



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República

**Desarrollo de un sustituto de leche a partir de frijol
común (*Phaseolus vulgaris* L.)**

Tesis de Maestría

Como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

QFB. Adriana Chico Peralta

Dirigido por:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Co-dirigido por:

Dr. Eduardo Morales Sánchez

Santiago de Querétaro, Qro.

Centro universitario

Noviembre de 2015

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República

**“Desarrollo de un sustituto de leche a partir de frijol común
(*Phaseolus vulgaris* L.)”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

QFB. Adriana Chico Peralta

Dirigido por:

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Co-dirigido por:

Dr. Eduardo Morales Sánchez

Sinodales

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Presidente

Dr. Eduardo Morales Sánchez
Secretario

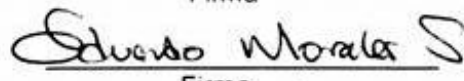
Dra. Marcela Gaytán Martínez
Vocal

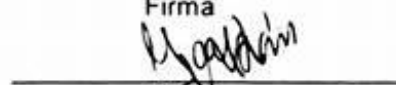
Dra. Rocío Campos Vega
Suplente

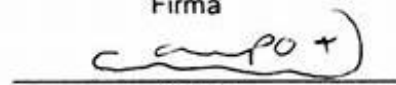
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Suplente

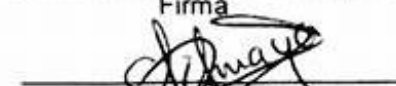

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad

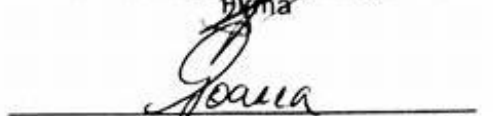

Firma


Firma


Firma


Firma


Firma


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre de 2015

Resumen

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es parte importante de la dieta en México y una fuente importante de compuestos con propiedades antioxidantes, antimutagénicas, anticarcinogénicas, hipogluceminante, antipertensiva e hipolipemiantes. Por otro lado, ya sea por intolerancia a la lactosa, por alergia a las proteínas de la leche, o bien para quienes llevan una dieta vegetariana existen en el mercado sustitutos de la leche de vaca preparados a partir de ingredientes como soya, coco, arroz, avena, almendras, etc. Aunque se ha reportado la elaboración de bebidas funcionales a partir de harina de garbanzo, amaranto y frijol aún no se ha reportado el uso de este último en la elaboración de sustitutos de leche de vaca. El objetivo del presente trabajo fue preparar una bebida a base de frijol con potencial nutracéutico que represente una alternativa más en el mercado de los sustitutos de leche de vaca. Para la metodología se usaron semillas de frijol común de la variedad Bayo Madero, mismas que, después someterse a remojo y a un proceso de extrusión para reducir los factores antinutricios, se molieron y usaron como ingrediente principal de la bebida para lo cual se mezcló con una emulsión preparada con emulsificante, vitaminas liposolubles, hidrocoloides, aceite, un ácido graso poliinsaturado y una sal de calcio. El contenido de proteína, lípidos, fibra y carbohidratos totales fue de 0.98, 0.88, 1.7 y 2.83 % respectivamente. El producto obtenido se caracterizó nutracéutica y sensorialmente. El contenido de compuestos fenólicos fue de 1.5 µg eq ácido gálico/ml de bebida, y la capacidad antioxidante fue de 5.5 µM de FeSO₄ para FRAP y de 1.2 µM de Trolox en DPPH. Se realizaron dos evaluaciones sensoriales, la primera fue de agrado global donde se encontró que el producto elaborado en el presente trabajo mostró mayor agrado en comparación con el producto comercial de almendra pero no sobre el producto comercial de soya. La evaluación sensorial de preferencia mostró que los panelistas preferían los productos saborizados con jarabe de chocolate y esencia de café.

Palabras clave: Frijol común, sustituto de leche, proceso de extrusión.

Abstract

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is an important crop in Mexico and it's an important source of compounds with antioxidant, antimutagenic, anticarcinogenic, hipoglicemic, antihypertensive and lowering lipid activity. By other side, a variety of reasons such as lactorse intolerance, cow's milk allergy as well as lifestyle choices like a vegetarian/vegan diet there have been developed substitutes of cow's milk made of vegetable sources such as soy, coconut, rice, oat, almonds, etc. There are reports of functional beverages made of chick pea, common bean and amaranth, there has not been reported the production of this kind of beverages with common bean. The aim of the present work was the development of a common bean based beverage with nutraceutical potential that could be an alternative in the market of non-dairy milk. It was used an extrusion process to reduce the antinutritional factors. The formulation of the beverage was made with extruded common bean flour as main ingredient, this was mixed with a mixture of emmulsificant, liposoluble vitamins, hidrocolloids, vegetable oil, poliinsaturated fatty acid and a source of calcium. Xhantan gum at 0.1 % and CMC also at 0.1% showed to provide acceptable viscosity and stability to the beverage, these attributes are important for the acceptability of potential consumers. The amount of protein, lipids, fiber and total carbohydrates were 0.98, 0.88, 1.7 and 2.83 % respectively. The amount of phenolic compounds was 1.5 eq gallic acid/ ml beverage, the antioxidant capacity was 5.5 μM of FeSO_4 in FRAP assay y de 1.2 μM of Trolox using DPPH assay. There were made two sensory evaluations wich showed higher preference of common bean beverage over the almond one but still lower than the soy one. Addition of flavors such as coffee and chocolate improved the acceptability of the panelists.

Key words: Common bean, non-dairy milk substitute, extrusion process.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al PROPAC por admitirme como alumna.

A la Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña por aceptarme en su grupo de trabajo, por guiar la presente investigación, por estar abierta a nuevas propuestas pero principalmente por su amabilidad y bondad.

A la Dra. Marcela Gaytán Martínez por guiarme a lo largo de este proyecto y por ser siempre una persona accesible, amable y paciente.

Al resto de mi comité por sus valiosas aportaciones encaminadas a la mejora del presente trabajo.

A los profesores del PROPAC por compartir sus valiosos conocimientos siempre en pro de la formación de sus alumnos.

Al personal administrativo del PROPAC por su amabilidad, eficiencia y ayuda.

A mis queridos amigos y compañeros de la maestría. Fue un gusto enorme compartir este ciclo con ustedes. De corazón les deseo éxito personal y profesional a cada uno de ustedes. Espero que aunque sea esporádicamente, la vida nos junte de nuevo.

A mis queridos amigos y compañeros del laboratorio, por hacer del lugar de trabajo un lugar agradable y alegre. Gracias además por su valiosa ayuda. Ustedes hicieron cortas las largas horas en el laboratorio.

Índice general

Resumen.....	iii
Abstract	iv
Agradecimientos.....	v
Índice general.....	vi
Índice de tablas	ix
Índice de figuras	x
I. Introducción	1
II. Antecedentes.....	3
2.1. Alimentos funcionales	3
2.2. Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	5
2.2.1. Generalidades	5
2.2.2. Composición química	7
2.2.3. Compuestos bioactivos.....	11
2.2.4. Factores antinutricios.....	18
2.3. Sustitutos de leche	21
2.3.1. Pre-tratamientos, extracción y producción.....	22
2.3.2. Formulación, aditivos y fortificación	23
2.3.5. Homogenización, estabilidad de la suspensión y pasteurización	26
2.3.6. Ejemplos de sustitutos de leche y su producción	27
2.4. Extrusión	31
III. Objetivos	34
3.1. Objetivo general	34

3.2	Objetivos particulares.....	34
IV.	Justificación.....	35
V.	Metodología.....	36
5.1.	Materiales y Reactivos	36
5.1.1.	Material biológico.....	36
5.1.2.	Reactivos.....	36
5.1.3.	Materia prima.....	37
5.2.	Metodología	37
5.2.1	. Materia prima.....	37
5.2.3	. Obtención del extrudido de frijol	37
5.2.4.	Determinación de factores antinutricios.....	38
5.2.5.	Formulación de la bebida	41
5.2.5.	Evaluación sensorial.....	44
5.3.	Determinación de parámetros fisicoquímicos del sustituto de leche de frijol.....	46
5.3.3.	Análisis proximal.....	47
5.3.4.	Composición nutracéutica	49
5.3.5.	Capacidad antioxidante	51
5.3.6.	Determinación de fibra soluble e insoluble	52
5.3.7.	Diseño experimental.....	53
VI.	Resultados y discusión	55
6.1.	Factores antinutricios en extrudidos de frijol.	55
6.1.1.	Concentración de inhibidores de tripsina.....	55
6.1.2.	Concentración de hemaglutininas.....	56
6.1.3.	Concentración de ácido fólico	57

6.2.	Formulación de la bebida	58
6.2.1.	Viscosidad de la base de frijol	58
6.2.2.	Formulación de la bebida	62
6.3.	Parámetros fisicoquímicos de la bebida.....	63
6.3.1.	Viscosidad y tasa de sedimentación.....	63
6.3.2.	pH y color	66
6.4.	Evaluación sensorial	67
6.4.1.	Evaluación sensorial de agrado.....	67
6.4.2.	Evaluación sensorial de preferencia.....	75
6.5.	Composición química y nutracéutica.....	78
6.5.1.	Composición química	78
6.5.2.	Composición nutracéutica	79
VII.	Conclusiones	83
VIII.	Bibliografía	85

