus plantarum</i>
T6	A2B3	Soya amarilla + Sin Microorganismos

### **Modelo Matemático del Modelo Experimental Bifactorial (A\*B)**

$$y_{ijk} = \mu + A_i + \beta_j + (A\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

$\mu$  = media global

$A$  = efecto del nivel  $i$ -ésimo del factor A (tipo de leguminosa liofilizada)

$\beta$  = efecto del nivel  $j$ -ésimo del factor B (cepas de bacterias ácido lácticas)

$(A\beta)_{ij}$  = efecto de la interacción doble del factor A por el factor B

$\varepsilon_{ij}$  = error aleatorio

$k$  = número de replicaciones del experimento

El modelo matemático establecido permite analizar los efectos de los factores A (tipo de leguminosa) y B (cepas de bacterias ácido lácticas), así como su interacción, en la respuesta obtenida. Los resultados obtenidos se compararon con los estándares de calidad establecidos en la norma INEN correspondiente para determinar la idoneidad del alimento funcional producido.

### **Repeticiones**

En los análisis de crecimiento de microorganismos se realizaron tres repeticiones.

### **Análisis Estadístico**

En ambos casos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar la variabilidad en los resultados obtenidos y la significancia estadística de los factores evaluados. Los factores A y B corresponden al tipo de leguminosa y cepas de bacterias ácido lácticas utilizados en el alimento funcional producido, respectivamente, mientras que la interacción A\*B corresponde al efecto conjunto de ambos factores. Las réplicas corresponden al número de veces que se realizó el experimento para asegurar la reproducibilidad de los resultados. El error experimental se refiere a la variación aleatoria que no puede explicarse por los factores

evaluados en el estudio. Los resultados obtenidos se compararon con los estándares de calidad establecidos en la norma INEN correspondiente para determinar la idoneidad del alimento funcional producido.

**Tabla 14.** *Análisis de varianza (AxB)*

<b>Fuentes de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>
Tipo de leguminosa (A)	1
Cepas de bacterias ácido lácticas (B)	2
Interacción A*B	2
Réplicas	2
Error experimental	12
<b>Total</b>	<b>19</b>

#### 4. Resultados y Discusión

##### Resultado del Análisis Físicoquímicos de las Leguminosas Liofilizadas

**Tabla 15.** *Propiedades físicoquímicas de las leguminosas liofilizadas*

Leguminosa	pH	Acidez	Humedad	Grasa	Proteína	Ceniza
Frijol calima rojo	6,54	0,228	0,617	2,77	84,41	5,23
Soya Amarilla	6,61	0,301	2,95	48,4	83,85	5,85

En la tabla 15 se muestran los resultados de los análisis físicoquímicos de la harina de frijol rojo y soya amarilla. En el caso del frijol calima rojo se presentó un pH de 6,54, una baja acidez de 0,228, y contenidos relativamente bajos de humedad (0,617), grasa (2,77), proteína (84,41), y ceniza (5,23). En contraste, con la soya amarilla que exhibo un pH ligeramente superior con valor de 6,61, una acidez más elevada de 0,301, y notables diferencias en humedad (2,95), grasa (48,4), proteína (83,85), y ceniza (5,85). Comprando con la normativa NTE INEN 616:2015 donde la acidez para harinas de origen vegetal mínimo es de 0,02, y tomando en cuenta la Norma Técnica Colombiana 1241 (2007) donde el pH máximo es de 9 para harinas, los resultados encontrados en esta investigación se encuentran dentro de los parámetros normales.

La humedad, grasa y ceniza de acuerdo a la NTE INEN 616:2015 es máximo de 14,50, 2,00 y 0,80 respectivamente, la norma también indica que el valor mínimo de proteína es de 7. De acuerdo a esto los resultados de esta investigación están dentro de los parámetros normales salvo por la grasa y la ceniza donde tanto para el frijol como para la soya los valores son altos, lo que puede indicar un alto contenido de minerales. Así mismo comparando con el estudio de Bach (2021), donde la humedad de la harina de frejol fue de 12,11%, la cantidad de proteína fue 13,83%, grasa 4,80 %, ceniza 2,76, pH 6,83 y acidez de 0,31, se puede ver que los valores varían con los reportados en la tabla 15, esta diferencia se explica por el proceso de

secado, y el contenido nutricional de cada uno de las leguminosas que puede cambiar dependo del lugar y de la nutrición que se dé a la planta. En general Jiménez, (2007) nos dice que la semilla de la soya es una semilla oleaginosa cuya composición consta de un 40% proteína, 18% grasa y 20% carbohidratos, mientras que la del frejol pose entre 20 a 25% de proteína, grasa 5% aproximadamente y alrededor del 60 a 70% de carbohidratos, por lo que el contenido nutricional de cada leguminosa puede ir variando entre estos porcentajes.

### **Análisis de Varianza para las Variables a Evaluar de Alimento Funcional: Hamburguesa**

#### ***Análisis de Varianza para la Variable pH.***

**Tabla 16.** *Análisis de la varianza para pH*

<b>FV</b>	<b>GI</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Leguminosa	1	0,0102722	0,0102722	62,05	0,0000
B:Bacteria	2	0,0161778	0,00808889	48,86	0,0000
C:Réplica	2	0,000211111	0,000105556	0,64	0,5488
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	2	0,0509778	0,0254889	153,96	0,0000
ERROR EXPERIMENTAL	10	0,00165556	0,000165556		
TOTAL (CORREGIDO)	17	0,0792944			

De los resultados obtenidos del análisis de varianza de la variable pH (Tabla 16), se observó que en: tipo de leguminosa (Factor A), Bacteria (Factor B), y la Interacción (A\*B) existe diferencia significativa, sin embargo, en las repeticiones no hay diferencia significativa.

**Análisis de Varianza para la Variable Acidez.**

**Tabla 17.** Análisis de la varianza para la variable acidez

<b>FV</b>	<b>GI</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Leguminosa	1	0,0000565339	0,0000565339	48,99	0,0000
B:Bacteria	2	0,0000913744	0,0000456872	39,59	0,0000
C:Réplica	2	0,00000561444	0,00000280722	2,43	0,1377
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	2	0,000103361	0,0000516806	44,79	0,0000
ERROR EXPERIMENTAL	10	0,0000115389	0,00000115389		
TOTAL (CORREGIDO)	17	0,000268423			

De los resultados obtenidos del análisis de varianza de la variable acidez (Tabla 17), se observó que en: tipo de leguminosa (Factor A), Bacteria (Factor B), y la Interacción (A\*B) se determinó diferencia significativa, respecto a las repeticiones no hay diferencia significativa.

**Análisis de Varianza para la Variable Humedad**

**Tabla 18.** Análisis de la varianza para humedad.

<b>FV</b>	<b>GI</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Leguminosa	1	191,774	191,774	138,50	0,0000
B:Bacteria	2	104,3	52,1502	37,66	0,0000
C:Réplica	2	2,67488	1,33744	0,97	0,4135
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	2	199,21	99,6052	71,94	0,0000
ERROR EXPERIMENTAL	10	13,8463	1,38463		
TOTAL (CORREGIDO)	17	511,806			

De los resultados obtenidos del análisis de varianza de la variable humedad (Tabla 18), se observó que en: tipo de leguminosa (Factor A), Bacteria (Factor B), y la Interacción (A\*B) existe diferencia significativa, en cambio las repeticiones no hay diferencia significativa.

### **Análisis de Varianza para la Variable Grasa**

**Tabla 19.** Análisis de la varianza para la variable grasa

<b>FV</b>	<b>GI</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Leguminosa	1	30,6545	30,6545	1383,60	0,0000
B:Bacteria	2	74,0067	37,0033	1670,16	0,0000
C:Réplica	2	0,0203111	0,0101556	0,46	0,6450
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	2	4,59023	2,29512	103,59	0,0000
ERROR EXPERIMENTAL	10	0,221556	0,0221556		
TOTAL (CORREGIDO)	17	109,493			

De los resultados obtenidos del análisis de varianza de la variable grasa (Tabla 19), se observó que en: tipo de leguminosa (Factor A), Bacteria (Factor B), y la Interacción (A\*B) existe diferencia significativa, sin embargo, en las repeticiones no hay diferencia significativa.

### **Análisis de Varianza para la Variable Proteína**

**Tabla 20.** Análisis de la varianza para la variable proteína

<b>FV</b>	<b>GI</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Leguminosa	1	0,076115	0,076115	297,96	0,0000
B:Bacteria	2	0,0177674	0,00888368	34,78	0,0000



FV	GI	SC	CM	Razón-F	Valor-P
C:Réplica	2	0,00011449	0,000057245	0,22	0,8032
INTERACCIONES					
AB	2	0,0886759	0,044338	173,56	0,0000
ERROR EXPERIMENTAL	10	0,00255456	0,000255456		
TOTAL (CORREGIDO)	17	0,185227			

De los resultados obtenidos del análisis de varianza de la variable proteína (Tabla 20), se observó que en: tipo de leguminosa (Factor A), Bacteria (Factor B), y la Interacción (A\*B) se determinó diferencia significativa, respecto a las repeticiones no hay diferencia significativa.

#### ***Análisis de Varianza para la Variable Ceniza***

**Tabla 21.** *Análisis de la varianza para la variable ceniza*

FV	GI	SC	CM	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Leguminosa	1	1,37338	1,37338	1749,10	0,0000
B:Bacteria	2	0,0795381	0,0397691	50,65	0,0000
C:Réplica	2	0,00496478	0,00248239	3,16	0,0863
INTERACCIONES					
AB	2	1,62202	0,811009	1032,88	0,0000
ERROR EXPERIMENTAL	10	0,00785189	0,000785189		
TOTAL (CORREGIDO)	17	3,08775			

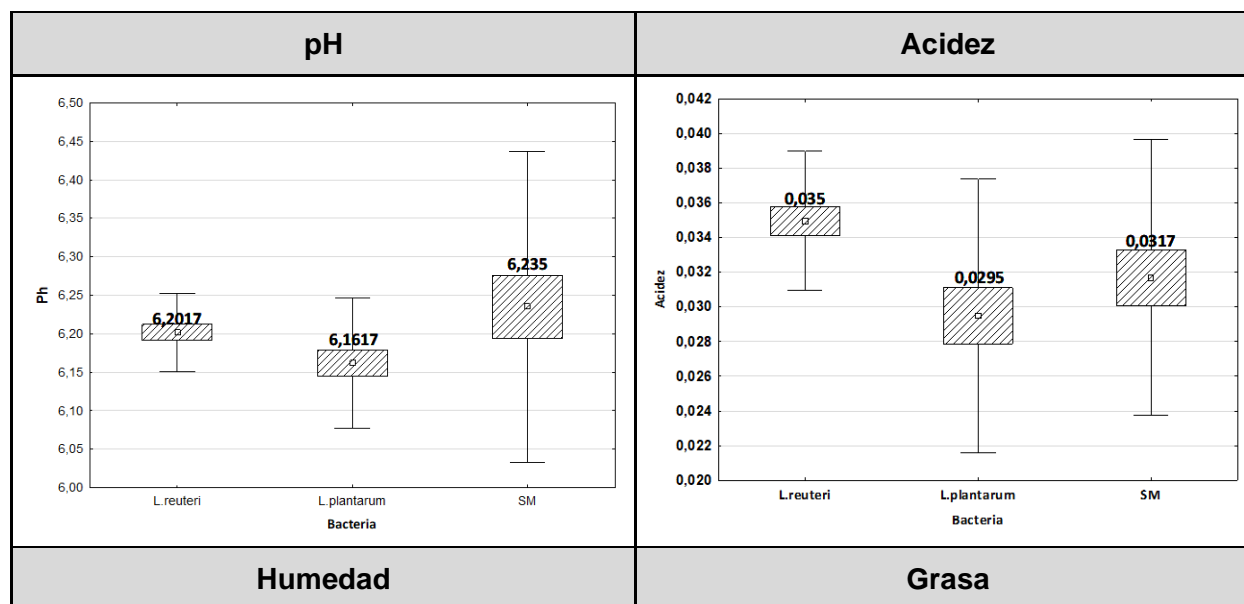
De los resultados obtenidos del análisis de varianza de la variable ceniza (Tabla 21), se observó que en: tipo de leguminosa (Factor A), Bacteria (Factor B), y la Interacción (A\*B) existe diferencia significativa, en cambio las repeticiones no hay diferencia significativa