Índice de tablas

Tabla 1. Composición química de frijol crudo.....	9
Tabla 2. Contenido de oligosacáridos, fenoles totales y taninos condensados	13
Tabla 3. Concentración de hemaglutinación/mg de proteína soluble	56
Tabla 4. Concentración de ácido fítico presente en la harina de frijol crudo y extrudido.....	57
Tabla 5. Ingredientes usados y su función	62
Tabla 6. Coordenadas cromáticas de los sustitutos de leche de frijol común, almendra y soya.....	66
Tabla 7. Comparación entre el nivel de agrado de los sustitutos de leche usando la prueba de chi cuadrado.....	75
Tabla 8. Comparación entre la preferencia de las bebidas saborizadas usando la prueba de chi cuadrado.....	77
Tabla 9. Contenido de proteína, lípidos, cenizas, carbohidratos y humedad en el sustituto de leche de frijol.	79
Tabla 10. Contenido de compuestos fenólicos en el sustituto de leche	81
Tabla 11. Porcentaje de fibra total, soluble e insoluble en el sustituto de leche	81

Índice de figuras

Figura 1. Cambio del papel de los alimentos según su actividad.....	5
Figura 2. Estructura del ácido fítico y su interacción con iones metálicos.....	21
Figura 3. Diagrama de un extrusor.....	33
Figura 4. Anverso y reverso del formato para evaluación sensorial de agrado	45
Figura 5. Formato para evaluación sensorial de preferencia	46
Figura 6. Coordenadas de color para el sistema CIELAB.	47
Figura 7. Diagrama de la metodología experimental.....	54
Figura 8. Inhibición de tripsina en extrudidos de frijol.....	55
Figura 9. Viscosidad en cP de base de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	60
Figura 10. Rampa de temperatura de la base de frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	61
Figura 11. Asentamiento relativa de la bebida usando goma xantana (GX) y carboximetil celulosa (CMC).....	65
Figura 12. Viscosidad de la bebida.	65
Figura 13. Frecuencia de nivel de agrado para el atributo color para los sustitutos de leche.....	69
Figura 14. Frecuencia de nivel de agrado para el atributo olor para los sustitutos de leche.....	71
Figura 15. Frecuencia de nivel de agrado para el atributo dulzor para los sustitutos de leche.....	73
Figura 16. Frecuencia de nivel de agrado para la variable agrado global para los sustitutos de leche.....	74
Figura 17. Proporción de preferencia global de cada bebida	76

I. Introducción

Llevar un estilo de vida más saludable motiva a los consumidores a buscar alimentos que además de nutrirlos les aporten un beneficio adicional a la salud, por ejemplo la prevención de enfermedades cardiovasculares, estos alimentos se conocen como alimentos funcionales. Las leguminosas, particularmente el frijol, han formado tradicionalmente parte de la alimentación en la región de Mesoamérica. Aún en nuestros días este alimento es considerado como uno de los pilares en la alimentación de estas regiones aunque los cambios en la alimentación tradicional por diversos factores, entre ellos la incorporación de alimentos ricos en grasas y almidones, han provocado la disminución en el consumo de esta leguminosa. Numerosas investigaciones han demostrado las propiedades nutraceuticas del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en la prevención de enfermedades no transmisibles como diabetes mellitus, obesidad, enfermedades cardiovasculares, hipertensión y cáncer. Por otro lado ya sea por alergias a los componentes de la leche de vaca, intolerancia a la lactosa o bien para llevar una dieta vegetariana libre de proteína animal existen en el mercado sustitutos a este tipo de leche preparados a partir de cereales como el arroz, semillas como las almendras, frutas como el coco o bien leguminosas como la soya. Teniendo en cuenta lo anterior el frijol y sus componentes se consideran de importante valor nutritivo, lo cual lo convierte en un ingrediente con alto potencial para desarrollar nuevos productos alimenticios como fuente de proteína, vitaminas, minerales y fibra dietética. Con el fin de diversificar su uso como ingrediente principal o como aditivo en alimentos, en el presente trabajo se buscó utilizar el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) como el ingrediente principal de un sustituto de leche y adicionalmente se determinaron sus características fisicoquímicas, nutraceuticas y sensoriales. La presente tesis está organizada de la siguiente manera: Un capítulo de antecedentes donde se describe al frijol común como fuente de compuestos nutricionales y funcionales y se hace una revisión de la literatura que comprende al proceso de extrusión y a las bebidas

preparadas a partir de fuentes vegetales; se plantean además el objetivo general y los objetivos particulares que se plantearon desde un inicio para el desarrollo del presente trabajo; otro capítulo de materiales y reactivos donde se describe la metodología usada en la realización de los objetivos planteados

II. Antecedentes

2.1. Alimentos funcionales

El término “Alimento funcional” se usó por primera vez en 1984 en Japón como resultado de un estudio sobre la relación entre nutrición, sensación de satisfacción, fortificación y modulación de sistemas fisiológicos, lo anterior describe a alimentos fortificados con constituyentes que poseen efectos fisiológicos que les darían ventaja sobre otros alimentos. Para definir mejor un alimento funcional es importante recordar que todos los alimentos tienen funciones nutricionales pero lo que los hace funcionales es el beneficio extra a la salud de quien los consume además de sus características nutritivas básicas. El objetivo de un alimento funcional es principalmente mejorar el estado general del cuerpo, disminuyendo el riesgo de enfermedades no transmisibles (Bigliardi y Galati, 2013). En la Figura1 se muestra que el papel de los alimentos funcionales es el de prevenir en general la aparición de enfermedades no transmisibles. Según la clasificación de alimentos funcionales propuesta por Bigliardi y Galati (2013) y Makinen, (2006) los beneficios de los mismos podrían agruparse en tres clases: beneficios directos sobre la salud, reducción del riesgo de enfermedades y mejores condiciones de vida.

La demanda de alimentos funcionales varía entre países y está influenciada principalmente por la alimentación tradicional, por la herencia cultural y en general por el interés de los consumidores. El éxito de los alimentos funcionales depende de la aceptación del consumidor para integrarlos a su dieta diaria (Annunziata y Vecchio, 2011). Durante la última década los requerimientos del consumidor en el campo de la producción de alimentos cambiaron considerablemente, de hecho, cada vez es más frecuente que el consumidor crea que los alimentos contribuyen directamente a su salud. Por lo tanto, los alimentos ya no sólo deberían satisfacer el hambre y proveer los nutrientes necesarios, sino

también prevenir enfermedades relacionadas a la nutrición así como mejorar el bienestar físico y mental. La demanda de alimentos funcionales está aunada a que el incremento en el costo de los servicios de salud, el incremento en la esperanza de vida el deseo de la gente mayor por mejorar su calidad de vida y en general por la demanda por un estilo de vida saludable. De entre las innovaciones en la industria alimenticia el área de desarrollo de alimentos funcionales es una de las más interesantes para la investigación e innovación (Bigliardi y Galati, 2013).

Los alimentos funcionales tienen como objetivo el beneficio fisiológico de un grupo de consumidores específicos, por ejemplo: grupos con riesgo en su salud, personas de la tercera edad, atletas, etc. La funcionalidad de estos alimentos está basada en los componentes bioactivos, los cuales pueden ser contenidos de forma natural en el producto, pero comúnmente se requiere del diseño de tecnologías apropiadas con el objeto de optimizar las propiedades benéficas deseadas (Korhonen, 2002).

Con este fin es necesario el desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías. La aplicación de tecnologías de procesamiento ha sido enfocado a dos aspectos, el primero es retener la bioactividad al máximo durante el procesamiento y almacenamiento de los productos formulados; y el segundo es liberar los componentes bioactivos deseados en el sitio requerido del cuerpo (Bellisle *et al.*, 1998).

Los alimentos promotores de la salud pueden también presentar desafíos con respecto a su posición regulatoria y el desarrollo de estrategias para lanzarlos al mercado. Finalmente, estos productos tienen que reunir la aceptación del consumidor, en términos de eficacia documentada, propiedades sensoriales y precio. En la figura 1 se muestra de manera gráfica el papel preventivo de los alimentos funcionales con respecto a los medicamentos (Hasler, 1998; Torruco-Uco *et al.*, 2009).

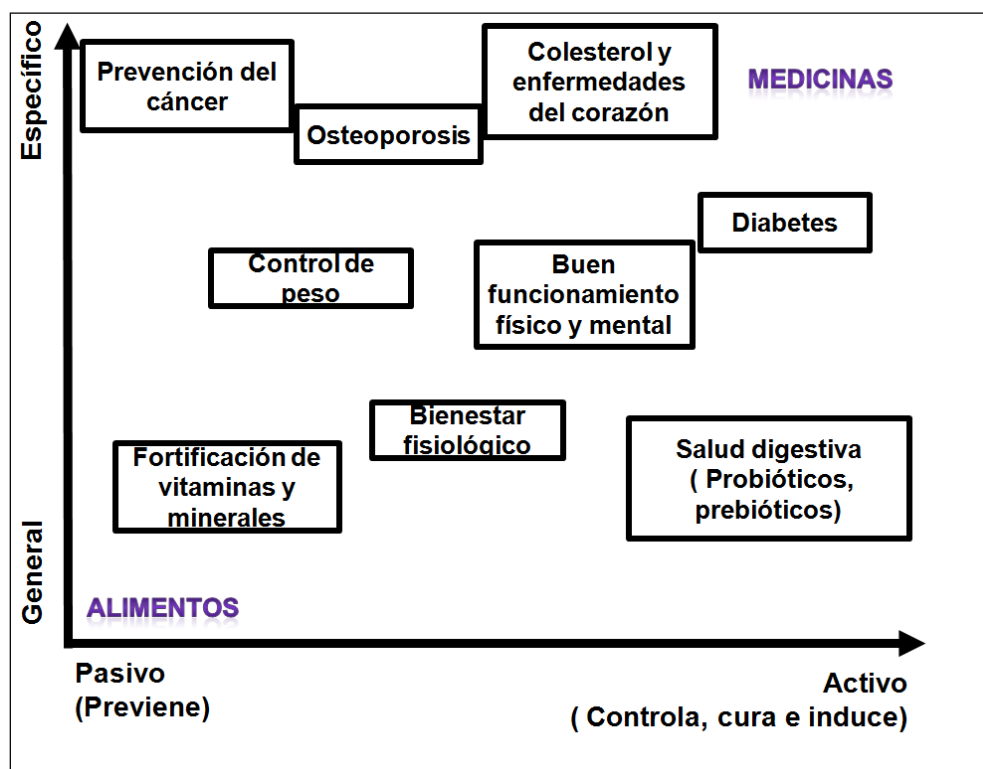


Figura 1. Cambio del papel de los alimentos según su actividad. (Torruco-Uco *et al.*, 2009)