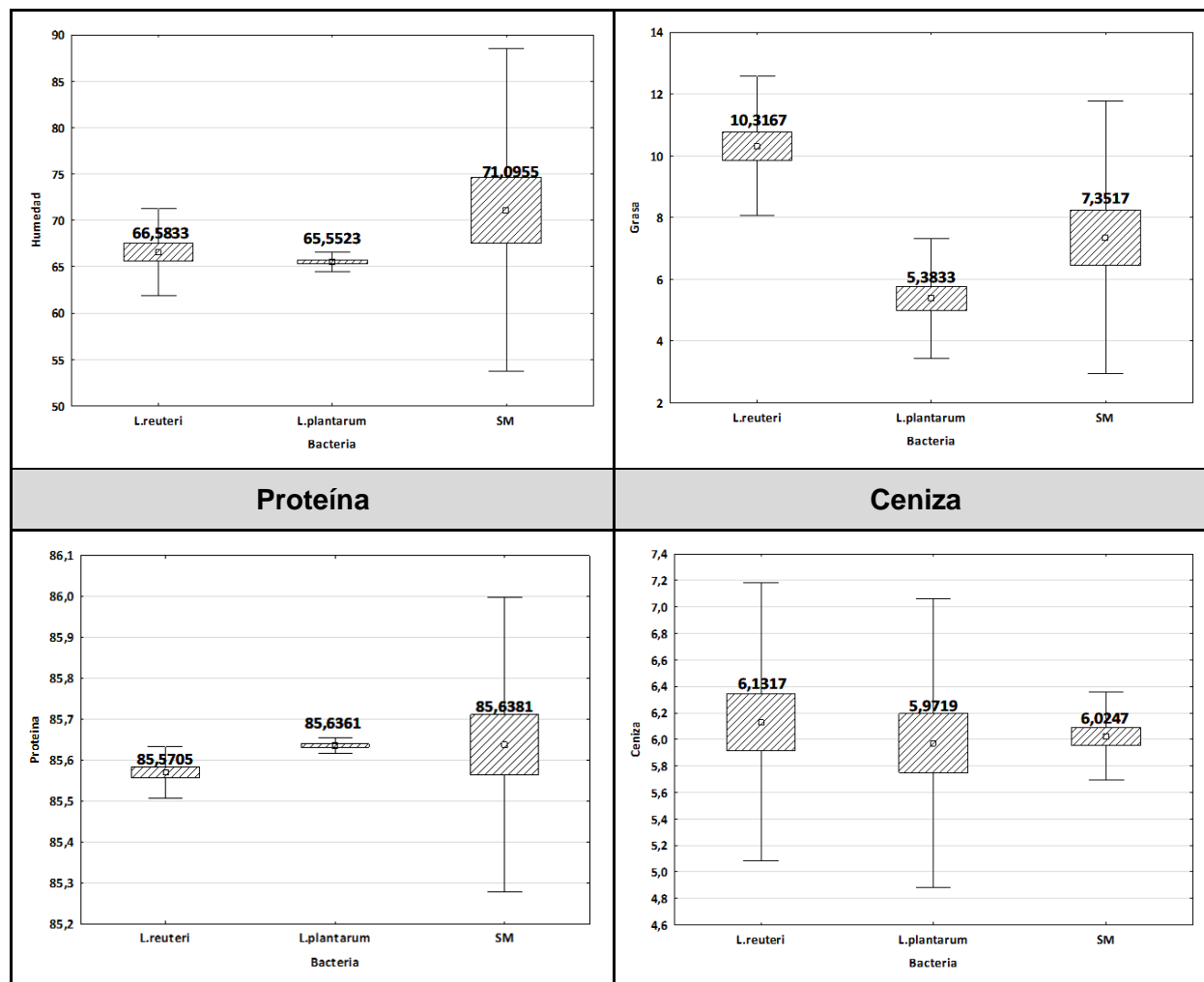
**Resultados de la factibilidad para la utilización de Tipos de Bacteria (*Limosilactobacillus reuteri* y *Lactiplantibacillus plantarum*). Factor B (Tukey  $p < 0.05$ )**

**Tabla 22.** Resumen de los valores estadísticos de la Prueba de significancia de Tukey para las variables estudiadas considerando dos tipos de bacteria (*Limosilactobacillus reuteri* y *Lactiplantibacillus plantarum*).

Tipo de bacteria	pH	Acidez	Humedad	Grasa	Proteína	Ceniza
B1: <i>L. Reuteri</i>	6,2017 <sup>A</sup>	0,035 <sup>A</sup>	66,5833 <sup>A</sup>	10,3167 <sup>A</sup>	85,5705 <sup>A</sup>	6,1317 <sup>A</sup>
B2: <i>L. Plantarum</i>	6,1617 <sup>B</sup>	0,0295 <sup>B</sup>	65,5523 <sup>B</sup>	5,3833 <sup>B</sup>	85,6361 <sup>B</sup>	5,9719 <sup>B</sup>
B3: SM	6,235 <sup>C</sup>	0,0317 <sup>C</sup>	71,0955 <sup>C</sup>	7,3517 <sup>C</sup>	85,6381 <sup>C</sup>	6,0247 <sup>C</sup>

**Figura 3.** Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Factor B: Tipo de bacteria)





La figura 4, muestra los valores de la prueba de significación Tukey ( $p < 0,05$ ) agrupados de las variables evaluadas correspondiente en la obtención de un alimento funcional para el factor B (Tipo de bacterias).

Se observó diferencia significativa en pH, donde se obtuvo el mayor contenido en el grupo B3: Sin Microorganismos (6,235 pH), mientras que el menor contenido fue dado por el grupo B2: *L.plantarum* (6,1617 pH). Si se compara estos resultados con el estudio de Khalili Sadaghiani et al.,(2019), donde se investigó el efecto de *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus plantarum* en los cambios químicos de la carne molida, y se reportó un pH en las muestras sin microorganismos de 5,7, mientras que en el caso *L. reuteri* fue de 5,3 y *L.plantarum* de 5,1, se puede afirmar que la presencia de bacterias BAL, genera una reducción el pH, debido a una

mayor producción de ácido láctico, como se observan en los resultados de este estudio (Parra Huertas, 2010). Las diferencias de pH dependiendo de las bacterias se explican debido al metabolismo de cada una de ellas. *L. reuteri* producen la enzima invertasa, por lo que el principal azúcar que consume es la sacarosa, además produce ácido láctico, ácido acético y reuteriicina, una molécula de ácido tetrámico (Britton, 2017), mientras que *L.plantarum* produce amilasa para hidrolizar el almidón en dextrina y finalmente en glucosa, produce compuestos aromáticos como el ácido aspártico y alcoholes de 4 carbonos y 6 carbonos (Y. Wang et al., 2021)

En cuanto a los resultados obtenidos en la variable acidez se observó el mayor contenido para el grupo B1: *L. reuteri* con 0,035 de acidez, en tanto se obtuvo 0,0295 de acidez para el grupo B2: *L.plantarum* siendo este el de menor contenido. Esto sucede debido a que, durante la fermentación, las BAL convierten los carbohidratos presentes en la carne en ácido láctico. Este ácido láctico no solo actúa como conservante natural, sino que también le confiere al producto un sabor característico y contribuye a su textura (Guergoletto et al., 2017). Se ha visto que, durante la fermentación, *L. reuteri* consume glucosa y fructosa, mientras que *L. plantarum* consume solo glucosa, *L. reuteri* consume rápido la glucosa y lentamente la fructosa mientras que *L. plantarum* disminuye gradualmente la glucosa, esta diferencia hace que varíe la producción de ácido láctico consiguiendo valores menores de ácido láctico al utilizar *L. plantarum* por lo que la acidez del medio es mayor al utilizar *L. reuteri* (Y. Wang et al., 2021).

En humedad, se observó mayor valor en el grupo B3: Sin Microorganismos (71,095%), con respecto a B2: *L.plantarum* (65,5523%). Estos resultados son parecidos a los reportados por El-Ghorab et al., (2014) donde la humedad varió de  $73,15\% \pm 1,22\%$  a  $66,13\% \pm 0,65\%$  en hamburguesas sin microorganismos y hamburguesas con microorganismos. Lo que sugiere que la presencia de microorganismos, está asociada con una disminución en el contenido de humedad en la muestra. En general, la utilización de bacterias BAL en carne puede tener

diferentes efectos en su contenido de humedad, dependiendo de varios factores, como los microorganismos utilizados, las condiciones de fermentación y la duración del proceso. Sin embargo, en muchos casos, puede conducir a una ligera disminución en el contenido de humedad. Ya que los microorganismos, como bacterias ácidas lácticas, pueden consumir parte del agua presente en la carne como parte del proceso metabólico. Esto puede resultar en una ligera reducción del contenido de humedad en comparación con la carne sin microorganismos. Como en se reportó en los estudios de (Zárate, 2020), donde la colocación de bacterias casi no afectó en la humedad de la carne haciendo que solo variara de 66,94% a 66,82% cuando se colocaban microorganismos.

En cuanto a la variable grasa se obtuvo mayor contenido en el grupo B1: *L. reuteri* (10,3167%), frente a B2: *L. plantarum* (5,3833%). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Rech de Marins et al., (2022) donde el porcentaje de grasa varió de 8,74% *L. plantarum* a 12,7% con otra bacteria ácido láctica. Esta diferencia en el porcentaje de grasa se debe a la lipólisis que de acuerdo a investigación puede variar de una bacteria a otra, en el caso de las bacterias ácido lácticas estas tienen una actividad lipolítica muy baja. Sin embargo, algunas investigaciones han determinado que *L. plantarum*, tienen una actividad lipolítica considerable (Dinçer & Kivanç, 2018)

Mientras que en la variable proteína, el mayor contenido fue dado por el grupo B3: Sin microorganismos (85,6381%), y el menor porcentaje fue para B1: *L. reuteri* (85,5705%). Esto se debe a que las bacterias al comenzar su proceso metabólico producen proteasas que degradan parcialmente algunas proteínas, además el proceso de aumento de pH hace que algunas proteínas de la carne sufran de desnaturalización (Kiczorowski et al., 2022). Las BAL ayudan en la degradación inicial de las proteínas al producir ácido y reducir el pH para mejorar la actividad de la cathepsina, por lo que las bacterias pueden hacer que exista una reducción ligera de proteínas en la carne (D. Wang et al., 2022). Como se determinó en el estudio de Rech de Marins et al., (2022), donde el porcentaje de proteína varió de 22,07 en la carne sin

microorganismos a 21,07 en carne con microorganismos. Aunque esto puede variar dependiendo del tipo de bacteria ya que no todas las bacterias producen proteasas o cambian el pH de la misma manera.

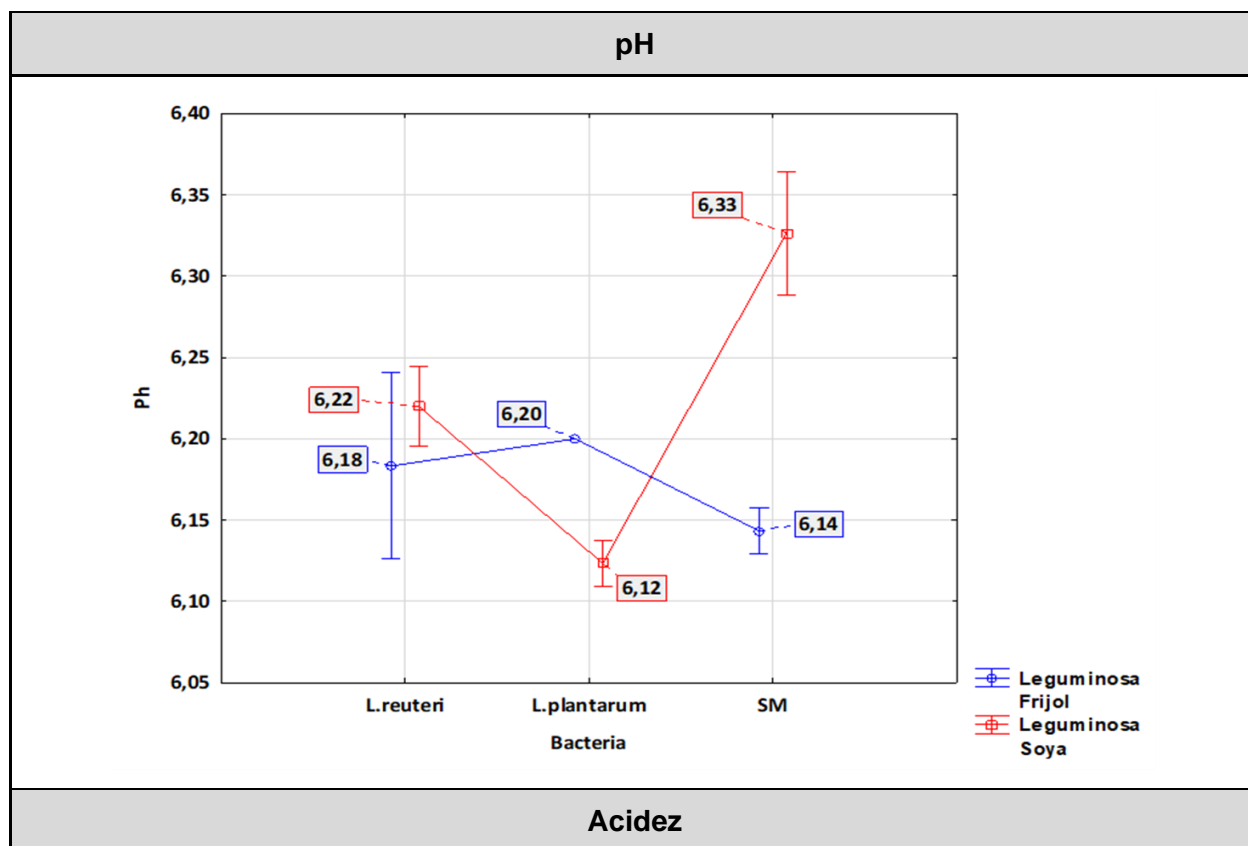
Por último, para la variable ceniza se observó el mayor contenido para el grupo B1: *L. reuteri* (6,1317%), y el menor contenido para el grupo B2: *L.plantarum* (5,9719%). De acuerdo a NTE INEN 1 338 el porcentaje de ceniza en alimentos crudos es máximo de 5%, por lo que el contenido de cenizas en este estudio excede la normativa. Esto se debe a los diferentes componentes de la hamburguesa ya que la ceniza está determinada por la cantidad de minerales. Estos pueden provenir de minerales contenidos en un ingrediente o de la adición de sales minerales que se producen durante el proceso de elaboración. En cambio, la disminución del contenido de cenizas está influenciada por el uso de minerales para mantener la vida de los microorganismos (Rodríguez-Salgado et al., 2019).