2.2 Frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

2.2.1. Generalidades

Las leguminosas han constituido una fuente importante de proteína, vitaminas, minerales y calorías para muchas personas en el mundo debido a su bajo costo. La demanda de proteína de origen animal será poco sustentable en el futuro, por lo tanto resulta importante el papel que jugarán las proteínas de origen vegetal en el futuro de la alimentación de la población (Hellendoorn, 1976). En muchos países las leguminosas constituyen uno de los principales suministros de proteína dietética (SAGARPA, 2007). Las leguminosas contienen de dos a tres

veces más proteína que los cereales además en el caso de personas de bajos recursos y vegetarianos constituyen la principal fuente de proteína (Jiménez-Martínez *et al.*, 2003). De entre estas el frijol común es un cultivo que históricamente se ha asociado con el desarrollo de culturas prehispánicas y actualmente juega un papel primordial como cultivo tradicional en varias regiones del mundo. En nuestro país la variedad *Phaseolus vulgaris* L. es el segundo producto, después del maíz, más importante en el sector agroalimentario, no sólo por ser una fuente de ingresos para miles de productores sino también por ocupar un lugar importante dentro de la dieta de la población (Paredes-Lopez *et al.*, 2006). Debido al urbanismo, la migración, el crecimiento poblacional, el empleo, el poder adquisitivo, el clima, la reducción en el número de miembros de las familias y la incorporación de la mujer a la actividad laboral su consumo ha disminuido (SAGARPA, 2007).

Aunque el consumo de frijol común está fuertemente arraigado en México el número de kg *per capita* para 2012 era de 11 kg/persona/año (Secretaría de economía, 2012).

El frijol juega un papel muy importante en la dieta de América latina, ya que provee nutrimentos como proteína, ácidos grasos esenciales, carbohidratos complejos, vitaminas y minerales su consumo se asocia a un menor riesgo de cáncer, diabetes y enfermedades cardiovasculares, etc. Estos efectos fisiológicos podrían deberse a los fitoquímicos que contiene, incluyendo a los compuestos polifenólicos (Paredes-Lopez *et al.*, 2006).

En todo el mundo y especialmente en los países en vías de desarrollo la dieta se basa normalmente en el consumo de un cereal, por lo general maíz, sorgo o arroz, y de leguminosas, ya sean frijoles comunes o cualquier otra. Estos dos tipos de alimentos han mostrado complementarse nutritivamente entre sí debido a la composición de aminoácidos esenciales de cada componente. Las proteínas del maíz son deficientes en lisina y triptófano pero tienen cantidades considerables de aminoácidos que contienen azufre (metionina y cisteína). Las proteínas de las

leguminosas son una fuente relativamente abundante de lisina y triptofano pero un contenido bajo de aminoácidos azufrados. (Paredes-Lopez *et al.*, 2006).

Del frijol sin cáscara puede hacerse harina fácilmente, similar a otras harinas comerciales, incrementando así las opciones para el consumo de frijol. El tratamiento por calor puede ofrecer varios perfiles de sabor para incrementar la preferencia del consumidor (Oomah *et al.*, 2014).

2.2.2 Composición química

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una fuente de proteína, algunas vitaminas, minerales, y rico en carbohidratos complejos. Como otras leguminosas, el frijol común contiene numerosos compuestos bioactivos que incluyen inhibidores de enzimas, lectinas, fitatos, oligosacáridos y compuestos fenólicos.

Algunas de estas sustancias se han considerado como factores antinutricionales debido a su efecto sobre la calidad de la dieta. Los inhibidores enzimáticos pueden reducir la digestibilidad de proteínas y la lectina puede disminuir la absorción de nutrientes, pero al ser termosensibles estos dos compuestos tienen un mínimo efecto después de la cocción (Vergara *et al.*, 2010).

Los carbohidratos son el componente mayoritario de las semillas de leguminosas (55-65%), de esto, el almidón (22-45%) y fibra dietética o polisacáridos diferentes del almidón (éstos incluyen todas las fracciones de carbohidratos y fibra dietética: soluble e insoluble, pectinas, gomas, hemicelulosas, inulina y otras) son los constituyentes mayoritarios. El frijol común contiene además oligosacáridos los cuales están relacionados con la incomodidad y la flatulencia en quien los consume (Campos-Vega *et al.*, 2009).

La fibra dietética tiene beneficios a la salud entre los que se incluyen su efecto laxante, atenúa los niveles de colesterol y glucosa en la sangre, e incrementa la pérdida fecal de ácidos biliares. Los polisacáridos distintos al almidón son sustratos potenciales para la fermentación en el colon ya que se trata de un compuesto bifidogénico, es decir sustancias de los alimentos no digeridas por las enzimas gastrointestinales y que tienen un efecto benéfico para el organismo por estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de un número limitado de bacterias colónicas capaces de producir ácidos grasos de cadena corta, como el acético, propiónico y butírico (Campos-Vega *et al.*, 2009; Granito *et al.*, 2002).

El ácido butírico es la principal fuente de energía para las células del epitelio intestinal (Hague *et al.*, 1996) y ha sido estudiado ampliamente ya que se ha demostrado su efecto en la expresión de genes, crecimiento celular y diferenciación en células animales (Furusawa *et al.*, 2013).

Estudios previos demostraron que el frijol común, variedades Negro 8025 y Bayo Madero contienen sustratos fermentables que previene el desarrollo de cáncer de colon a través de la modulación de genes y proteínas involucradas en la apoptosis, proliferación, arresto al ciclo celular e inflamación.

El Cultivar Negro 8025 disminuyó el desarrollo de estadios tempranos de cáncer de colon inducido químicamente en ratas, mientras que el cultivar Bayo Madero mostró efecto quimiopreventivo para varios mecanismos moleculares en células de adenocarcinoma de colon humano HT-29 (Vergara-Castañeda *et al.*, 2010); (Campos-Vega *et al.*, 2010).

Cabe destacar que el frijol del cultivar Bayo Madero cocido mostró el mayor rendimiento de polisacáridos y almidón resistente comparado con otras variedades (Azufrado, Negro y Pinto) de consumo común en México basados en preferencias regionales (Vergara-Castañeda *et al.*, 2010). La composición química de la variedad una variedad de frijol común estudiada por de Almeida Costa *et al.* (2006) se muestra en la tabla 1.

El contenido de proteína entre las especies de *Phaseolus* va del 20-30% de su peso seco. Las proteínas que contiene el frijol son ricas en aminoácidos como tirosina, lisina y prolina, y escasamente triptófano, metionina y cisteína lo que es común entre las leguminosas.

Tabla 1. Composición química de frijol crudo

	Frijol crudo
Proteínas	20.9 $\pm$ 1.49
Lípidos	2.49 $\pm$ 0.22
Cenizas	3.80 $\pm$ 0.27
Humedad	9.93 $\pm$ 0.42
Carbohidratos	54.3 $\pm$ 2.94
Fibra cruda	8.55 $\pm$ 3.31

Los resultados están expresados como porcentaje por 100 gramos de muestra seca, son el promedio de dos experimentos independientes con dos repeticiones $\pm$ el error estándar. (de Almeida Costa *et al.* 2006)

Éstas se encuentran distribuidas en el cotiledón (27 %), eje embrionario (48%) y cascarilla (5%) (Bello-Pérez y Paredes-López, 2009). Se ha reportado que la baja disponibilidad de cisteína en frijol ha sido relacionada con su alto contenido de polifenoles, estos compuestos especialmente durante tratamientos térmicos pueden reaccionar con la proteína haciendo a este aminoácido biológicamente no disponible (Paredes-Lopez *et al.*, 2006).

Por otra parte la lisina es el principal aminoácido deficiente en proteínas vegetales, el frijol destaca por su alto contenido de éste, ya que satisface más del 500% de los requerimientos en adultos y 150% en niños según la ONU/FAO/WHO (Hutchins *et al.*, 2012).

Vergara *et al.*, (2010) reportaron que el contenido de proteína del frijol común cultivar Bayo Madero aumenta de 18.7 a 19.7% en el proceso de cocción aunque varía según el cultivar (Reyes-Moreno y Paredes-López, 1993). El contenido de proteína en la fracción no digerible de una muestra de frijol Bayo Madero (fracción del alimento que resiste la digestión y llega al colon) fue menor que la encontrada en el frijol crudo y cocido y mostró gran digestibilidad lo cual sugiere que la mayor parte de la proteína se digiere y posteriormente es altamente biodisponible en el tracto gastrointestinal superior. (Vergara-Castañeda *et al.*, 2010).

Sus proteínas son la vicilina, legumina y la fitohemaglutinina. La vicilina es un trímero de aproximadamente 150-190 kDa cuya unidad básica es de 50 kDa, su estructura es una globulina 7S comúnmente llamada faseolina (Rui *et al.*, 2011). Comprende de 3-5 subunidades y representa el 50% del total del contenido de proteína, se ha reportado su punto isoeléctrico en el rango de pH de 4.7 a 5.9 (Yin *et al.*, 2010). La legumina es una globulina de 11-12 S de 300-400 kDa, consta de 6 subunidades unidas por puentes disulfuro y compuesta tanto por aminoácidos ácidos y básicos. Cada subunidad puede dividirse en una unidad ácida de peso molecular de alrededor de 40 kDa y una unidad básica de 20 kD, usualmente sedimenta con la vicilina mientras que la PHA se compone de polipéptidos de 27-37kDa (Gepts y Bliss, 1986; Kohnhorst *et al.*, 1990; Sathe, 2002).

Las propiedades térmicas de las proteínas son un factor de interés debido a que el frijol contiene factores antinutricios y se necesita un tratamiento térmico para inactivarlos. Las temperaturas de desnaturalización para las proteínas del frijol reportadas están en el rango de 84°C a 91°C. Las propiedades térmicas de las proteínas de frijol afectan su funcionalidad (Rui *et al.*, 2011).

Se sabe que el consumo frecuente de frijol reduce la incidencia de enfermedades cardíacas, diabetes, cáncer de colon e hipertensión (Ariza-Ortega *et al.*, 2014; Mojica *et al.*, 2015). Se han reportado numerosos aislados de proteínas de leguminosas tales como la soya y del frijol común o bien producidos durante la digestión gastrointestinal de los alimentos, que inhiben a la enzima convertidora de angiotensina (ECA) disminuyendo así la presión arterial (Guzmán-Uriarte *et al.*, 2013).

Se cree que el ácido fítico inhibe la digestión de almidón ya que estructuralmente el ácido fítico se une directamente al almidón por puentes fosfato reduciendo la digestibilidad de este. Indirectamente el ácido fítico podría unirse a cationes tales como el Ca. Dado que la estabilidad de α -amilasa, incluyendo la pancreática, es dependiente de Ca, la falta de Ca disponible puede disminuir la efectividad de la α -amilasa, reduciendo el índice de digestión del almidón lo que podría resultar en una nutrición deficiente. El ácido fítico también se une a grupos negativamente cargados de proteínas, tales como α -amilasas tanto a pH neutro como alcalino, reduciendo así la digestión de almidón (Hutchins *et al.*, 2012).

2.2.3. Compuestos bioactivos

Entre los alimentos que se consideran funcionales se han promovido ampliamente a los alimentos con probióticos. Se ha observado que al enriquecer un alimento probiótico con carbohidratos como fructanos aumenta la sobrevivencia de células bacterianas usadas como probióticos (lactobacilos) en ambientes ácidos (Corcoran *et al.*, 2005). Por otro lado se ha descrito una gran variedad de péptidos bioactivos provenientes de diversas fuentes vegetales que si bien, tienen efectos menos potentes que un fármaco, pueden tener un efecto acumulativo en los tejidos y ejercer acciones preventivas, principalmente en enfermedades no transmisibles, lo que les confiere un gran potencial como ingredientes funcionales (Li-Chan, 2015). Algunos oligosacáridos y compuestos fenólicos presentes en el

frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (tabla 2) se han asociado con la prevención y/o regulación de enfermedades no transmisibles como obesidad, diabetes, enfermedad coronaria y cáncer (Zhu *et al.*, 2012; Oomah *et al.*, 2014).

El creciente interés en las propiedades nutracéuticas del frijol común se debe a que se ha comprobado que cuando su consumo es constante, éste ejerce un efecto positivo en el metabolismo. La mayoría de las variedades de frijol tienen un bajo índice glicémico en contraste con alimentos con índice glicémico alto como arroz blanco y pan blanco que podrían elevar la glucosa posprandial y como resultado incrementar el nivel oxidativo, enfermedades cardiovasculares y cáncer. Éstos efectos son atribuidos a varios fitoquímicos presentes en el frijol principalmente asociado a compuestos fenólicos como las antocianinas, taninos y flavonoides (Cardador-Martínez *et al.*, 2002). Se ha demostrado que el consumo de 40 gramos de frijol cocido al día puede prevenir la formación de tumores de colon en modelos animales (Reynoso Camacho *et al.*, 2007; Hutchins *et al.*, 2012).

La cáscara del frijol tiene un alto contenido de oligosacáridos (Campos-Vega *et al.*, 2009). Tales compuestos tienen la capacidad de estimular el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos en estudios *in vitro* y consecuente producción de ácidos grasos de cadena corta como resultado de la fermentación de tales oligosacáridos se ha relacionado a su efecto prebiótico (Roberfroid, 2001).

El extracto metanólico de la cáscara de frijol negro ha mostrado actividad antimutagénica y potencial efecto quimiopreventivo debido a su alto contenido en compuestos fenólicos (Aparicio-Fernández *et al.*, 2006). Como lo resaltan (Vergara-Castañeda *et al.*, 2010) el incremento de compuestos fenólicos en el frijol cocido podría atribuirse a la hidrólisis térmica de los complejos formados por los compuestos fenólicos y otros componentes como proteína y almidón en el frijol crudo.

Tabla 2. Contenido de oligosacáridos, fenoles totales y taninos condensados de de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) crudo, cocido y FND cultivar Bayo Madero

	Rafinosa	Estaquiosa	Verbascosa	Oligosacáridos totales	Fenoles totales	Taninos condensados
	(mg/ g muestra seca)					
Frijol crudo	12.3 ± 0.1 ^a	42.9 ± 0.1 ^b	4.6 ± 0.1 ^a	59.6 ± 0.2 ^a	0.7 ± 0.1 ^b	7.4 ± 0.1 ^c
Frijol cocido	10.4 ± 0.2 ^b	43.3 ± 0.1 ^a	2.1 ± 0.1 ^b	55.8 ± 0.2 ^b	1.0 ± 0.1 ^b	8.9 ± 0.1 ^b
FND	1.5 ± 0.1 ^c	13.8 ± 0.1 ^c	0.5 ± 0.1 ^c	15.8 ± 0.1 ^c	13.8 ± 0.7 ^a	14.0 ± 0.1 ^a

^aFND: fracción no digerible. Letras diferentes en cada columna expresan diferencias significativas ($\alpha 00.05$) por la prueba de Tukey. ^bLos resultados son el promedio de dos experimentos independientes con duplicado $\pm$ el error estándar. ^c Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes con duplicado $\pm$ el error estándar. Vergara *et al.*, (2010)

2.2.3.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son excelentes antioxidantes y fueron efectivos contra la proliferación de cáncer de colon, pecho y próstata. Además se ha sugerido que los flavonoides extraídos de frijol negro reducen el daño al hígado en modelos animales (Oomah *et al.*, 2014).

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo de micronutrientes presentes en productos vegetales, constituidos por anillos aromáticos, con uno o más grupos hidroxilo incluyendo derivados funcionales como ésteres, metil ésteres, glicosídicos, etc. La capacidad antioxidante es uno de los mecanismos más importantes de prevención o retraso del inicio de la mayoría de las enfermedades no transmisibles incluyendo cáncer, enfermedades coronarias, arteriosclerosis entre otras. Se ha demostrado que pueden inhibir el crecimiento

de células cancerígenas y poseen actividad antimutagénica (Cardador-Martínez *et al.*, 2002; Vergara-Castañeda *et al.*, 2010)

Se propone por en estudios hechos *in vitro* e *in vivo* que los compuestos fenólicos de frijol negro pueden tratar, prevenir y o inhibir el crecimiento de células cancerígenas o de mama, próstata, colon, hígado, leucemia, además de inhibir la síntesis de colesterol (reduciendo la oxidación de LDL), reduce los síntomas e absorción de calcio en mamíferos postmenopáusticos y previene enfermedades crónicas como la cirrosis en modelos animales (Gutierrez-Urbe *et al.*, 2005). Estos efectos benéficos resultan de la sinergia potencial entre los compuestos fenólicos (antocianinas, flavonoides, proantocianidinas, flavonas) y otros fitoquímicos (saponinas, lectinas, fitoesteroles) en frijol negro o en sus extractos de cáscara (Chávez-Santoscoy *et al.*, 2013). Los compuestos fenólicos se concentran en la cáscara por lo que el frijol sin cáscara contiene una menor cantidad de estos (Oomah *et al.*, 2005).

2.2.3.1.1. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos. Estos compuestos poseen propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tiene efectos terapéuticos en un elevado número de patologías. Diversos autores han reportado que los flavonoides son los compuestos fenólicos principales del cotiledón como de la cascarilla (Cardador-Martínez *et al.*, 2002).

En el caso de la cáscara de frijol koreano se ha demostrado su potencial como inhibidor de tumores. Se sabe que este frijol cuenta con una alta cantidad de flavonoides en la cáscara de variedades pigmentadas encontrándose que la

cáscara de frijol demostró inhibir la proliferación e indujo apoptosis celular en células HT-29; éstos efectos concordaron con la activación de AMPK (AMP-activated protein kinase por sus siglas en inglés), así también se observó un incremento en la expresión de proteínas antitumorales p53, p21 y caspasa 3. La activación de AMPK también muestra activación por selenio tanto *in vivo* como *in vitro* (Lee *et al.*, 2009).

La alta ingesta de flavonoides provenientes del frijol, particularmente kaempferol, tienen una alta biodisponibilidad, lo que se asocia con el índice de masa corporal y podría reducir el riesgo de enfermedad cerebrovascular, además contribuye a mejorar la biodisponibilidad del hierro (Bonetti *et al.*, 2007). La remoción de la cáscara y la consecuente remoción de polifenoles del grano entero llevan a un decremento en la absorción de hierro en humanos (Oomah *et al.*, 2014). El contenido de flavonoides y el flavonol son mejores indicadores de la actividad antioxidante más que de la actividad antiradical (Oomah *et al.*, 2005).