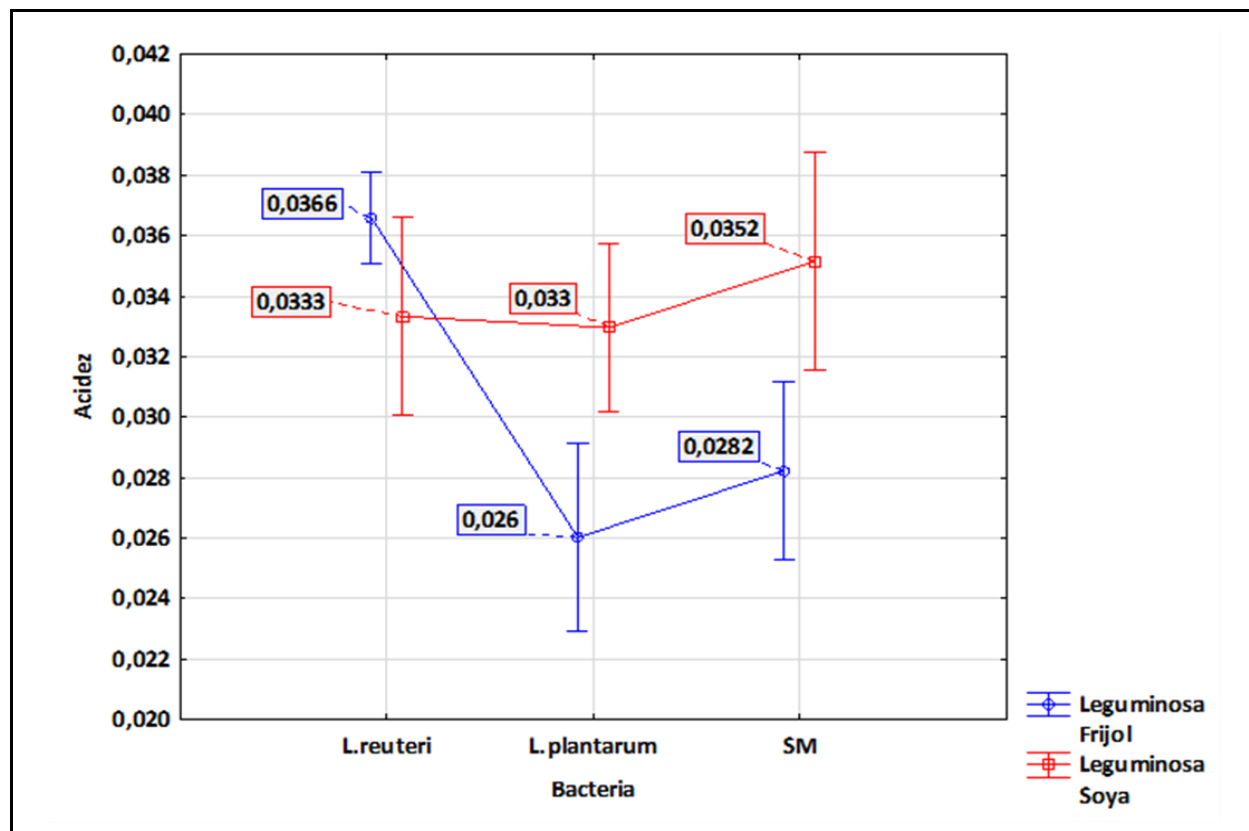
#### **Prueba de Significancia de Tukey Tipo de leguminosa\*Tipo de Bacteria (Interacción AB)**

**Tabla 23.** Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Interacción AB)

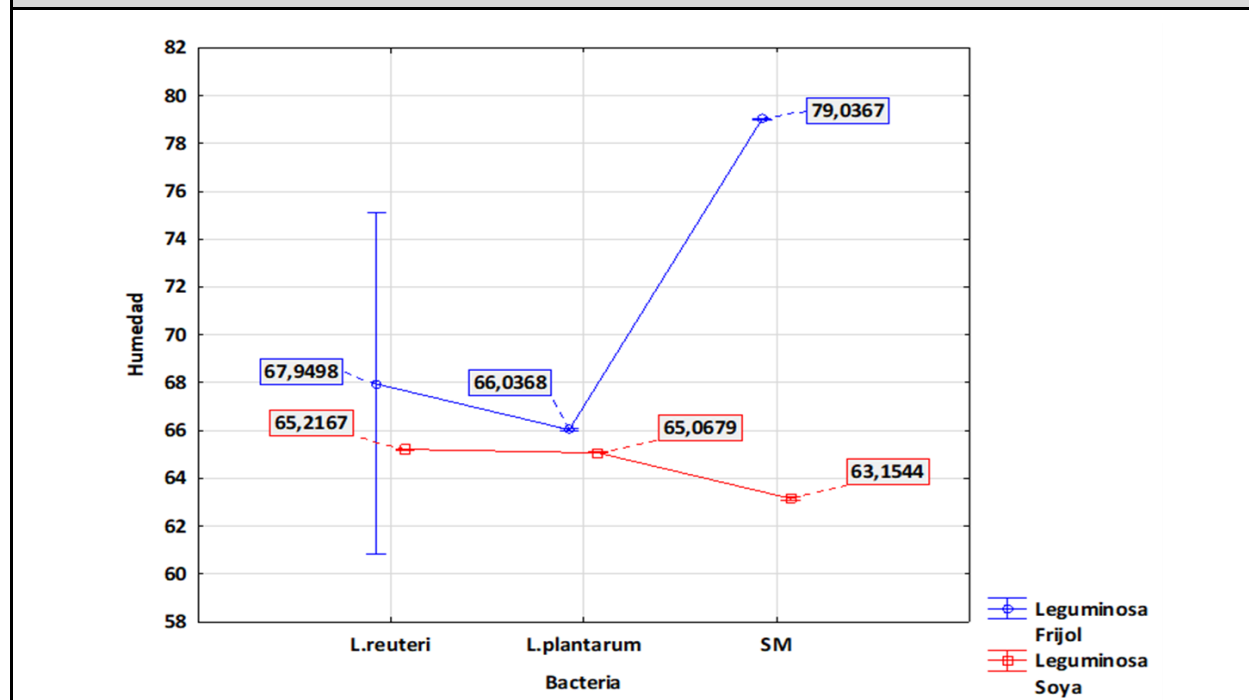
<b>Interacciones</b>	<b>pH</b>	<b>Acidez</b>	<b>Humedad</b>	<b>Grasa</b>	<b>Proteína</b>	<b>Ceniza</b>
A1B1: Frijol calima rojo + <i>Lactobacillus reuteri</i>	6,18 <sup>B</sup>	0,04 <sup>C</sup>	67,95 <sup>B</sup>	11,33 <sup>E</sup>	85,60 <sup>C</sup>	5,65 <sup>B</sup>
A1B2: Frijol calima rojo + <i>Lactobacillus plantarum</i>	6,20 <sup>BC</sup>	0,03 <sup>A</sup>	66,04 <sup>AB</sup>	6,27 <sup>C</sup>	85,64 <sup>C</sup>	5,47 <sup>A</sup>
A1B3: Frijol calima rojo +Sin Microorganismos	6,14 <sup>A</sup>	0,03 <sup>A</sup>	79,04 <sup>C</sup>	9,37 <sup>D</sup>	85,80 <sup>D</sup>	6,17 <sup>D</sup>
A2B1: Soya amarilla + <i>Lactobacillus reuteri</i>	6,22 <sup>C</sup>	0,03 <sup>B</sup>	65,22 <sup>AB</sup>	9,30 <sup>D</sup>	85,54 <sup>B</sup>	6,61 <sup>F</sup>
A2B2: Soya amarilla + <i>Lactobacillus plantarum</i>	6,12 <sup>A</sup>	0,03 <sup>B</sup>	65,07 <sup>AB</sup>	4,50 <sup>A</sup>	85,63 <sup>C</sup>	6,47 <sup>E</sup>
A2B3: Soya amarilla + Sin Microorganismos	6,33 <sup>D</sup>	0,04 <sup>BC</sup>	63,15 <sup>A</sup>	5,34 <sup>B</sup>	85,47 <sup>A</sup>	5,88 <sup>C</sup>