2.2.3.1.2. Saponinas

Las saponinas son metabolitos secundarios de plantas que existen en una amplia variedad de leguminosas. Son moléculas anfipáticas que contienen una aglicona triterpenoidea y carbohidratos unidos por enlaces éter y éster a uno o más sitios de glicosilación. Las saponinas se han detectado en cantidades significativas en tejidos de frijol negro (Guajardo-Flores *et al.*, 2012). Las saponinas se dividen en grupos de acuerdo a su estructura.: el grupo A corresponde saponinas que tienen grupos glicosil en las posiciones C-3 y C-22 de la aglicona mientras que las saponinas del grupo B están glicosiladas sólo en la posición C-3 y en la posición C-22 tienen un grupo hidroxilo. Las saponinas del grupo B también están presentes en plantas como conjugados de 2,3- dihidro-2,5- dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona (DDMP) en el C-22- Las saponinas incrementan los esteroides fecales y disminuyen colesterol en sangre (Yoshiki *et al.*, 1998). El

contenido total de saponinas correlaciona con la inhibición de la solubilidad del colesterol micelar. Hay reportes que sugieren el uso de saponinas para la solubilización compuestos débilmente solubles en agua en los cuales se observa el efecto en la reducción de la formación de micelas de colesterol (Cohn *et al.*, 2010; Chávez-Santoscoy *et al.*, 2013).

2.2.3.1.3. Antocianinas

Las antocianinas son compuestos que contribuyen a la coloración de la semilla de frijol común, especialmente en variedades oscuras. Se ha reportado que tienen efecto antiproliferativo en la sobrevivencia de adenoma de colon, en especial la quercetina y se propuso que actúan induciendo el arresto al ciclo celular y apoptosis en líneas celulares de cáncer de colon humano (Aparicio-Fernández *et al.*, 2006). Estos compuestos disminuyen con el almacenamiento y tratamiento térmico (Aparicio-Fernandez *et al.*, 2005).

2.2.3.1.4. Taninos condensados

Los taninos condensados son compuestos fenólicos hidrosolubles con un peso molecular comprendido entre 500 y 3000 Daltons (D). Estos compuestos tienen una gran cantidad de grupos hidroxilo, entre otros grupos funcionales capaces de unirse a proteínas y otras macromoléculas (Oomah *et al.*, 2005).

2.2.3.2. Fibra

El almidón del frijol común tiene efecto análogo al de la fibra dietética ya que no es degradado por las enzimas digestivas del hombre, llega intacto al

intestino grueso donde es fermentado y brinda sus beneficios al organismo. El almidón resistente presente en el frijol común se incrementa después de someterse a un proceso térmico (Osorio-Díaz *et al.*, 2003).

Todas las variedades de frijol contienen una tasa alta de almidón de lenta y de rápida digestión en comparación con otras comidas ricas en almidón. En general, el frijol contiene del 30-40% de amilosa, un polímero lineal de unidades de glucosa, mientras que otros almidones contienen sólo del 20-30% de amilosa.

Los almidones con más del 30% de amilosa pueden ser de digestión rápida o bien almidón resistente, dependiendo del contenido de amilosa y del tratamiento hidrotérmico aplicado al alimento. El frijol también contiene una cantidad substancial de almidón resistente, considerado como fibra dietética (Hutchins *et al.*, 2012). Este tipo de almidón se define como cualquier almidón que resista la digestión por la amilasa en el intestino delgado y que pasa hacia el intestino grueso para ser fermentado por la microbiota (Noah *et al.*, 1998). El almidón de lenta digestión se asocia con la reducción el índice glicémico y la disminución de los niveles de glucosa posprandial en comparación con los almidones de rápida digestión. Esta respuesta glicémica atenuada puede beneficiar a individuos con resistencia a la insulina y a individuos con diabetes (Hutchins *et al.*, 2012).

2.2.3.3. Péptidos

Una consecuencia intrínseca de la digestión de las proteínas es su fragmentación en péptidos ya sea en el tracto digestivo o bien previo a su ingesta (Segura-Campos *et al.*, 2014; Luna-Vital *et al.*, 2015). Los hidrolizados de proteína se usan para obtener fracciones de la misma y péptidos bioactivos, los cuales son cadenas pequeñas de aminoácidos (de 2 a 15), éstos se han aislado de fuentes animales y vegetales (Megías *et al.*, 2004). Los que provienen de fuentes vegetales muestran diversos efectos biológicos como propiedades

antihipertensivas, opioides, antioxidantes, anticolesterolémicas, antimicrobianas, antitrombótica, anticancerígenas e inmunomoduladoras (Shahidi y Zhong, 2008). Lo anterior hace de los vegetales una fuente atractiva para la extracción de péptidos bioactivos, particularmente en el sector de alimentos y farmacéutico.

Las proteínas de origen vegetal son de particular interés y las leguminosas tienen un potencial prometedor debido al alto contenido de proteína y las diversas actividades fisiológicas benéficas que tienen en el organismo, incluyendo el efecto antihipertensivo (Roy *et al.*, 2010). Un ejemplo de la funcionalidad de los péptidos lo muestran (Torruco-Uco *et al.*, 2009) quienes evaluaron la actividad antioxidante y antihipertensiva de los péptidos obtenidos de la hidrólisis de proteína de *Phaseolus vulgaris* L. con las enzimas Alcalasa® y Flavorzima®. Desde el punto de vista de la comercialización la mezcla de péptidos, y no sólo uno de éstos, debería usarse como ingrediente en alimentos funcionales. (Wu y Ding, 2001) observaron el efecto antihipertensivo de péptidos derivados de proteína de soya en ratas hipertensas y (Valdez-Ortiz *et al.*, 2012) encontraron buena capacidad antioxidante en hidrolizados de frijol común así como un buen balance de aminoácidos aromáticos y aminoácidos esenciales.

2.2.4. Factores antinutricios

2.2.4.1. Inhibidores de tripsina

Los inhibidores de proteasas presentes en las leguminosas protegen a las semillas del ataque de depredadores (Kansal *et al.*, 2008). Estos compuestos pueden por tanto, impactar el valor nutricional debido a que inhiben a enzimas secretadas por el páncreas lo que resulta en una pobre digestión de proteínas y por tanto afecta el crecimiento de los organismos que las ingieren. Los inhibidores de proteasas pueden pertenecer a dos familias: Kunitz y Bowman-Birk, este último es el que está presente en el frijol común (Lajolo y Genovese, 2002). El efecto de

tales compuestos en el crecimiento de los organismos no sólo es resultado de la inhibición de la digestión ya que también se ha observado tal efecto en organismos alimentados sólo con aminoácidos. Los inhibidores de tripsina causan hipertrofia e hiperplasia del páncreas y por tanto hipersecreción de enzimas digestivas. Lo anterior conduce a la pérdida de proteínas endógenas ricas en azufre, la tripsina y la quimiotripsina, lo cual inhibe el crecimiento ya que las leguminosas son deficientes en aminoácidos azufrados. Los inhibidores de tripsina suprimen la regulación por retroalimentación negativa de la secreción pancreática al incrementar la liberación de la hormona colecistoquinina de la mucosa intestinal (Guillamón *et al.*, 2008).

Entre los métodos por los cuales se reduce el contenido de inhibidores de tripsina el proceso de extrusión a alta presión y temperatura es el único que ha mostrado ser 100 % efectivo en la destrucción de inhibidores de tripsina, aunque la destrucción térmica de tales compuestos depende de la temperatura, tiempo, tamaño de partícula y condiciones físicas del producto (Rackis *et al.*, 1986).

También se ha visto que la combinación de altas presiones hidrostáticas, tiempo de tratamiento y temperatura afectan la estructura de la proteína, probablemente al romper los enlaces covalentes (disulfuro) y no covalentes (iónicos, puentes de hidrógeno, hidrofóbicos) (Guerrero-Beltrán *et al.*, 2009) .

2.2.4.2. Lectinas

Las lectinas al igual que los inhibidores de tripsina son proteínas de auto-defensa de las plantas. Se conoce que causan inflamación intestinal cuando se consumen leguminosas sin tratamiento térmico (Ghosal *et al.*, 2011). El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) contiene cuatro tetrámeros de lectinas (también llamadas fitohemaglutininas) consistentes en combinaciones de subunidades E (eritroaglutinina) y L (leucoaglutinina). El intestino delgado de los mamíferos está recubierto por vellosidades altamente glicosiladas con N- y O- oligosacáridos

producidos por eritrocitos. Se sabe además que la glicosilación de transportadores en las vellosidades del intestino es importante en la absorción de colesterol, algunas vitaminas, hierro y aniones (Ghosal *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). Se conoce también que los glicanos de las proteínas de membrana que actúan como transportadores, enzimas, hormonas o receptores de factores de crecimiento actúan como reservorios de factores de crecimiento externos, hormonas y bacterias, las lectinas exógenas u otra proteína que se una a carbohidratos puede interferir con los eventos de señalización importantes. Las fitohemaglutininas pueden, por tanto, dañar el intestino ya que además de interferir con los procesos ya mencionados presentan una alta resistencia a la degradación por enzimas digestivas (Ogawa y Date, 2014).