**Figura 4.** Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Interacción AB: Tipo de leguminosa\*tipo de bacteria)



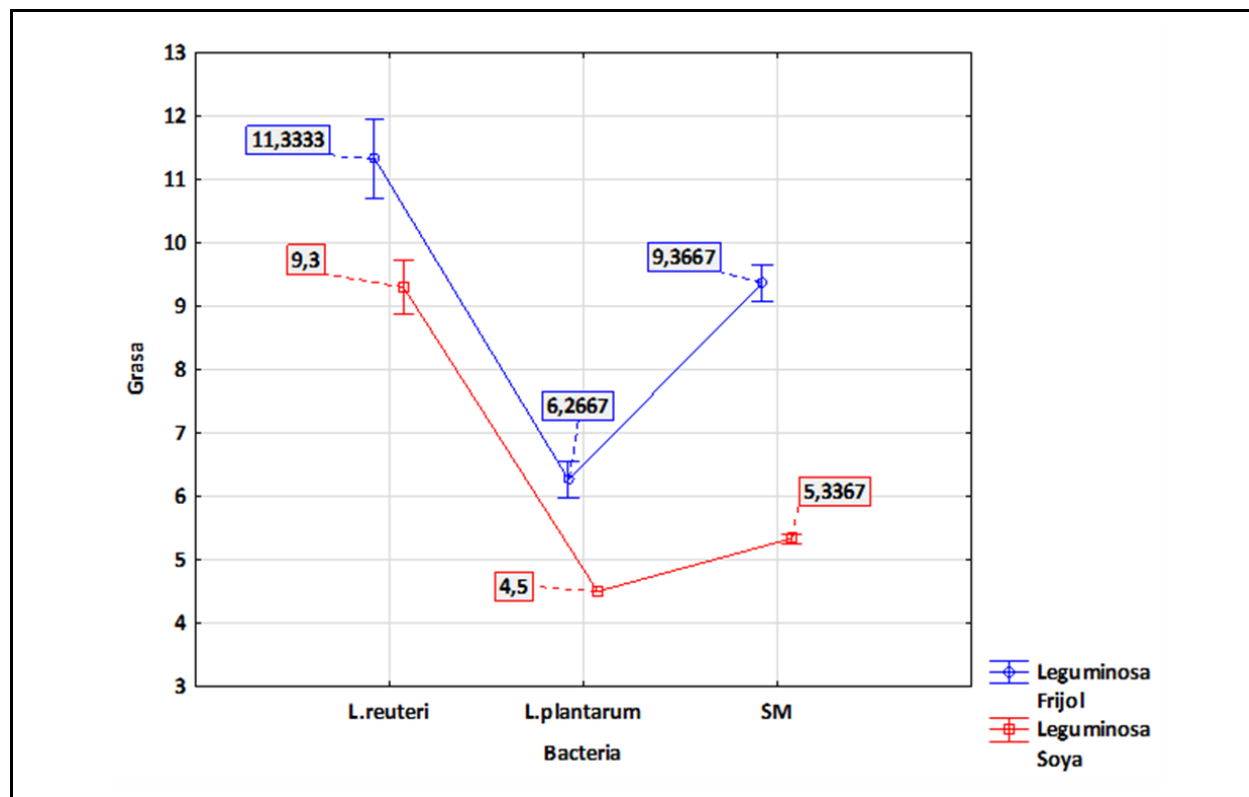


### Humedad

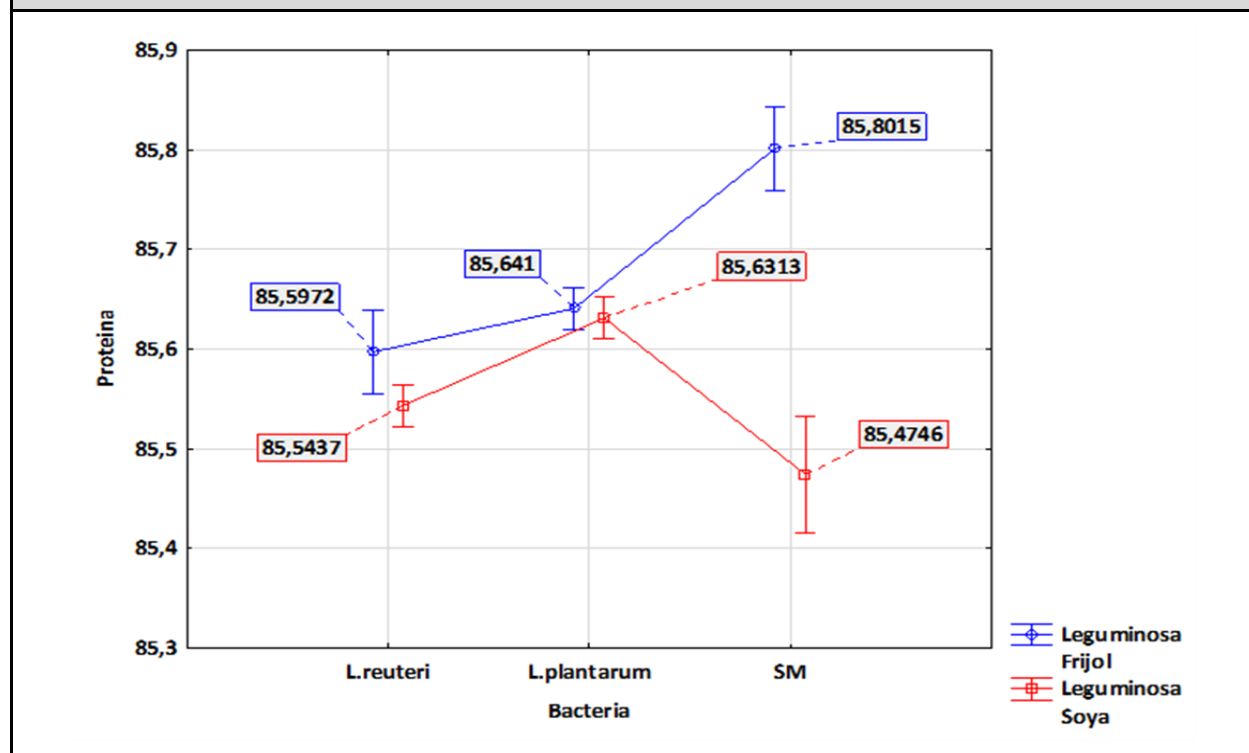


### Grasa

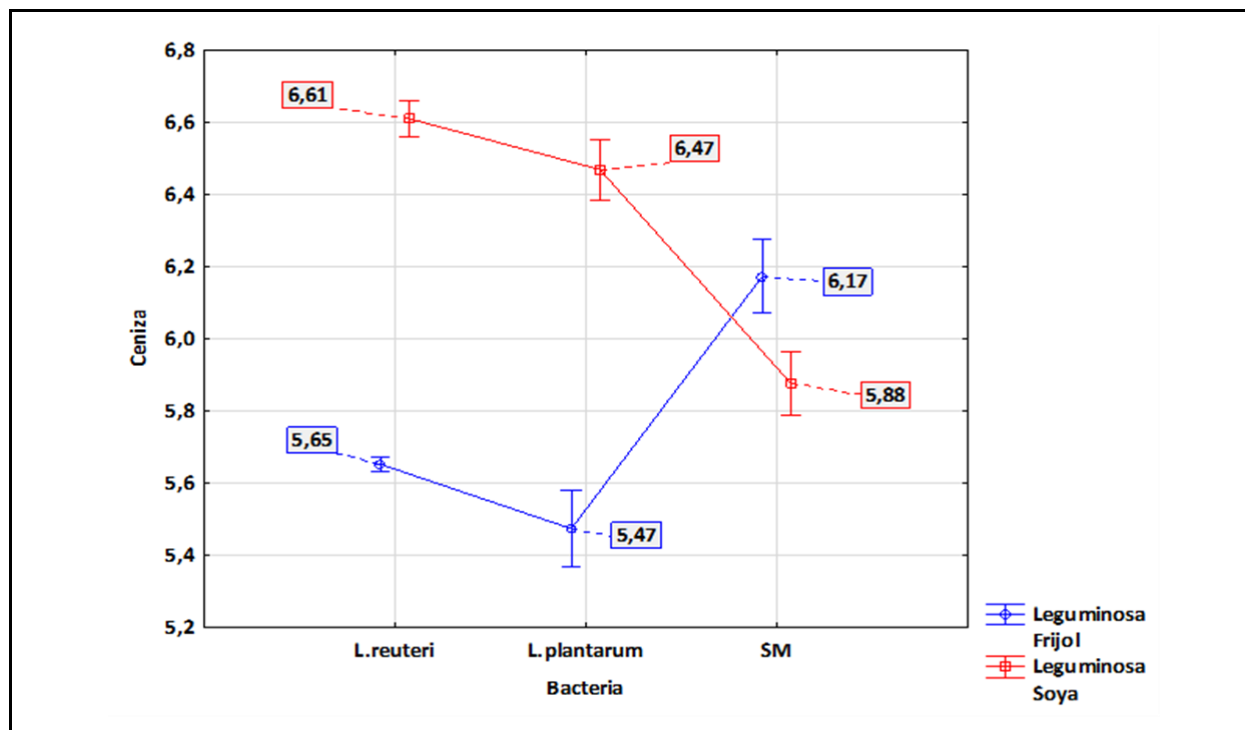




### Proteína



### Ceniza



La figura 5, muestra los valores de la prueba de significación Tukey ( $p < 0,05$ ) agrupados de las variables evaluadas correspondiente a la obtención del alimento funcional para la interacción AB (AB: Tipo de leguminosa\*tipo de bacteria).

En la variable de pH, se obtuvo el mayor contenido en el grupo a2b3: Soya amarilla +m Sin microorganismos (6,33), mientras que el menor contenido fue dado por el grupo a2b2: Soya amarilla+ *L.plantarum* (6,12). Estas variaciones de pH se deben a la presencia de *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus plantarum*, que al ser bacterias ácido lácticas (BAL) disminuyen el pH. Al dejar durante 24 horas en reposo las bacterias comenzaran a utilizar los carbohidratos para producir diferentes ácidos, disminuyendo el pH de la harina, y favoreciendo el proceso de conservación como lo recalcan Liang et al. (2021) quien destaca que las BAL acidófilas y acidúricas contribuye a la conservación de alimentos ya que produce metabolitos como ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico y ácido propiónico, haciendo que el pH de los alimentos disminuya.

En referencia a los resultados obtenidos en la variable acidez se observó el mayor contenido para el grupo a1b1: Frijol calima rojo + *L. reuteri* (0,0366), en tanto se obtuvo para el grupo a1b2: Frijol calima rojo + *L.plantarum* (0,026) el menor contenido. Esto se puede explicar en primer lugar por la diferencia de carbohidratos que contiene cada una de las harinas en el caso del frijol los carbohidratos que pueden utilizar las bacterias ácido lácticas es de 58,8 a 77,4 % (Los et al., 2018) y en el caso de la soya es apenas de 30 al 35% (Middelbos & Fahey, 2008), por lo que las bacterias interactúan mejor con el frijol rojo que con la soya. En segundo lugar *L. reuteri* genera en menor tiempo mayor cantidad de ácido láctico que *L. plantarum* (Y. Wang et al., 2021), con estos datos se puede afirmar que para mejorar la acidez de la hamburguesa es mejor suplementar con harina de frijol y utilizar *L. reuteri*.

Con respecto a los resultados para la variable humedad se observó que el mayor contenido se dio para el grupo a1b3: Frijol calima rojo + Sin microorganismos (79,0367%), caso contrario se observó para el grupo a2b3: Soya amarilla + Sin microorganismos (63,1544%) que presentó el menor contenido. Esto se explica porque la harina de frijol retiene más humedad que la de soja, debido a que contiene mayor porcentaje de fibra, mientras que la colocación de bacterias casi no afecta el porcentaje de humedad (Zárate, 2020).

En cuanto a los resultados para la variable grasa se obtuvo que el mayor valor se dio en el grupo a1b1: Frijol calima rojo + *L. reuteri* (11,3333), mientras que el menor valor se observó para el grupo a2b2: Soya amarilla+*L.plantarum* (4,5). Esto se explica, debido a que *L. plantarum*, tiene una actividad lipolítica, por la acción de lipasas, mayor que *L. reuteri* y al tener la soya mayor cantidad de grasa, las lipasas entran en el estado de saturación de sustrato, donde la velocidad de la reacción alcanza su máximo. En este punto, todas las enzimas están ocupadas, y la tasa de formación de productos es constante, reduciendo de mejor manera la cantidad de grasa presente en las hamburguesas (Robinson, 2015).

En los resultados de la variable proteína, se obtuvo el mayor contenido en el grupo a1b3: Frijol calima rojo+ Sin microorganismos (85,8015), mientras que el menor contenido fue

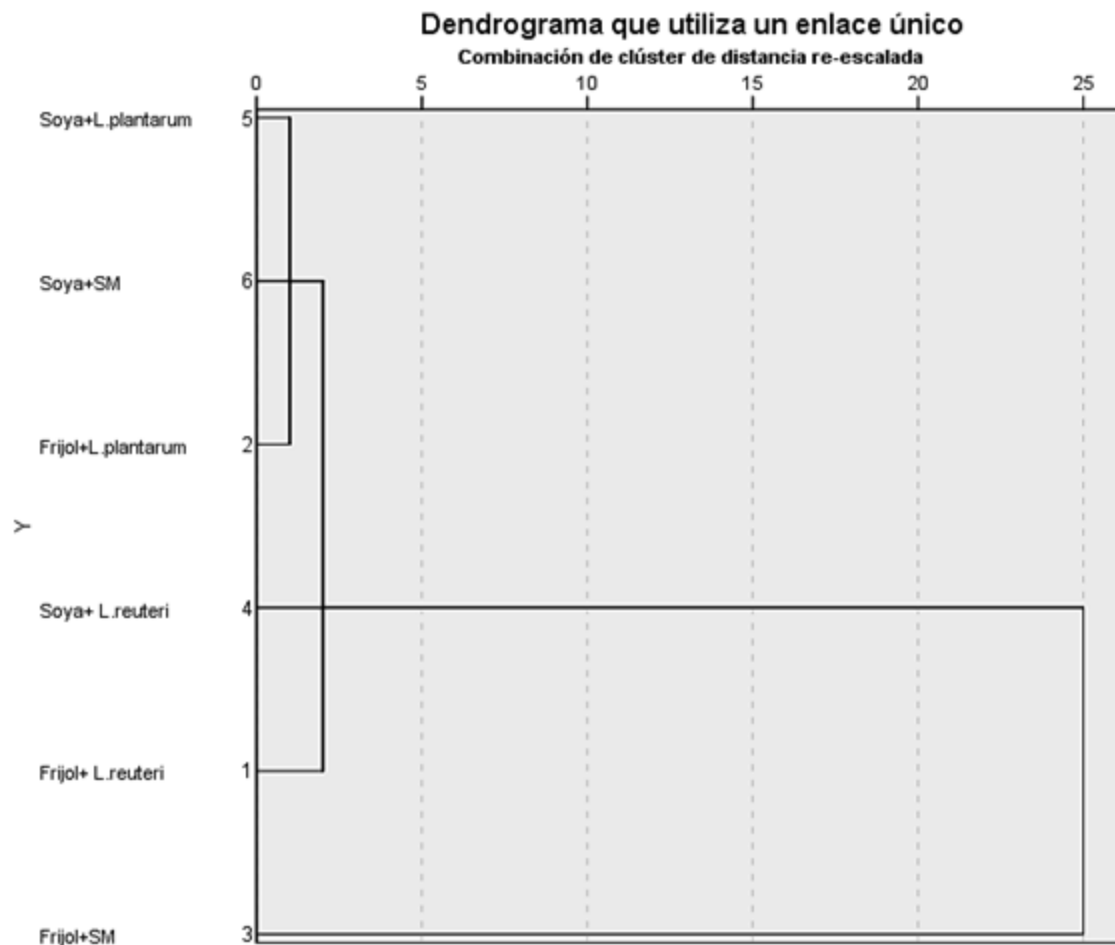
dado por el grupo a2b3: Soya amarilla + Sin microorganismos (85,4746). Estos resultados se deben a que los microorganismos utilizan una ligera porción de proteínas para su metabolismo, además, debido al cambio de pH las proteínas se desnaturalizan haciendo que el porcentaje de proteínas disminuya levemente en aquellas hamburguesas con microorganismos (Los et al., 2018).

Por último, en referencia a los resultados obtenidos en la variable ceniza se observó el mayor contenido en el grupo a2b1: Soya amarilla+ *L. reuteri* (6,61), en tanto se obtuvo para el grupo a1b2: Frijol calima rojo +*L.plantarum* (5,47) el menor contenido. Esto se explica ya que la soya posee mayor cantidad de calcio y magnesio en comparación al frijol (Mananga et al., 2021). También la inoculación de cepas ácido lácticas aumenta la abundancia de minerales de bajo peso molecular, ya que al reducir el pH la mayoría de las proteínas con carga negativa se convierten en cargadas positivamente provocando la liberación de iones de calcio y magnesio unidos a las proteínas (Gan et al., 2023).

Es importante destacar que cada tipo de leguminosa tiene una composición única, y al interactuar con diferentes microorganismos, se producen cambios en los componentes nutricionales. En resumen, las variaciones en el contenido de proteína y ceniza después de la introducción de microorganismos pueden atribuirse a las interacciones específicas entre los componentes químicos de las leguminosas y los microorganismos utilizados, lo que respalda la idea de que diferentes leguminosas responden de manera única a la presencia de microorganismos, como indicado por Du et al., (2014).

### **Resultado de Análisis de Conglomerados del Alimento Funcional: Hamburguesa**

**Figura 5.** *Dendrograma a través de un análisis de clúster jerárquico similitudes entre los diferentes tratamientos examinados*



En la figura 6, se presenta un dendrograma a través de un análisis de clúster jerárquico que exhibe las similitudes entre los diferentes tratamientos examinados.

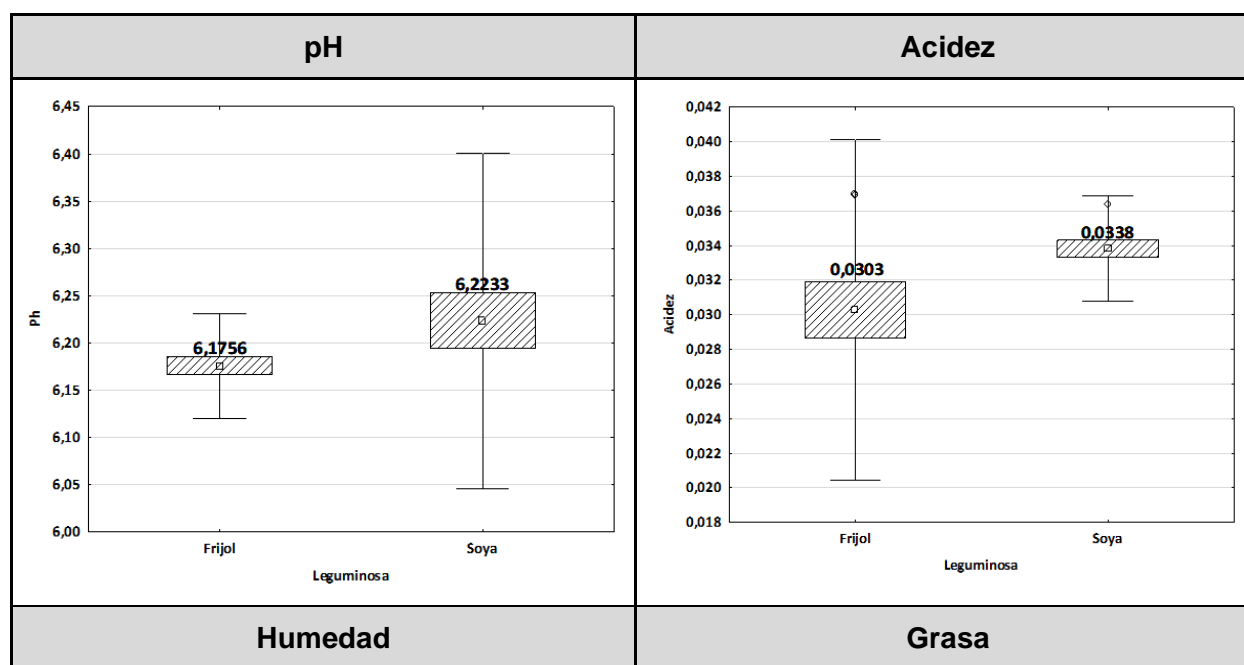
Se obtuvo mayor relación entre los tratamientos Soya amarilla+ *L.plantarum*, Soya amarilla+ Sin microorganismos, Frijol calima rojo+ *L.plantarum*. Mientras que el tratamiento con menor relación a los demás tratamientos estudiados es Frijol calima rojo + Sin microorganismos. Por otra parte, los tratamientos que tienen proximidad son Soya amarilla+ *L. reuteri*, Frijol calima rojo+ *L. reuteri*

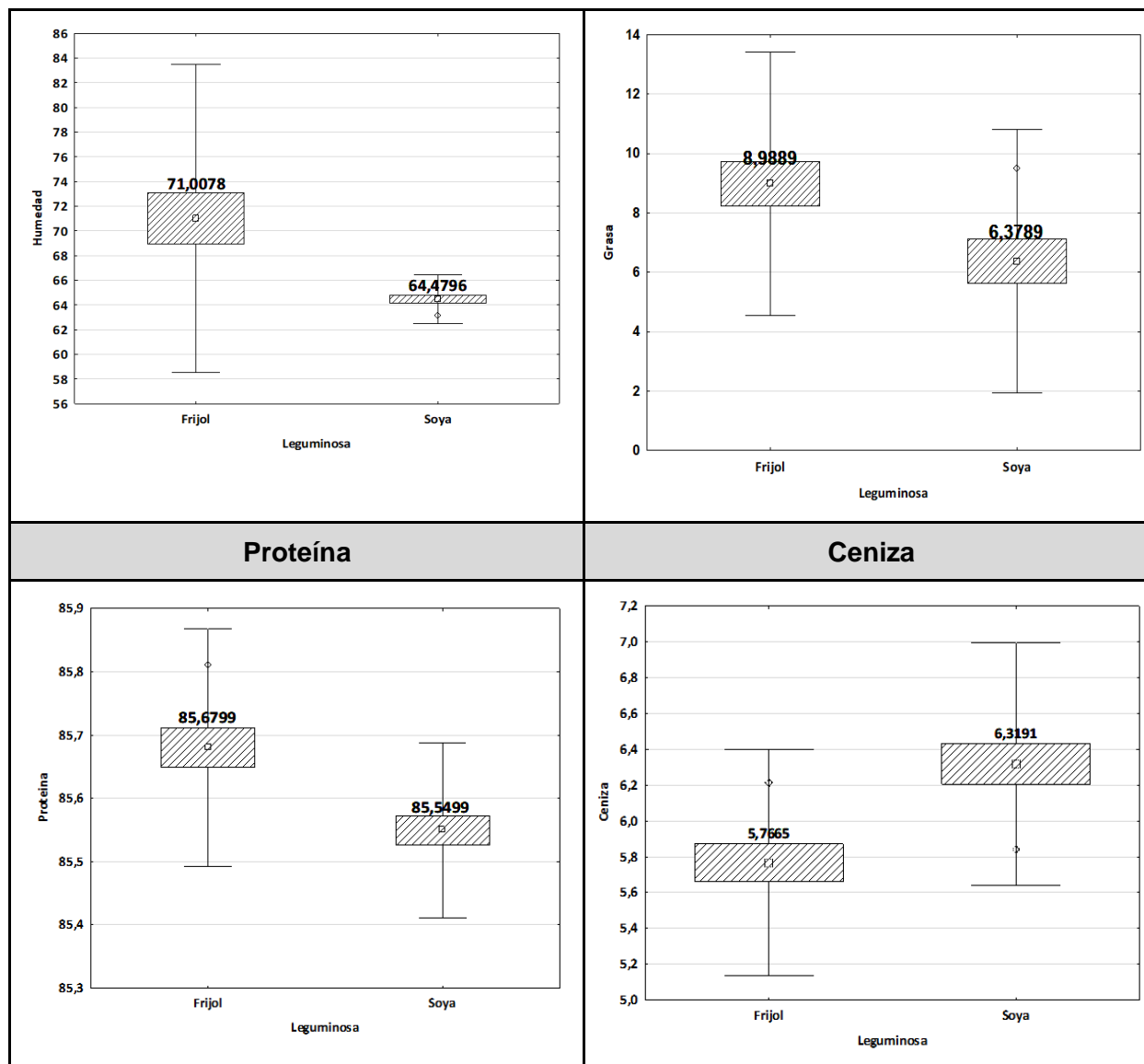
**Resultados de la factibilidad para la utilización de dos variedades de leguminosas (Frijol calima rojo y soja Amarilla). Factor A (Tukey  $p < 0.05$ )**

**Tabla 24 .** Resumen de los valores estadísticos de la Prueba de significancia de Tukey para las variables estudiadas considerando dos tipos de leguminosa (Frijol calima rojo y soja Amarilla)

Tipo de leguminosa	pH	Acidez	Humedad	Grasa	Proteína	Ceniza
A1:Frijol calima rojo	6,18 <sup>A</sup>	0,0303 <sup>A</sup>	71,0078 <sup>A</sup>	8,9889 <sup>A</sup>	85,6799 <sup>A</sup>	5,7665 <sup>A</sup>
A2:Soja Amarilla	6,22 <sup>B</sup>	0,0338 <sup>B</sup>	64,4796 <sup>B</sup>	6,3789 <sup>B</sup>	85,5499 <sup>B</sup>	6,3191 <sup>B</sup>

**Figura 6.** Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Factor A: Tipo de leguminosa)





La figura 3, muestra los valores de la prueba de significación Tukey ( $p < 0,05$ ) agrupados de las variables evaluadas correspondiente en la obtención de un alimento funcional para el factor A (Tipo de leguminosa). Con respecto a las variables observadas se determinó que aquellas hamburguesas que tienen harina de soya Amarilla (A2) presenta un valor ligeramente más alto de pH (6,22) en comparación con aquellas que tienen harina de frijol calima rojo (A1) cuyo pH fue de 6,18. Si se compara con los valores descritos por la normativa NTE INEN 1 338, donde el pH máximo para harinas es de 6,2, los valores obtenidos se encuentran dentro de la normativa y se puede afirmar que el pH cambia dependiendo de la leguminosa esto

porque el contenido nutricional de cada una de ellas es diferente, tal como lo indico Sangronis et al.(2004), en su estudio determinó que la presencia y la proporción de componentes como proteínas, grasas, carbohidratos y minerales pueden influir en el pH de las harinas de leguminosa, esto debido a que algunos aminoácidos de las proteínas pueden tener efectos ácidos o básicos mientras que las fibras insolubles tienen propiedades alcalinas, y las fibras solubles tienen efectos ácido. En el caso de los minerales principalmente el calcio y el magnesio suelen tener propiedades alcalinas. Por ejemplo, en el caso de los aminoácidos se ha visto que la cantidad de lisina, un aminoácido básico es mayo en el frijol que, en la soya, lo cual hace que la soya tenga un pH más ácido (Torres y Torres & Tovar-Palacio, 2009). Así mismo se ha visto que la cantidad de calcio (300,36 mg/100 g) y magnesio (258,24 mg/100 g) de la soya es mucho mayor que la del frijol cuyas cantidades son 54,9 mg/100 g y 1,7 mg/100 respectivamente por lo que se explica la diferencia de pH entre las leguminosas (Etiosa et al., 2017).

En acidez se observó el mayor contenido para las hamburguesas del grupo A2 de Soya amarilla con 0,0338 de acidez, y para el grupo A1: Frijol Calima rojo la acidez fue de 0,0303. Si comparamos nuestros valores con el estudio de Velásquez (2015) donde se obtuvo una acidez que varía entre 0,027% y 0,065 %, se puede afirmar que los valores están dentro de lo esperado. La diferencia que se da entre la hamburguesa con harina de soya y la hamburguesa con harina de frijol se explica principalmente por el contener de ácidos orgánicos que afectan directamente la acidez de la harina que modifica a su vez la acidez de la hamburguesa. Por ejemplo, en la soya predomina el ácido oleico (22%), el ácido linoleico (54%) y el linolénico (7.5%), mientras que en el caso del frijol el ácido que más predomina es solo el ácido linoleico, generando que la soya tenga mayor acidez (Serrano & Goñi, 2004).

De acuerdo a la humedad la hamburguesa con frijol calima rojo (71,00%) posee un valor mayor en comparación con las hamburguesas con soya amarilla que tienen un valor de



64,479%. En otros estudios como el de Ayavaca, (2020) el porcentaje de humedad fue de 61,4% cuando se añade harina de frijol y 55,24 % cuando se añade harina de soya, respectivamente a las hamburguesas, con lo que se puede afirmar que la harina de frijol retiene más humedad que la de soya, resultados que se asemejan a los encontrados en este estudio. Esto se explica principalmente por la cantidad de agua que retiene la harina, que está relacionado con la cantidad de fibra que posee cada una de las harinas, tanto la harina de frijol como la de soya poseen fibra, en la soya la fibra es de 2% y en el caso del frijol la fibra varía de 14 al 19%. Por lo que la harina de frijol retendrá la humedad en mayor proporción debido a la fibra (Navarro & López, 2019).

En cuanto a la variable grasa se obtuvo mayor contenido en el grupo A1: Frijol Calima rojo 8,9889, frente a A2: Soya amarilla 6,3789. Según la regulación NTE INEN 1338 se establece un límite máximo del 30% para hamburguesas, por lo que los resultados obtenidos se encuentran dentro del rango aceptable. También dentro en los estudios de Mejia, (2023), donde se utilizó harina de garbanzo para suplementar las hamburguesas se obtuvo 3,7% de grasa total, que es un valor inferior al obtenido en este estudio, esto indica que la diferencia entre la cantidad de grasa de las hamburguesas se debe principalmente al tipo de harina utilizada (Torres y Torres & Tovar-Palacio, 2009).

En cambio, para proteína, el mayor contenido fue para el grupo A1: Frijol Calima rojo con un valor de 85,6799%, mientras que el menor porcentaje fue para A2: Soya amarilla 85,5499%. Comparando con Ayavaca,(2020) que obtuvo porcentaje de 80,13% cuando suplementó su hamburguesa con harina de soya y Felker et al., (2023) que obtuvo un porcentaje de 78,21% cuando suplementó su hamburguesa con harina de frijol, y tomando en consideración el porcentaje de proteína presente en las leguminosas siendo para la soya entre 45 al 50% y en el caso del frijol entre 14 al 33%, es válido argumentar que, la variación dada en este estudio se puede deber al proceso de homogenización de la mezcla y si bien los datos de comparación son cercanos a los obtenidos, la variación podría estar asociada a la

incorporación de subproductos como las bacterias que al alterar el pH, alteran las proteínas (Serrato C & Bernal A., 2000).

En ceniza se observó el mayor contenido para el grupo A2: Soya amarilla 6,3191, en tanto se obtuvo para el grupo A1: Frijol Calima rojo 5,7665 siendo este el menor contenido de ceniza encontrado. Estos valores son más altos que los obtenidos por Ayavaca,(2020) que reporto un valor de 3,31% cuando suplemento su hamburguesa con harina de soya y Felker et al., (2023) con 2,54% cuando suplemento su hamburguesa con harina de frijol, pero se puede inferir que la soya tiene mayor porcentaje de ceniza. Esta variación se debe a la cantidad de minerales inorgánicos presentes en cada uno de las leguminosas, en el caso de la soya posee más minerales reportados que el frijol. Entre los principales minerales se encuentran calcio con 300.36 mg/100 g, magnesio 258.24 mg/100 g, hierro 16.4 mg/100 g, Zinc 2.7 mg/100 g y fósforo 695.20 mg/100 g (Etiosa et al., 2017) y en el caso del frejol principales minerales son solo el potasio (K) y calcio (Ca) con contenidos máximos de 912,99 mg/100g y 933,85 mg/100g (Mananga et al., 2021).

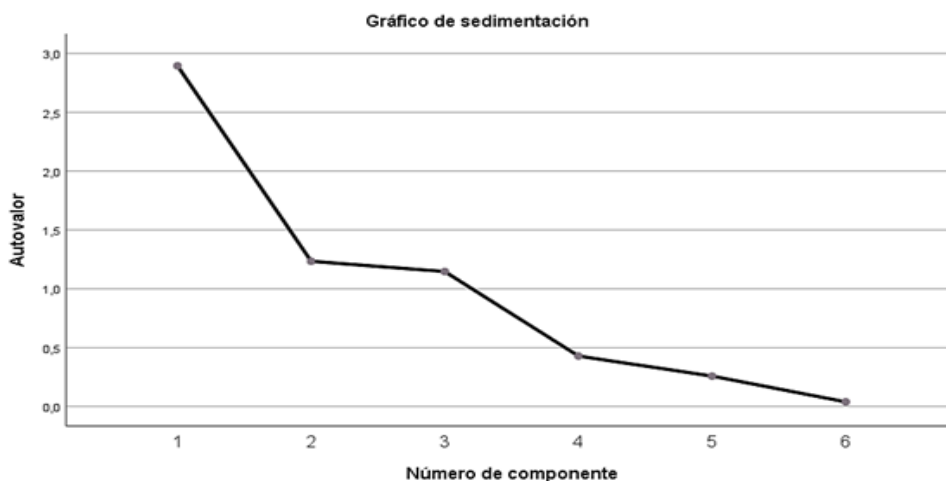
### Análisis de Componentes Principales

**Tabla 25.** Matriz de correlación de componentes principales de componentes principales

Matriz de correlaciones						
	pH	Acidez	Humedad	Grasa	Proteína	Ceniza
pH	1,00	,337	-,525	-,180	-,754	-,264
Acidez	,337	1,00	-,425	,181	-,612	,184
Humedad	-,525	-,425	1,00	,474	,870	,040
Grasa	-,180	,181	,474	1,00	,249	-,075
Proteína	-,754	-,612	,870	,249	1,00	,024
Ceniza	-,264	,184	,040	-,075	,024	1,00

En la tabla 25, se puede evidenciar una mayor correlación positiva (0,870) entre las variables humedad y proteína, en contraste, se observa una correlación negativa significativa entre la variable pH y proteína (-0,754). Asimismo, se identifica una correlación negativa entre acidez con proteína y humedad con pH siendo sus valores de -0,612 y -0,525, respectivamente.