2.2.4.3. Ácido fítico

El ácido fítico es un compuesto cíclico (1, 2, 3, 4, 5, 6-hexacis dihidrógeno fosfato mioinositol) es una forma común de almacenamiento de fósforo en semillas (Guttieri *et al.*, 2004). Como resultado de tener cargas negativas incluso a rangos amplios de pH presenta una alta afinidad al ligamiento de iones metálicos tales como calcio, zinc y hierro (Figura 2). Lo anterior interfiere con la absorción de tales minerales en el intestino delgado y tiene por tanto efectos adversos en diversos procesos metabólicos (Shamsuddin *et al.*, 1996). Además el ácido fítico forma complejos con proteínas y almidón lo que resulta en la baja digestibilidad de dichos nutrimentos. El fósforo del ácido fítico no está disponible para su absorción por animales monogástricos. A pesar de sus efectos adversos también ha mostrado ser un antioxidante y tener efecto quimiopreventivo en cáncer colorectal (Makkar *et al.*, 2007).

leche de vaca (Santos *et al.* 2014). La intolerancia a la lactosa varía entre grupos étnicos, por ejemplo, sólo el 20% de los europeos caucásicos y sus descendientes presentan dicha intolerancia, pero la mayor prevalencia se encuentra entre los hispanos y negros (50-80%) y casi el 100% de los asiáticos y nativos americanos. Varias bebidas preparadas a partir de soya, arroz, trigo y maíz podrían tener potencial en el mercado debido a la creciente demanda de sustitutos de la leche de vaca. (Bernat *et al.*, 2014). Las bebidas preparadas con leguminosas que existen en el mercado contienen de 1.5 a 3.0% de proteína y su perfil de aminoácidos esenciales, excepto por la metionina, es similar al de la leche de vaca (Jiménez-Martínez *et al.*, 2003).

En China, es común el consumo de sustitutos de leche de soya cuya producción se ha extendido ampliamente a Occidente. La leche de coco se consume abundantemente en el sureste asiático, a ésta se le atribuye la reducción de niveles de colesterol LDL y aumento en los niveles de colesterol HDL en población de Sri Lanka, India, Filipinas e Indonesia (Ekanayaka *et al.*, 2013). La avena es otro cereal que se ha usado para preparar sustitutos de la leche de vaca que además se usa como alimento probiótico cuando se inocula con cultivos lácticos (Bernat *et al.*, 2014).

2.3.1. Pre-tratamientos, extracción y producción

Previo a su preparación el material vegetal puede o no recibir un pre-tratamiento como descascarillado, remojo, tostado y escaldado (para inactivar inhibidores de tripsina y lipooxigenasas). Tradicionalmente estas bebidas se preparan moliendo el material vegetal y obteniendo así la suspensión que posteriormente se filtra para remover partículas grandes (Lee y Rhee, 2003; Deshpande *et al.*, 2008). Aunque con algunas variantes los procesos industriales modernos son en esencia igual al tradicional: El material vegetal se remoja y se realiza una molienda húmeda o bien el material se muele en seco y se mezcla el

harina con agua para extraer el material soluble. El residuo de la molienda se separa por filtración o decantación. Dependiendo del producto, su estandarización y/o la adición de otros ingredientes (azúcar, aceite, estabilizantes, saborizantes, aislados proteicos, etc) el producto se homogeniza y pasteuriza para mejorar la estabilidad de la suspensión y disminuir la carga microbiana (Diarra *et al.*, 2005).

Cabe señalar que el paso de extracción tiene un efecto considerable en la composición del producto resultante ya que la mayoría de las proteínas de leguminosas y cereales tienen un punto isoeléctrico debajo de pH 5. Teniendo en mente lo anterior la extracción a pH alcalino incrementaría la extracción de proteína pero tendría que neutralizarse en un paso posterior (Aidoo *et al.*, 2012).

2.3.2. Formulación, aditivos y fortificación

Los ingredientes que se añaden a los sustitutos de leche incluyen vitaminas y minerales que se utilizan para fortificar el producto, edulcorantes, saborizantes, sal, aceites y estabilizantes. Debido a que la estabilidad de la suspensión es un paso importante en los sustitutos de leche se usan hidrocoloides para aumentar la viscosidad de la fase continua (Deshpande *et al.*, 2008).

La adición de nutrimentos en sustitutos de leche es necesaria para asegurar la calidad nutricional del producto, éstos deben de ser biodisponibles y estables y además no influir en la calidad del mismo (Zhao *et al.*, 2005; Pathomrungsinyounggul *et al.*, 2010). La estabilidad de las vitaminas está influenciada por varios factores y el procesamiento puede reducir su concentración. En cuanto al enriquecimiento mineral se corre el riesgo de que los iones metálicos interaccionen con otros componentes del producto. Para lo anterior se recomienda el uso de secuestrantes tales como el ácido cítrico. En los sustitutos de leche se usan normalmente una sal de hierro y una sal de calcio, comúnmente carbonato y fosfato de calcio (Kaushik *et al.*, 2014; Zhao y Shah, 2014). El interés en el consumo de calcio se debe a que la ingesta de dicho

mineral contribuye a la salud ósea. Aun cuando los productos lácteos proporcionan alrededor del 70 % de la ingesta diaria recomendada de calcio, ésta aún es deficiente, por tal razón se han fortificado con calcio un gran número de alimentos para asegurar así el adecuado consumo de calcio en la población, especialmente en quienes llevan una dieta vegana o que tienen aversión a los lácteos, ya que su consumo de calcio tiende a ser menor que el del resto de la población. Es entre esta población donde ha crecido el consumo de bebidas de soya y de otras fuentes vegetales (Heaney *et al.*, 2000)

2.3.3. Hidrocoloides

La goma xantana (GX) es un hidrocoloide con mayor número de ramificaciones (y de mayor tamaño) que otros tipos de gomas, lo cual significa que puede formar una gran cantidad de puentes de hidrógeno y así lograr el incremento en la viscosidad. El efecto estabilizador de la goma xantana se atribuye a su habilidad para incrementar la viscosidad de la fase continua, reducir la motilidad de las gotas de emulsión y así minimizar la agregación y coalescencia de las micelas (Makri y Doxastakis, 2006; Traynor *et al.*, 2013).

La carboximetil celulosa (CMC) se ha usado en algunos trabajos en bebidas lácteas, de soya o jugos. La concentración en que se usa depende del contenido de sólidos solubles contenidos en la bebida, así, los productos que contienen grandes cantidades de sólidos solubles son generalmente viscosos y requieren poca cantidad de CMC. Por el contrario se necesitaría una mayor cantidad de CMC para impartir textura en productos con pocos sólidos solubles (Akkarachaneeyakorn y Tinrat, 2015).

2.3.4. Fortificación de sustitutos de leche

Las bebidas se enriquecen usualmente con diferentes vitaminas y minerales en especial después de un tratamiento térmico. En los últimos años ha crecido el interés en compuestos liposolubles tales como la vitamina A y la vitamina E debido a los efectos benéficos que aportan a la salud y además, en el caso de las bebidas, podrían jugar un papel antioxidante en la misma (Zhao y Shah, 2014). Por ejemplo, las vitaminas antioxidantes pueden minimizar los efectos de la oxidación sobre los lípidos al atrapar radicales libres que podrían dar lugar a reacciones de oxidación y degradación de los nutrientes durante el periodo de almacenamiento, en este sentido los ácidos grasos insaturados como el ácido linoleico (C18:2) son especialmente sensibles a la oxidación y consecuente desarrollo de sabores desagradables en el producto (Zhang *et al.*, 2007).

El ácido linoleico conjugado (ALC) describe a los isómeros del ácido linoleico (C18:2, C9,C12) mismo que contiene dos dobles enlaces que pueden tomar tanto configuración cis como configuración trans, entre éstos los que han mostrado estar asociados a efectos benéficos a la salud son C9, t11 y t10, c12-ALC. Al igual que otros ácidos grasos insaturados y sus metabolitos el ALC se ha propuesto como un agente contra la inflamación (Yang *et al.*, 2015). A mediados de la década de 1980 se observó que el ACL inhibía la neoplasia químicamente inducida en ratones. A tal estudio siguieron otros que identificaran en dicho compuesto una serie de efectos benéficos biológicamente incluyendo pérdida de peso, alteración de la composición corporal, cáncer, incremento de la función inmune e inflamación. El efecto antiobesogénico, anticarcinogénico, anti-inflamatorio y antidiabético se han descrito en estudios en animales (Viladomiu *et al.*, 2015).

La vitamina D es liposoluble y para la fortificación se usa normalmente vitamina D₂ o D₃ y se ha reportado que su estabilidad no se ve afectada por la cocción o producción de alimentos, sin embargo la exposición de ésta a la luz provoca pérdidas en el contenido de la misma en leche; la exposición al aire no afecta su estabilidad (Renken y Warthesen, 1993). (Tangpricha *et al.*, 2003) reportaron que la vitamina D₃ es más biodisponibles que la vitamina D₂.

La vitamina A es poco soluble en agua e inestable durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos ya que su estructura química, la cual contiene varios dobles enlaces, es susceptible a la degradación. Además su estabilidad también se ve afectada si el pH es menor a 5.0. Algunos elementos traza como hierro y cobre aceleran su degradación (Gundersen y Blomhoff, 2001). Es por lo anterior que en la industria se emplean ésteres de vitamina A tales como palmitato o acetato de retinol para la fortificación de alimentos (Andrés *et al.*, 2014)

La fortificación con DL- α -tocoferil acetato u otras formas de vitamina E también es común en la producción de alimentos funcionales. El α -tocoferol tiene el potencial biológico más alto entre los isómeros α , β , γ y δ (Andrés *et al.*, 2014)

La ingesta de calcio es esencial para desarrollar y mantener la salud ósea. El calcio está presente en grandes cantidades en productos lácteos (Guéguen y Pointillart, 2000). Aún cuando en el frijol común está presente (620 mg/Kg (Alonso *et al.*, 2001) sería necesario fortificar una bebida de frijol con este mineral si se desea que tal bebida fuese una fuente de calcio alterna a los lácteos. (Zhao *et al.*, 2005) compararon la biodisponibilidad de este mineral entre dos sales de calcio usadas comúnmente para fortificación de alimentos, el fosfato tricálcico y el carbonato de calcio y concluyeron que la biodisponibilidad de éste último en la leche de soya es muy similar al calcio presente en la leche de vaca. Algunos componentes en la leche de soya, como el fitato, podrían interferir con la absorción del calcio (Pathomrungsriyounggul *et al.*, 2010). Teniendo lo anterior en mente un sustituto de leche fortificado con calcio podría ser también una buena fuente del mismo.