**Figura 7.** Gráfico de sedimentación del análisis de componentes principales



**Tabla 26.** Matriz de componentes

Matriz de componentes <sup>a</sup>			
Componentes			
	1	2	3
pH	-,790	-,120	,342
Acidez	-,615	,696	,028
Humedad	,897	,151	,174
Grasa	,366	,689	,564
Proteína	,974	,089	-,021
Ceniza	,067	,480	-,825

En la figura 7 se describen los análisis de los seis componentes evaluados para la obtención del alimento funcional. Según se observa en el gráfico de sedimentación, se constata la utilidad de los tres primeros componentes en este estudio, por consiguiente, se opta por seleccionar 3 componentes principales para su análisis. Además, se emplearon los valores de varianza para determinar el número de componentes principales que deben ser valores mayores a 2.

La información proporcionada en la tabla 26 ayuda a identificar cada componente principal extraído, considerando tanto la magnitud como la dirección de los coeficientes de las variables. Se toma en cuenta el valor absoluto de los mismos que indican la significancia de cada componente con las variables estudiadas. Se observa que a medida que aumenta el valor absoluto, mayor se explica la variable para un determinado componente. En la primera componente, se explica muy bien las variables humedad, pH y proteína, mientras que para el segundo componente se explica la variable acidez y grasa. Por último, se explica la tercera componente, ceniza.

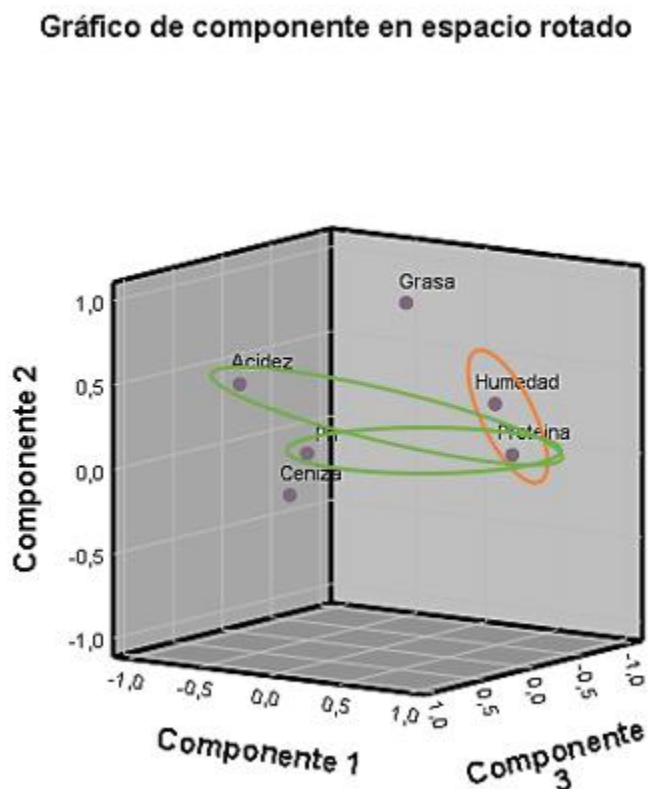
**Tabla 27.** *Tabla de comunalidades*

<b>Comunalidades</b>		
	<b>Inicial</b>	<b>Extracción</b>
<b>pH</b>	1,000	,755
<b>Acidez</b>	1,000	,863
<b>Humedad</b>	1,000	,858
<b>Grasa</b>	1,000	,927
<b>Proteína</b>	1,000	,957
<b>Ceniza</b>	1,000	,914

En la tabla 27 referente a las comunalidades, se puede observar el porcentaje que cada componente puede explicar de cada variable estudiada. La correlación entre las 3

componentes extraídas para la interpretación de cada una de las variables estudiadas es significativa para la explicación de la diversidad de datos. El análisis de componentes principales explica el 95% en proteína y grasa con un 92%.

**Figura 8.** Gráfico de componentes principales



En la figura 8, se presenta toda la información agrupada de las correlaciones entre las variables donde se determina que existe una relación inversa entre las variables pH y proteína, así como entre acidez y proteína. Por otro lado, se observa una relación significativa directa entre las variables humedad y proteína.

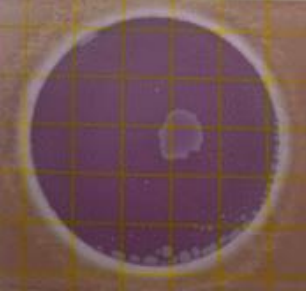
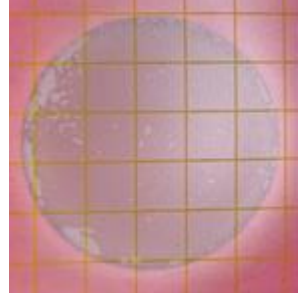
El análisis de componentes principales destaca la relación inversa entre pH y proteína, así como entre acidez y proteína. La variabilidad en la composición nutricional de las leguminosas se explica principalmente por tres componentes, resaltando la importancia de la humedad, pH y proteína en la formación de un alimento funcional.


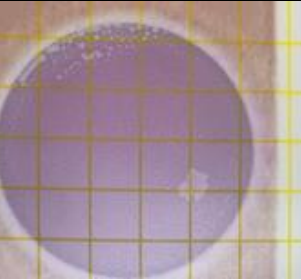


Los resultados obtenidos de la evaluación de diferentes tratamientos de leguminosas con distintos tipos de bacterias revelan patrones significativos en las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas brindando información valiosa sobre la obtención de alimentos funcionales. Los datos revelan que la interacción entre el tipo de leguminosa y el tipo de bacteria tiene un impacto significativo en las propiedades fisicoquímicas del alimento funcional.

El pH, la acidez, la humedad, la grasa, la proteína y la ceniza muestran variaciones notables entre los diferentes tratamientos. Es fundamental destacar que, a pesar de las tendencias generales, se observan excepciones y faltas de correlación en algunos tratamientos. Esto puede deberse a la complejidad de las interacciones biológicas y químicas en juego. La variabilidad entre tratamientos resalta la necesidad de considerar factores específicos que puedan afectar la respuesta del sistema a la liofilización y la acción bacterianas.

### **Análisis Microbiológico del Alimento Funcional: Hamburguesa**

**Tabla 28.** *Análisis microbiológico de los tratamientos de la investigación*

Tratamiento	Análisis	Recuento
Frijol calima roja + <i>L. Plantarum</i>	Enterobacteria	 0 UFC/ml
	Coliformes	 0 UFC/ml

Tratamiento	Análisis	Recuento
	Aerobios	 3E+3 UFC/ml
Soya amarilla + <i>L. Plantarum</i>	Enterobacteria	 0 UFC/ml
	Coliformes	 0 UFC/ml
	Aerobios	 6E+3 UFC/ml

El análisis de las propiedades microbiológicas de las leguminosas liofilizadas se muestra en la tabla 28. Las hamburguesas de frijol calima roja + *L. Plantarum* y la soya amarilla con *L. Plantarum* no presentan cambio del color del gel de púrpura a amarillo o crema por lo cual, el recuento de enterobacterias es 0, asegurando que la muestra no se encuentra contaminada con bacterias patógenas. En lo que respecta al análisis de aerobios mesófilos, se

registra una mayor presencia de colonias en comparación con las otras pruebas, atribuible al hecho de que la bacteria utilizada en el tratamiento pertenece a este grupo. En coliformes hubo ausencia de colonias para el tratamiento hamburguesa de soya amarilla + *L. Plantarum* ( $10E+1$  UFC/ml), el cual no es un nivel particularmente alto.

De acuerdo a la normativa INEN el nivel de aerobios mesófilos es de  $1,0 \times 10^6$  UFC/gr de carne y en el caso de las coliformes es de 0 UFC/gr de carne, por lo que se puede afirmar que la carne se encuentra apta para el consumo. De acuerdo a Park & Kim (2013) las bacterias aeróbicas mesófilas en alimentos se ha asociado con la contaminación por patógenos en los alimentos, convirtiéndolas en indicadores relevantes para la seguridad alimentaria, ya que en cantidades superiores a la norma indican contaminación cruzada en la manipulación y deficientes condiciones de conservación, en nuestro caso no se puede afirmar eso ya que las bacterias inoculadas en la harina de frijol y soya son mesófitas y serán detectadas por el Parafilm.



## 5. Conclusiones y Recomendaciones

### Conclusiones

- El estudio realizado permitió evaluar de manera integral las características fisicoquímicas y microbiológicas de distintas leguminosas liofilizadas, considerando la adición de bacterias ácido lácticas con el fin de desarrollar un alimento funcional. Los resultados obtenidos revelan que la selección adecuada de las combinaciones entre leguminosas y microorganismos juega un papel crucial en la obtención de productos con propiedades beneficiosas para la salud.
- Los resultados obtenidos demuestran la viabilidad y eficacia de la liofilización como método de conservación, preservando las propiedades físico-químicas y microbiológicas de las leguminosas.
- Se confirmó que la incorporación de bacterias ácido lácticas no solo puede contribuir a mejorar la calidad nutricional y sensorial del producto final, sino que también puede garantizar su seguridad microbiológica, cumpliendo con los estándares de calidad y seguridad alimentaria.
- Se observó que al evaluar las características fisicoquímicas y microbiológicas del alimento funcional estas mejoraban de acuerdo a los estándares y otros estudios realizados.

### *Leguminosa*

- Se dispone los mejores resultados en cuanto al pH (6,61) y acidez (0,301) de la harina de soya amarilla liofilizada es ligeramente superior al del frijol calima rojo liofilizado que posee un pH de 6,54, una baja acidez de 0,228, pero se encuentran en los límites aceptados por la norma INEN donde la acidez para harinas de origen vegetal mínimo es de 0,02.

- Por consiguiente, se fijan los mejores resultados en la composición nutricional de la harina de leguminosa del frijol calima rojo que exhibe un bajo contenido de grasa (2,77%), alta proteína (84,41%), y moderada humedad (0,617%), mientras que la soya amarilla presenta un contenido considerablemente más alto de grasa (48,4%), proteína (83,85%), y humedad (2,95%).
- Se establecen los mejores resultados en la soya amarilla en la elaboración de hamburguesa como alimento funcional ya que presenta propiedades mayores de pH (6,22), acidez (0,0338) y ceniza (6,3191), a comparación de las hamburguesas de frijol calima rojo que tienen un menor pH (6,18), acidez (0,0303) y ceniza (5,7665).
- Se establecen los mejores resultados en las hamburguesas de harina de frijol calima rojo en cuanto a que tienen mayor porcentaje de humedad (71,0078), grasas (8,9889) y proteína (85,6799) a comparación de las hamburguesas de soya amarilla cuyo porcentaje de humedad, grasas y proteína son 64,4786, 6,3789 y 85,5499 respectivamente.

### ***Bacterias ácido lácticas***

- *L. reuteri*, favorece las características de acidez (0,035), contenido de grasa (10,3167), y ceniza (6,1317) de las hamburguesas de res, logrando una hamburguesa de textura suave y rica en minerales.
- *L. plantarum* reduce los valores de pH a 6.1617, así como también disminuye la humedad a 65.5523% y la concentración de proteínas a 85.6381%. Esta reducción en el pH y la humedad puede ser beneficiosa ya que favorece la inhibición del crecimiento de microorganismos que podrían descomponer la carne, prolongando así su vida útil y mejorando su seguridad alimentaria, a diferencia de la carne de hamburguesas sin microorganismos que tiene valores altos de pH (6,235) y humedad (71,0955), y cantidad de proteína (85,6381).

- Tanto *L. reuteri* como *L. plantarum* en la carne de hamburguesa reduce ligeramente la cantidad de proteínas de 85.6381% sin microorganismos a 85,5705 y 85,6361% respectivamente por acción del metabolismo de las proteasas.

### ***Interacción entre las leguminosas y bacterias***

- Las hamburguesas de soya amarilla con *L.plantarum* poseen los pH más bajo de todas las combinaciones con un valor de 6,12, por lo que se puede afirmar que esta es la mejor combinación para retrasar la descomposición de la carne ya que los microorganismos que descomponen la carne y causan deterioro tienden a prosperar en condiciones más alcalinas y al reducir el pH, se ralentiza su actividad enzimática y, por lo tanto, se reduce la velocidad de descomposición de la carne.
- La combinación de Frijol Calima Rojo y *Lactobacillus reuteri* ha demostrado aumentar la humedad de la carne de 63,15% a 67,95%. Este incremento en la humedad puede contribuir a mejorar la jugosidad y suavidad de la carne, proporcionando una textura más tierna y jugosa. Sin embargo, también crea un ambiente propicio para el crecimiento de bacterias y hongos, lo que podría provocar la descomposición de la carne y la aparición de olores desagradables.
- Tanto las hamburguesas de soya amarilla y las hamburguesas de frijol calima rojo sin microorganismos poseen el valor más bajo de humedad de 63,15, por lo que se puede afirmar que la variación de la humedad está directamente ligada a la presencia de las bacterias antes que al tipo de leguminosa.
- Las hamburguesas elaboradas con soya amarilla y *Lactobacillus reuteri* presentan el mayor porcentaje de ceniza, alcanzando un valor de 6,61%, mientras que las hamburguesas de frijol rojo con la misma bacteria exhiben el porcentaje más bajo, con un 5,47%. Estos resultados sugieren que la cantidad de ceniza en las hamburguesas

parece estar más vinculada al tipo de harina utilizada que al tipo de bacterias lácticas proporcionadas.