2.3.5. Homogenización, estabilidad de la suspensión y pasteurización

Las partículas insolubles presentes tales como proteína, almidón, fibra y material celular al ser más densas que el agua sedimentan lo cual resulta en una

sensación arcillosa. Lo anterior hace necesario el uso de agentes estabilizantes (hidrocoloides) y emulsificantes que además de suspender tales partículas mejoren la consistencia del producto. La reducción en el tamaño de partícula del material vegetal también contribuye a una mejor estabilidad de las bebidas (Hinds *et al.*, 1997). Cuando las proteínas se desnaturalizan, resultado del tratamiento térmico, los aminoácidos no polares se exponen a la fase acuosa y dan por resultado interacciones proteína-proteína que pueden resultar en gelificación y asentamiento de las mismas. La estabilidad térmica de las proteínas depende del pH y de la presencia de otros materiales como carbohidratos y iones metálicos (McSweeney *et al.*, 2004).

La homogenización mejora la estabilidad de los sustitutos de leche al romper los agregados y disminuir el tamaño de las gotas de grasa. Cuando se homogenizan los lípidos presentes, se forma una emulsión que resulta en un producto cremoso. Se ha usado homogenización a presiones de 20 MPa en sustitutos de leche de soya, cacahuete y arroz (Mäkinen *et al.*, 2015).

El proceso de pasteurización a temperaturas debajo de 100 °C destruye microorganismos de tal manera que permite una vida de anaquel de aproximadamente una semana a temperatura de refrigeración (Kwok y Niranjana, 1995).

2.3.6. Ejemplos de sustitutos de leche y su producción

Las bebidas nutracéuticas representan uno de los mercados que más rápido crecen anualmente con una tasa de 13.6% a nivel mundial entre 2002 y 2007 (Heckman *et al.*, 2010). El principal criterio de aceptación de estas bebidas fue el sabor (Reyes-Moreno *et al.*, 2012). Jiménez-Martínez *et al.* (2003) usaron un tratamiento de NaHCO₃ para disminuir el sabor de *Lupinus* para la preparación de un producto prebiótico. Hay que resaltar que el consumo de bebidas análogas a la leche de vaca se ha relacionado con deficiencia nutricional en niños pequeños,

principalmente debido a la carencia de proteína en las bebidas preparadas a partir de arroz y de almendras (Le Louer *et al.*, 2014). La soya es el material que más se ha usado en la preparación de sustitutos de leche de vaca, aunque también se ha propuesto al género *Lupinus* como un posible sustituto para la soya en la preparación de suficiente atención (Jiménez-Martínez *et al.*, 2003).

Reyes-Moreno *et al.*, (2012) prepararon una bebida a partir de combinaciones de harinas extrudidas de frijol y maíz. Para su elaboración las semillas se remojaron previamente en soluciones salinas para disminuir el tiempo de cocción y los niveles de factores antinutricios antes del proceso de extrusión y de seguir con el proceso. El resultado final fue una mezcla de harinas con alta actividad antioxidante que se usó en la preparación de una bebida con sabor a vainilla que obtuvo una aceptación del 89 correspondiente a “Me gusta extremadamente” en una escala hedónica. Existen numerosos estudios acerca de bebidas preparadas a partir de cereales, nueces y semillas a los cuales se inoculan bacterias ácido lácticas y se consumen solos o bien se utilizan para preparar o para enriquecer alimentos tipo yogurth o temphe (Granito *et al.*, 2004; Coda *et al.*, 2012).

Omueti y Ajomale, (2005) reportaron la elaboración de leche de soya y maíz amarillo (rico en β -carotenos) con el siguiente proceso: los granos de maíz de reciente cosecha y cotiledones de las semillas de soya en una proporción de 1:3 (maíz:soya). La mezcla se remojó de 16-17 horas, se escurrió el agua y se hirvieron (1:3, semillas:agua). Las semillas se blanquearon durante 15 minutos, después de este tiempo se transfirieron a agua fría, se descascarillaron y escurrieron. La mezcla de soya-maíz (300g) se molió y la lechada resultante se mezcló con agua, los grumos se deshicieron para que el proceso de filtrado fuese rápido. Se agregó agua al líquido que se colectó, se coló y el filtrado se colectó (1.5 litros). El filtrado se hirvió durante 8 minutos, se coló nuevamente y se enfrió a temperatura ambiente. Este producto tuvo un contenido de alrededor de 25% de proteína y 2.89% de carotenoides totales, cabe destacar que dicho producto estaba dirigido hacia una población nigeriana de con carencia de fuentes de

vitamina A donde la principal preocupación era el desarrollo de xeroftalmia en niños.

También se han realizado estudios sobre formulaciones de sustitutos de leche vegetal en polvo para reconstituir, tal es el caso de (Aidoo *et al.*, 2010) quienes usaron cacahuate (*Arachis hypogaea*) y caupí (*Vigna unguiculata*), es decir, la mezcla de una semilla oleosa y una leguminosa cuya combinación resulta en un producto de alto valor nutrimental. En este estudio además de los procesos comunes a todos los preparados de sustitutos vegetales de leche, se usó una solución al 2% de NaHCO₃ para disminuir el sabor a leguminosa; también se usó un extracto de arroz malteado para obtener amilasas para hidrolizar el almidón presente y así asegurar que la consistencia fuese semejante a la de la leche de vaca. Posteriormente el producto se secó y se pulverizó.

Otra semilla oleaginosa que ha tomado gran popularidad en la preparación de sustitutos de leche es la almendra, aunque esta semilla contiene 188 tipos diferentes de proteínas, la amandina es la proteína mayoritaria y pertenece a la familia de las globulinas 11S y es estable después de tratamientos y puede desencadenar una respuesta alérgica como lo observaron (Dhakal *et al.*, 2014) quienes evaluaron el impacto de la alta presión hidrostática en la inmunoreactividad de la leche de almendra. Para la producción de dicha bebida se reportó el siguiente proceso: las almendras se remojaron una noche en 600 ml de agua a 4°C, se drenaron, enjuagaron, se determinó el agua absorbida y se les retiró cáscara. Las almendras sin cáscara se molieron con nueve partes de agua.

La mezcla se filtró primero en una tela de poro abierto y después se usó una malla más fina (180 µm). El filtrado resultante se diluyó hasta 500 ml. Una parte de las muestras se sometió a tratamiento térmico mientras que otra parte se sometió al tratamiento de alta presión hidrostática. Después del tratamiento de alta presión no se pudo detectar la amandina por técnicas inmunológicas a diferencia de las muestras que se trataron térmicamente que, salvo en dos tratamientos, en general no mostraron reducción en la inmunoreactividad.

No sólo las nueces y las leguminosas se han usado como ingredientes de sustitutos de leche, sino también cereales como el arroz o la avena. Tal es el caso de (Koyama y Kitamura, 2014) quienes obtuvieron lechadas de arroz blanco o arroz integral mediante la molienda húmeda de dichos granos previamente remojados. La leche de arroz se definió como la mezcla de la lechada más agua en una relación de 1:9 (sólido:líquido). Se reportan tamaños de partícula menores de 20 μm usando tres molinos de piedra con superficie de contacto de 38, 111 y 207 cm^2 . La evaluación sensorial fue la más alta (55.6%) cuando se usó 0.3% de goma xantana para aumentar la viscosidad e impedir la asentamiento (se necesitó un mínimo de 0.1 % para estabilizar la lechada).

Bernat *et al.*, (2014) usaron un avena para la formulación de un sustituto de leche fermentado con un microorganismo probiótico. Su elaboración consistió en el remojo y molienda de la avena (*Avena sativa* L.) en una proporción de 8:100 (avena: agua; peso/volumen) para asegurar la extracción de los β -glucanos y su subsecuente fermentación, que además tienen propiedades espesantes y gelificantes que mejoran la consistencia del producto. Se usó un equipo diseñado específicamente para la producción de leches vegetales (Starsoja de Farmanutrients Labs). Se usaron tres ciclos de molienda húmeda a 90°C durante 20 minutos; el líquido obtenido se homogenizó durante 3 minutos a 13 500 rpm/min y finalmente se esterilizó a 121°C durante 15 min y se continuó con el proceso de fermentación.

(Ukwuru y Ogbodo, 2011) elaboraron una bebida de la juncia avellanada o chufa (*Cyperus esculentus*), un tubérculo comestible alto en fibra dietética, 7% de proteína y 86% de almidón. Evaluaron los diferentes tratamientos térmicos con el fin de estandarizarlos; el producto triturado se sometió a un tratamiento térmico y después se inoculó con *Streptococcus thermophilus* como microorganismo indicador y *Lactobacillus bulgaricus* como microorganismo fermentador. Posteriormente se hizo una molienda húmeda y se coló para separar la lechada. Las condiciones con mejores resultados en cuanto a estabilidad e inocuidad fueron las que posterior al embotellado se esterilizaron a 145°C durante 14

segundos y aquellas que después de un precalentamiento de 50°C durante 30 minutos se esterilizaron a 130°C durante 10 segundos.

Más recientemente (Pineli *et al.*, 2015) usaron quinoa en la preparación de un sustituto de leche. 100 g de quinoa se mezclaron con agua (1:7) y la mezcla se coció en autoclave a 112 °C por 30 minutos. Los granos cocidos se molieron 6 minutos y se agregaron α -amilasas termoestable (3 ml/kg de almidón) durante una hora a 60 °C. Siguió un proceso de ebullición por 15 minutos y enfriamiento a 40 °C. LA bebida se filtró y se agregó aceite de girasol (1% p/p de quinoa), se mezcló 6 minutos, la bebida se embotelló, se pasteurizó a 65 °C durante 30 minutos y se enfrió a 4 °C en baño de agua-hielo. Se probaron varias concentraciones de sales, y soluciones acidificadas para mejorar la extracción de proteínas.