### Recomendaciones

- Se recomienda considerar la soya amarilla como una opción nutricionalmente rica, ya que presenta ligeramente mayores valores de pH (6,61) y acidez (0,301) en comparación con el frijol calima rojo.
- Al seleccionar harina de leguminosa, se debe tener en cuenta que el frijol calima rojo exhibe un bajo contenido de grasa (2,77%), alta proteína (84,41%), y moderada humedad (0,617%), mientras que la soya amarilla presenta un contenido más alto de grasa (48,4%), proteína (83,85%), y humedad (2,95%).
- En la producción de hamburguesas, se debe tener en cuenta que las de soya amarilla presentan propiedades fisicoquímicas superiores en términos de pH (6,22), acidez (0,0338), y ceniza (6,3191) en comparación con las de frijol calima rojo.
- Para aumentar la acidez, contenido de grasa y ceniza en las hamburguesas, se recomienda suplementarlas con *L. reuteri*, que demostró tener los valores más altos en estas categorías (0,035, 10,3167 y 6,1317, respectivamente).
- Se sugiere la elaboración de hamburguesas con harina de soya amarilla y sin microorganismos, ya que presentan los valores más altos de pH (6,33) y por ende será la hamburguesa que mejor se pueda conservé.
- La combinación de harina de frijol calima rojo y *L. reuteri* resulta en hamburguesas con los valores más altos de acidez (0,04), humedad (67,95) y grasa (11,33).
- Para maximizar el contenido de proteína en las hamburguesas de soya amarilla se recomienda probar diferentes cantidades de formulaciones que permitan retener o aumentar la concentración de proteína durante la producción.

- Se recomienda preparar una hamburguesa de soya amarilla con *L. reuteri* si se desea tener un alimento rico en minerales ya que este tipo de hamburguesa tiene un porcentaje de ceniza de 6,61.

## 6. Bibliografía

- Abuqwider, J., Altamimi, M., & Mauriello, G. (s.f.). *Limosilactobacillus reuteri* in Health and Disease. *Microorganisms*, 10(3), 522. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030522>.
- Aisa, G. (2021). *Relación entre la obesidad y el deterioro del microbiota intestinal*. <http://hdl.handle.net/20.500.12880/107>.
- Alvarado, M., & Nataren, G. (2022). *Elaboración de helado casero adicionado con bacterias probióticas e inulina como prebiótico*. <https://hdl.handle.net/20.500.12753/4533>.
- Auré, G., Astráin, L., & Cebrián, G. (2022). *Mejora del proceso de liofilización mediante la aplicación de nuevas tecnologías de procesado*. <https://zagan.unizar.es/record/124849>.
- Ayavaca, E. (2020). Análisis proximal del agregado de soya en polvo (glycine max) a carne molida para la elaboración de hamburguesas [universidad nacional de chimborazo]. <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/7249/2/trabajo%20de%20titulacion%20Eric%20Ayavaca%20%281%29.pdf>
- Bach, L. (2021). Evaluación sensorial y vida útil de una bebida formulada a base de garbanzo (*Cicer arietinum* L.), Frejol de palo (*Cajanus cajan* L.) y lactosuero dulce saborizada con chocolate. [Tesis de pregrado, Universidad Señor de sipán]. Obtenido de <https://repositorio.uss.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12802/8389/Bernal%20N%c3%ba%c3%b1ez%20Lucy%20Yanina.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Bhatta, S., Britton, R. A. (2017). Chapter 8—*Lactobacillus reuteri*. En M. H. Floch, Y. Ringel, & W. Allan Walker (Eds.), *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology* (pp. 89-97). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804024-9.00008-2>
- Brown, A., Ferreira, G., Teets, C., Thomason, W., & Teutsch, C. (2018). *Nutritional composition and in vitro digestibility of grass and legume winter (cover) crops*. *Journal of Dairy Science*, 101(3), 2037-2047. <https://gdoi.org/10.3168/jds.2017-13260>.

- Bulyaba, R., & Lenssen, A. (2019). *Nutritional composition of grain legume leaves and the impact of leaf removal on yield. Agrosystems, Geosciences & Environment*, 2(1), 1-10. <https://doi.org/10.2134/age2018.06.0015>.
- Cakir, Ö., Ucarli, C., Tarhan, Ç., Pekmez, M., & Turgut, N. (2019). *Nutritional and health benefits of legumes and their distinctive genomic properties. Food Science and Technology*, 39, 1-12. <https://doi.org/10.1590/fst.42117>.
- Calleja, A. (2019). *Análisis de poblaciones silvestres de Medicago de Bardenas Reales: papel de la raíz en la tolerancia a sequía*. <https://hdl.handle.net/2454/35017>.
- Cardona, M., & López, B. (2019). *Los probióticos: alimentos funcionales para lactantes. Medicas UIS*, 32(2), 31-39.
- Casado, A., & Ibeas, A. (2021). *Las leguminosas en Castilla y León. Su papel en la agricultura actual. Tierras de Castilla y León: Agricultura*, (299), 62-66. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8060372>.
- Castro, E., Rodríguez, J., Fornaguera, J., & Lascano, C. (2018). *Abonos verdes de leguminosas: integración en sistemas agrícolas y ganaderas del trópico. Agronomía Mesoamericana*, 29(3), 711-729. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v29n3/1659-1321-am-29-03-00711.pdf>.
- Chumacero, J., Lazo, R., Navarro, E., & Quinteros, A. (2022). *Conservación de camu (Myrciaria dubia Kunth McVaugh) por liofilización. Información tecnológica*, 33(5), 11-18. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642022000500011>.
- Comiotto, J. (2023). *Qualidade de produtos vegetais análogos à hambúrguer elaborados a partir de leguminosas*. <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/257502>.
- De Armas, I., Jiménez, E., & Córdoba, J. (2023). *Tendencias de Desarrollo Científico y Tecnológico de los Alimentos Funcionales: una Vigilancia Tecnológica 2018-2023*.
- Díaz, Y., & Salgado, J. (2022). *Bacterias ácido lácticas como bioconservantes en carnes en la industria alimentaria*. <https://repositorio.unicolmayor.edu.co/handle/unicolmayor/5670>.

- Dinçer, E., & Kivanç, M. (2018). Lipolytic Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Turkish Pastirma. *Anadolu university journal of science and technology –c Life Sciences and Biotechnology*, 1-1. <https://doi.org/10.18036/aubtdc.306292>
- Drago, S., González, R., Chel, L., & Valencia, M. (2007). *Evaluación de la disponibilidad de minerales en harinas de frijol y en mezclas de maíz/frijol extrudidas. Información tecnológica*, 18(1), 41-46. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642007000100007> .
- Du, S., Jiang, H., Yu, X., & Jane, J. (2014). Physicochemical and functional properties of whole legume flour. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 308-313. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.001>
- El-Ghorab, A., el-ghorab, A., Osman, F., Mageed, M., Shaheen, M., Hussein, A., Farouk, A., Shaaban, H., El-massry, K., & Shibamoto, T. (2014). Effects of fermentation and cooking on the quality of sausages and burgers. *International journal of food and nutritional sciences*, 3, 2014.
- Etiosa, O. R., Chika, N. B., & Benedicta, A. (2017). Mineral and Proximate Composition of Soya Bean. *Asian Journal of Physical and Chemical Sciences*, 1-6. <https://doi.org/10.9734/AJOPACS/2017/38530>
- Egas, L. (2019). *Aplicación de la atomización y la liofilización para la obtención de polvo y snack de pomelo (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València)*. <https://riunet.upv.es/handle/10251/129860>.
- Encina, G., & Stiglich, D. (2021). *Presencia de ocratoxina A en alimentos y uso de bacterias ácido lácticas como mecanismo de control (Doctoral dissertation, Universidad de Talca (Chile). Escuela de Tecnología Médica.)*. <http://dspace.otalca.cl/handle/1950/13147>.
- Falconí, J., Valdiviezo, C., & Ramírez, L. (2021). *Predicción del tiempo de liofilización del arazá (Eugenia Stipitata) mediante modelos matematicos. Ecuadorian Science Journal*, 5(4), 89-97. <https://journals.gdeon.org/index.php/esj/article/view/172>.



- Felker, F. C., Kenar, J. A., Singh, M., Winkler-Moser, J. K., & Byars, J. A. (2023). Comparison of Raw and Excess Steam Jet-Cooked/Drum-Dried Pinto Bean Flours and Their Effects on Ground Beef Patties. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2023, e5915625. <https://doi.org/10.1155/2023/5915625>
- Fidanza, M., Panigrahi, P., & Kollmann, T. (2021). *Lactiplantibacillus plantarum*—nomad and ideal probiotic. *Frontiers in microbiology*, 12, 712236. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.712236>.
- Freitas, R., Nero, L. A., & Carvalho, A. F. (2009). Nota técnica: Enumeración de aerobios mesófilos en leche: Evaluación de protocolos oficiales estándar y placas Petrifilm de recuento de aerobios. *Journal of Dairy Science*, 92(7), 3069-3073. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1705>
- Flores, L., Ruiz, A., & Oscanoa, A. (2021). *Protocolo para determinación de humedad en microalgas liofilizadas*. <https://hdl.handle.net/20.500.12958/3538>.
- Foresto, E. (2020). *¿Qué es una leguminosa y cómo se clasifican? Una actualización para estudiantes de nivel medio y superior . Educación Biológica . .* <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/revistaadbia/article/view/28158/35174>.
- García, E., & Fernández, I. (2012). *Determinación de la humedad de un alimento por un método gravimétrico indirecto por desecación*.
- Gatlin, L., & Nail, S. (2019). *Freeze drying: a practical overview. Protein purification process engineering*, 317-368. <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9780203741733-9/freeze-drying-practical-overview-larry-gatlin-steven-nail>.
- Gan, J., Kong, X., Wang, K., Chen, Y., Du, M., Xu, B., Xu, J., Wang, Z., Cheng, Y., & Yu, T. (2023). Effect of fermentation using different lactic acid bacteria strains on the nutrient components and mineral bioavailability of soybean yogurt alternative. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1198456. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1198456>

- Guallpa, A. (2021). *Evaluación del proceso de liofilización en fresa (Fragaria ananassa) para su aplicación en la industria alimentaria*.  
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/15528>.
- Guergoletto, K., Mauro, C. S., Mauro, I., & Garcia, S. (2017). Juçara (*Euterpe edulis*) pulp as a substrate for probiotic bacteria fermentation: Optimisation process and antioxidant activity. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29, 949.  
<https://doi.org/10.9755/ejfa.2017.v29.i12.1565>
- Guinet, M., Nicolardot, B., & Voisin, A. (2020). *Nitrogen benefits of ten legume pre-crops for wheat assessed by field measurements and modelling*. *European Journal of Agronomy*, 120, 126151. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2020.126151>.
- Hernández, J. (2023). *Evaluación de un sistema silvopastoril de ceba de bovinos basado en el uso de asociaciones de gramíneas y leguminosas*.  
<https://agris.fao.org/search/en/providers/124212/records/6474b016f2e6fe92b363323d>.
- Insuasti, G., Pilamunga, C., Núñez, J., & Reyes, A. (2023). *Evidencia de la actividad antifúngica y antimicrobiana de bacterias ácido lácticas en diversos sustratos fermentados para uso alimenticio*. *Polo del Conocimiento*, 8(2), 1453-1478.  
<https://www.polodelconocimiento.com/ojs/index.php/es/article/view/5254>.
- Isidra, M., & Valdés, O. (2022). *¿Cómo controlan las leguminosas el número de nódulos para evitar comprometer su crecimiento y desarrollo?. Revista de Educación Bioquímica*, 41(2), 51-65. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=106596>.
- Jiménez, A. de L. (2007). Composición y Procesamiento de la Soya para Consumo Humano. 32, 35-43.
- Jhariya, M., Banerjee, A., Yadav, D., & Raj, A. (2018). *Leguminous trees an innovative tool for soil sustainability*. *Legumes for soil health and sustainable management*, 315-345.  
[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-13-0253-4\\_10](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-13-0253-4_10).

- Jurado, F. (2022). *Utilización de leguminosas arbustivas en la elaboración de ensilaje para la alimentación de bovinos*. <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/13333>.
- Kamboj, R., & Nanda, V. (2018). *Proximate composition, nutritional profile and health benefits of legumes-a review*. *Legume Research-An International Journal*, 41(3), 325-332.  
<http://dx.doi.org/10.18805/LR-3748>.
- Kan, L., Nie, S., Hu, J., Wang, S., Bai, Z., Wang, J., & Song, K. (2018). *Comparative study on the chemical composition, anthocyanins, tocopherols and carotenoids of selected legumes*. *Food chemistry*, 260, 317-326.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.148>.
- Kiczorowski, P., Kiczorowska, B., Samolińska, W., Szmigielski, M., & Winiarska-Mieczan, A. (2022). *Effect of fermentation of chosen vegetables on the nutrient, mineral, and biocomponent profile in human and animal nutrition*. *Scientific Reports*, 12(1), 13422.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-17782-z>
- Kieliszek, M., Pobiega, K., Piwowarek, K., & Kot, A. (2021). *Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria*. *Molecules*, 26(7), 1858.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26071858>.
- Li, Y., Wang, S., Quan, K., Ma, D., Zhang, H., Zhang, W., & Sun, Z. (2022). *Co-administering yeast polypeptide and the probiotic, Lacticaseibacillus casei Zhang, significantly improves exercise performance*. *Journal of Functional Foods*, 95, 105161.  
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105161>.
- Lima, R. (2023). *Efecto de un plan de alimentación con probióticos sobre la hemoglobina glucosilada de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 del Centro de Salud Saucillo*.  
<https://repositorio.iberopuebla.mx/handle/20.500.11777/5874>.
- Liu, Y., Zhang, Z., & Hu, L. (2022). *High efficient freeze-drying technology in food industry*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(12), 3370-3388.  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1865261>.

- Liang, N., Neužil-Bunešová, V., Tejnecký, V., Gänzle, M., & Schwab, C. (2021). El ácido 3-hidroxiopropiónico contribuye a la actividad antibacteriana del metabolismo del glicerol por parte del microbio alimentario *Limosilactobacillus reuteri*. *Food Microbiology*, 98, 103720. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103720>
- López, J., Adriano, L., Gálvez, D., & Vázquez, A. (2023). *Compuestos bioactivos en quesos: biosíntesis, actividad biológica y contribución de las bacterias ácido lácticas*. *Agronomía Mesoamericana*, 51432-51432. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/index>.
- Los, F. G. B., Zielinski, A. A. F., Wojeicchowski, J. P., Nogueira, A., & Demiate, I. M. (2018). Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): Whole seeds with complex chemical composition. *Current Opinion in Food Science*, 19, 63-71. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.010>
- Macho-González, A., Bastida, S., Garcimartín, A., López-Oliva, M. E., González, P., Benedí, J., González-Muñoz, M. J., & Sánchez-Muniz, F. J. (2021). Functional Meat Products as Oxidative Stress Modulators: A Review. *Advances in Nutrition*, 12(4), 1514-1539. <https://doi.org/10.1093/advances/nmaa182>
- Margier, M., Georgé, S., Hafnaoui, N., Remond, D., Nowicki, M., Du Chaffaut, L., & Reboul, E. (2018). *Nutritional composition and bioactive content of legumes: Characterization of pulses frequently consumed in France and effect of the cooking method*. <https://doi.org/10.3390/nu10111668>.
- Martín, M. (2019). *Legumes: an overview*. *Legumes: Nutritional Quality, Processing and Potential Health Benefits*, 1-18. <https://doi.org/10.1039/9781788015721-00001>.
- Martínez, D. (2023). *Efecto de la liofilización del molusco abalón chileno "loco" al aplicar campo de pulsos eléctricos y cocción como pretratamientos para mejora en sus características fisicoquímicas y organolépticas*. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/195831>.
- Martínez, M. (2023). *Influencia de la microbiota intestinal en el sobrepeso y la obesidad*. *Revista Universitarios Potosinos*, (260). <https://leka.uaslp.mx/index.php/universitarios-potosinos/article/view/442>.

- Mananga, M., Didier, K., Taptue, C., Fadimatou, B., Ruth, D., Manga, G., Blaise, K., Michelle, D., Fokou, E., & Marie Modestine, K. S. (2021). Nutritional and Antinutritional Characteristics of Ten Red Bean Cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) from Cameroon. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 1-14.  
<https://doi.org/10.9734/ijbcrr/2021/v30i430259>
- Matos, C. (2020). *Nuevos usos de probióticos como moduladores de la microbiota intestinal en la elaboración de alimentos funcionales*. <https://riunet.upv.es/handle/10251/157949>.
- Mejia, A. (2023). Desarrollo de una hamburguesa a base de garbanzo (*cicer arietinum*) y yaca (pulpa y harina de semilla) (*artocarpus heterophyllus*) como alternativa de proteína animal [universidad agraria del ecuador].  
<https://cia.uagraria.edu.ec/archivos/mejia%20plua%20angie%20andrea.pdf>
- Middelbos, I. S., & Fahey, G. C. (2008). 9—Soybean Carbohydrates. En L. A. Johnson, P. J. White, & R. Galloway (Eds.), *Soybeans* (pp. 269-296). AOCS Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-64-6.50012-3>
- Molina, A. (2019). *Probióticos y su mecanismo de acción en alimentación animal*. *Agronomía Mesoamericana*, 601-611. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/index>.
- Moradi, M., Molaei, R., & Guimarães, J. (2021). *A review on preparation and chemical analysis of postbiotics from lactic acid bacteria*. *Enzyme and Microbial Technology*, 143, 109722.  
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109722>.
- Morales, D. (2022). *El consumo de alimentos fermentados y patologías respiratorias*.  
<http://hdl.handle.net/10609/146618>.
- Mosquera, E., Ayala, A., & Serna, L. (2019). *Ultrasonido y deshidratación osmótica como pretratamientos a la liofilización de melón (*Cucumis melo* L.)*. *Información tecnológica*, 30(3), 179-188. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642019000300179>.

Nordström, E., Teixeira, C., Montelius, C., Jeppsson, B., & Larsson, N. (2021).

*Lactiplantibacillus plantarum 299v (LP299V®): Three decades of research. Beneficial microbes, 12(5), 441-465.* <https://doi.org/10.3920/BM2020.0191>.

Navarro, S. L. B., & López, X. J. L. (2019). Evaluación de sustitución parcial de harina de trigo por harina de frijol *Phaseolus vulgaris* L. En la formulación de tortas. *Revista Científica de Ciencia y Tecnología El Higo, 9(1), 35-44.*

Ntatsi, G., Gutiérrez, M., Karapanos, I., Barros, A., Weiss, J., Balliu, A., & Savvas, D. (2018).

*The quality of leguminous vegetables as influenced by preharvest factors. Scientia Horticulturae, 232, 191-205.* <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.058>.

NTE INEN 0519. (1981). *Harinas de origen vegetal. Determinación de la proteína.*

NTE INEN 0521. (1981). *Harinas de origen vegetal. Determinación de la acidez titulable.*

NTE INEN 0523. (1981). *Harinas de origen vegetal. Determinación de la grasa.*

NTE INEN 0526. (1981). *Harinas de origen vegetal. Determinación de la concentración de ión hidrógeno.*

Oyinloye, T., & Yoon, W. (2020). *Effect of freeze-drying on quality and grinding process of food produce: A review. Processes, 8(3), 354.* <https://doi.org/10.3390/pr8030354>.

Parra, Y. (2020). *Aislamiento de bacterias ácido lácticas obtenidas de leches y queso Paraguay (Master's thesis, UNI-fcyt).* <http://hdl.handle.net/20.500.14066/3142>.

Park, M.-J., General, T., & Lee, S.-P. (2012). Physicochemical Properties of Roasted Soybean Flour Bioconverted by Solid-State Fermentation Using *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum*. *Preventive Nutrition and Food Science, 17(1), 36-45.*

<https://doi.org/10.3746/pnf.2012.17.1.036>

Park, J., & Kim, M. (2013). Comparison of Dry Medium Culture Plates for Mesophilic Aerobic Bacteria in Milk, Ice Cream, Ham, and Codfish Fillet Products. *Preventive Nutrition and Food Science, 18(4), 269-272.* <https://doi.org/10.3746/pnf.2013.18.4.269>

- Pedraza, L. (2023). *Aplicación de alimentos funcionales adicionados con probióticos del género Bacillus en el cultivo de Tilapia del Nilo (Oreochromis niloticus) para la optimización de respuesta frente a infecciones bacterianas*.  
<https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3902>.
- Pérez, R., & Trinidad, R. (2022). *Manual para el aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas*. <https://hdl.handle.net/20.500.12753/4303>.
- Piccioni, A., Franza, L., Vaccaro, V., Saviano, A., Zanza, C., Candelli, M., & Ojetti, V. (2021). *Microbiota and probiotics: the role of Limosilactobacillus reuteri in diverticulitis*. *Medicina*, 57(8), 802.
- Pons, M., & Rocher, I. (2020). *Beneficios de los alimentos funcionales probióticos*. In *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias (Vol. 28, No. 28, pp. 43-102)*. Real Academia de Ciencias Veterinarias. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?Codigo=8432876>.
- Ramírez, J., Cortés, M., & Hincapié, C. (2019). *Optimización del proceso de liofilización y comparación con el secado por convección de estragón ruso (Artemisia dracuncululus L.)*. *Acta Agronómica*, 68(3), 167-174. <https://doi.org/10.15446/acag.v68n3.75296>.
- Rech de Marins, A., Aparecida Ferreira de Campos, T., Pereira Batista, A. Ia, Correa, V. G., Peralta, R. M., Graton Mikcha, J. M., Gomes, R. G., & Feihmann, A. C. (2022). Effect of the addition of encapsulated Lactiplantibacillus plantarum Lp-115, Bifidobacterium animalis spp. Lactis Bb-12, and Lactobacillus acidophilus La-5 to cooked burger. *LWT*, 155, 112946. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112946>
- Robinson, P. K. (2015). *Enzymes: Principles and biotechnological applications—PMC*.  
<https://doi.org/10.1042/bse0590001>
- Rodríguez-Salgado, Á. M., Borrás-Sandoval, L. M., Rodríguez-Molano, C. E., Rodríguez-Salgado, Á. M., Borrás-Sandoval, L. M., & Rodríguez-Molano, C. E. (2019). *Compositional quality of food obtained with solid state fermentation: Potato and carrot*.

Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, 13(1), 81-88.

<https://doi.org/10.17584/rcch.2019v13il.8531>

Sánchez, S. (2020). Guía Práctica para la Determinación de grasa por el método Soxhelt.

Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Santo Domingo de los Tsáchilas.

Salehi, F. (2023). *Recent progress and application of freeze dryers for agricultural product drying. Chembioeng Reviews, 10(5), 618-627.* <https://doi.org/10.1002/cben.202300003>.

Sadler, G. D., & Murphy, P. A. (2010). Ph and Titratable Acidity. En S. S. Nielsen (Ed.), *Food Analysis* (pp. 219-238). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1478-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1478-1_13)

Santos-Vázquez, A. G., Velázquez-López, A. A., & Vela-Gutiérrez, G. (2020). Viabilidad de bacterias ácido lácticas en dos productos funcionales formulados con lactosuero y malanga. *Biotecnia, 22(3), 138-145.* <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i3.1234>

Schultze, R., Rao, I., Peters, M., Clements, R., Bai, C., & Liu, G. (2018). *Ropical forage legumes for environmental benefits: An overview. Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales, 6(1), 1-14.*

Serrano, J., & Goñi, I. (2004). Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 54(1), 36-44.*

Serrato C, A. M., & Bernal A., D. M. (2000). Aprovechamiento de la harina de soya desengrasada en la industria galletera [Universidad de La Salle Universidad de La Salle].

[https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?Article=1669&context=ing\\_alimentos](https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?Article=1669&context=ing_alimentos)

Souza, L. M. J. De, Costa, A. C., Nero, L. A., Couto, E. P., & Ferreira, M. De A. (2015).

Evaluation of petrifilm<sup>tm</sup> system compared with traditional methodology in count of indicators of sanitary-hygienic quality and pathogenic microorganisms in sheep milk.

*Food Science and Technology, 35, 375-379.* <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6430>

Stevanovic, T., & Ratti, C. (2020). *Freeze-drying of plant-based foods. Foods, 9(1), 87.*

<https://doi.org/10.3390/foods9010087>.



- Surco, J., & Alvarado, J. (2010). *Harinas compuestas de sorgo-trigo para panificación*. *Revista Boliviana de Química*, 27(1), 19-28.
- Torres y Torres, N., & Tovar-Palacio, A. R. (2009). La historia del uso de la soya en México, su valor nutricional y su efecto en la salud. *Salud Pública de México*, 51(3), 246-254.
- Vanlauwe, B., Hungria, M., Kanampiu, F., & Giller, K. (2019). *The role of legumes in the sustainable intensification of African smallholder agriculture: Lessons learnt and challenges for the future*. *Agriculture, ecosystems & environment*, 284, 106583. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.106583>.
- Varshney, R., Ojiewo, C., & Monyo, E. (2019). *A decade of Tropical Legumes projects: Development and adoption of improved varieties, creation of market-demand to benefit smallholder farmers and empowerment of national programmes in sub-Saharan Africa a*. <https://doi.org/10.1111/pbr.12744>.
- Velásquezl., Siche, R., Castro, W., (2015). Evaluación del marmolado de carne Bovina mediante imágenes hiperspectrales. (Tesis de pregrado) .Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú
- Villamar, A., Arturo, W., Murillo, R., & Vergara, L. (2022). *Respuestas agronómicas de gramíneas y leguminosas en el subtrópico ecuatoriano*. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 6(3), 268-282.
- Vinderola, G., & Pérez, G. (2021). *Alimentos fermentados y probióticos en niños. La importancia de conocer sus diferencias microbiológicas*. *Arch Argent Pediatr*, 119(1), 56-61. [https://sap.org.ar/uploads/archivos/general/files\\_ae\\_vinderola\\_11-12pdf\\_1607108353.pdf](https://sap.org.ar/uploads/archivos/general/files_ae_vinderola_11-12pdf_1607108353.pdf).
- Wang, D., Cheng, F., Wang, Y., Han, J., Gao, F., Tian, J., Zhang, K., & Jin, Y. (2022). The Changes Occurring in Proteins during Processing and Storage of Fermented Meat Products and Their Regulation by Lactic Acid Bacteria. *Foods*, 11(16), Article 16. <https://doi.org/10.3390/foods11162427>

- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
- Yilmaz, B., Bangar, S., Echeagaray, N., Suri, S., Tomasevic, I., Manuel, J., & Ozogul, F. (2022). *The impacts of Lactiplantibacillus plantarum on the functional properties of fermented foods: A review of current knowledge. Microorganisms*, 10. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040826>.
- Zamora, I., & Barboza, Y. (2020). *Consumo de alimentos funcionales por estudiantes universitarios Ecuatorianos. In Anales venezolanos de nutrición (Vol. 33, No. 1, pp. 14-23). Fundación Bengoa.*
- Zárate, E. (2020). *Modelamiento de la bioconservación de la hamburguesa de carne por productos orgánicos de bacterias ácido lácticas homofermentativas [universidad nacional del callao].* <https://doi.org/10.15332/dt.inv.2016.02535>