Aún cuando no hay legislación exclusiva para estos productos, los sustitutos de leche de entrarían en la observancia de la Norma Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011 Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína, define que una bebida no alcohólica con modificaciones en su composición, a aquellas bebidas a las que se les disminuyen, eliminan adicionan uno o más nutrimentos, tales como hidratos de carbono, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales o fibras dietéticas.

2.4. Extrusión

Varios procesos en la preparación de los alimentos son usados para mejorar la biodisponibilidad nutrimental, la densidad nutrimental, la inocuidad, la estabilidad de almacenamiento, la palatabilidad, etc. Entre estos se encuentra el proceso de extrusión en el cual un material se hace pasar a través de un orificio (dado) bajo condiciones térmicas y mecánicas lo cual da lugar a transformaciones estructurales, químicas y nutricionales del material (Alam *et al.* 2015). Cuando se aplica a alimentos los biopolímeros de almidón y proteínas se plastifican en

presencia de humedad controlada y altas temperaturas, produciendo una masa cocida con alto grado de corte mecánico (Guy, 2001). En el tratamiento de extrusión se usan altas temperaturas (140°C - 180°C), y tiempos cortos (15-30 s). El producto final tiene bajo contenido de humedad (12-17 g/100g) lo que la convierte en una tecnología conveniente en la preparación de mezclas, productos semicocidos o reconstituidos o bien alimentos completamente cocido (Plahar *et al.*, 2003).

La extrusión ofrece numerosas ventajas como versatilidad, alta productividad, bajos costos de operación, eficiencia energética, productos de alta calidad y mejora de la digestibilidad y el valor biológico de las proteínas (Reyes-Moreno *et al.*, 2012). La suspensión de las harinas precocidas por extrusión pueden incrementar su viscosidad rápidamente, y la tendencia para formar grumos debido a que los gránulos de almidón se modifican y muestran alta capacidad de hinchamiento bajo condiciones de frío y de calor, lo cual hace a las harinas extrudidas altamente recomendables para la preparación de alimentos instantáneos (Vasanthan *et al.*, 2001).

Los alimentos que pueden transformarse con este proceso son principalmente cereales, almidones y/o proteínas vegetales. El proceso se usa desde la décadas de 1930 y desde entonces se ha usado para preparar cereales para el desayuno, snacks (listos para consumir) y alimentos texturizados (como la soya). Mejoran la masticabilidad y densidad, entre otras características deseables en los productos (Riaz, 2001). En México es común el uso de la extrusión en la preparación de tortillas y otros derivados del maíz. El maíz nixtamalizado se usa para elaborar bebidas como el atole, el pozol y el tesgüino, de éstas sólo el atole no necesita fermentación en el proceso de su obtención. No sólo las bebidas de maíz se elaboran a partir de harinas extrudidas (Milán-Carrillo *et al.*, 2012) elaboraron una bebida con contenido del 11% de harina extrudida de amaranto y 1.56% de proteína.

Un sistema de extrusión consta de varios componentes (figura 3). El ingreso de la materia prima está determinado por una tolva en la parte superior, de

esta manera el extrusor opera de manera continua. Un tornillo de velocidad variable se utiliza para descargar material uniforme hacia el extrusor. También se trabaja con un cilindro pre acondicionador que posee cabezas encamisadas para mezclar vapor y/o agua con la masa de alimentación. De esta manera se asegura que cada partícula de la materia prima alcance un equilibrio entre temperatura y humedad. El dado de la parte final del extrusor por donde sale el material terminado provoca la evaporación instantánea de la humedad de la masa extrudida debido a un cambio de presión, ocasionando la expansión del producto modificando así su textura y su porosidad (Riaz, 2001).

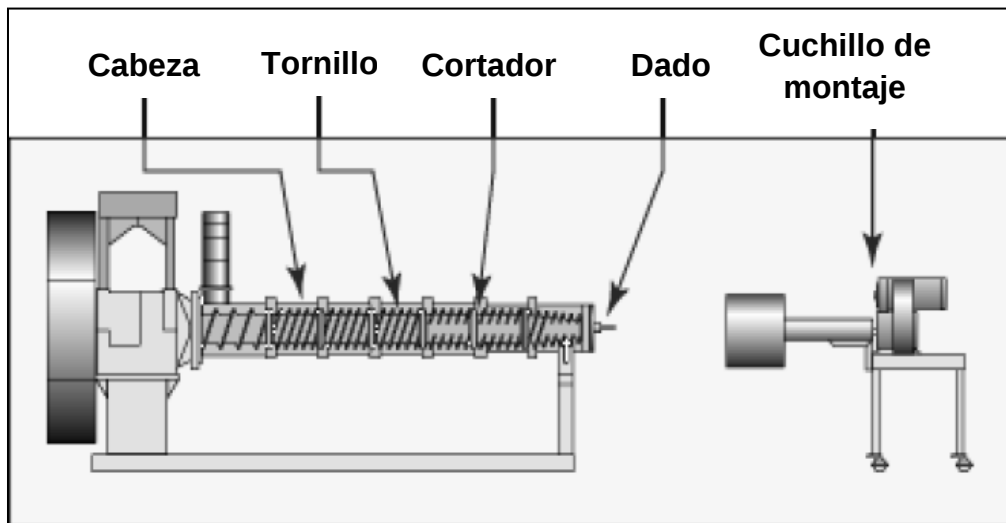


Figura 3. Diagrama de un extrusor (Riaz, 2001)

III. Objetivos

3.1 Objetivo general

Desarrollar un sustituto de leche a partir de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Bayo Madero.

3.2 Objetivos particulares

- Establecer las condiciones óptimas del proceso de extrusión que reduzcan los factores antinutricios presentes en el frijol común.
- Formular una bebida que contenga frijol común cocido a través de extrusión.
- Llevar al cabo la caracterización fisicoquímica y nutracéutica del sustituto de leche.
- Evaluar sensorialmente el sustituto de leche.

IV. Justificación

La innovación en la industria alimentaria está directamente influenciada por la búsqueda del reemplazo de ingredientes obedeciendo a tendencias nutricionales o a las necesidades del consumidor. Debido al aumento en los casos de intolerancia a la lactosa, alergia a proteínas de la leche, o bien, en búsqueda de un estilo de vida más saludable, existen en el mercado sustitutos de la leche de vaca preparados a partir de cereales, oleaginosas, fruta, leguminosas y tubérculos. Este mercado creció 20 % en el periodo 2013-2014 (2014 State of the Industry n.d.).

Por otro lado el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) ha sido objeto de estudio debido a su efectividad en la prevención del desarrollo de enfermedades no transmisibles (cáncer, diabetes, obesidad, dislipidemias, etc.) atribuido al gran aporte de fibra, compuestos fenólicos, oligosacáridos y proteína (péptidos bioactivos). Teniendo siempre en cuenta que los factores antinutricios (lectinas, inhibidores de tripsina, etc.) presentes en el mismo deben reducirse antes de consumir esta leguminosa.

El uso de frijol uso en bebidas se ha explorado poco. En el presente trabajo se propone al frijol común cocido mediante proceso de extrusión como el ingrediente principal de un sustituto de leche.

V. Metodología

5.1. Materiales y Reactivos

5.1.1. Material biológico

Se usaron semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Bayo Madero donadas por el Instituto nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), campo experimental del Bajío.

5.1.2. Reactivos

Se utilizó éter etílico, sulfato de sodio, fosfato dibásico de sodio anhidro, ácido sulfúrico, hidróxido de sodio, ácido bórico, verde de bromocresol, ácido clorhídrico, fosfato de potasio, etanol, acetona, acetato de sodio, metanol, carbonato de sodio, fosfato monobásico de sodio monohidratado, ácido acético glacial obtenidos de la marca J.T. Baker. Rojo de metilo, α -amilasa, proteasa, amiloglucosidasa, los estándares de, vainillina, ($\pm$)-catequina, reactivo de Folin-Ciocalteu, rutina, trolox, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), (TPTZ) 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina, Cloruro férrico hexahidratado, sulfato férrico heptahidratado, BAPNA (N- α -benzoyl-arginine-p-nitroanilide), Proteasa tipo XIV bacterial, lectina de *Phaseolus vulgaris* L., albúmina de suero bovino, de la marca Sigma-Aldrich Chemical. Los sustitutos de leche comerciales de almendra y de soya fueron adquiridos en un supermercado local.

5.1.3. Materia prima

Hidrocoloides (Fooding Group Limited), aceite comercial de cánoa (ACH Foods), emulsificante, fuente de calcio (ENSIGN), vitaminas liposolubles (Glanbia nutritionals y Farmacom), ácidos grasos insaturados (Tonallin FFA 80), Sucralosa (Fooding Group Limited), jarabe sabor chocolate y jarabe sabor fresa (The Hershey Company), esencia de café Deiman, agua purificada (AGUAQ)

5.2. Metodología

5.2.1. Materia prima

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Bayo Madero previamente seleccionado y libre de impurezas se remojó durante 8 horas y se posteriormente se descascarilló. La humedad final de los cotiledones fue de $56.10 \pm 1.24\%$.

5.2.3. Obtención del extrudido de frijol

Se usó un extrusor de tornillo sencillo con una relación de compresión 1:1; relación L/D= 20 con diámetro de 1 pulgada acoplado de un dado con un orificio de 5 mm a una velocidad de 10 revoluciones por minuto (rpm). El extrusor está hecho de acero inoxidable 304, el mismo fue prestado amablemente por el Centro de Investigaciones en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN (CICATA), sede Querétaro. Los cotiledones se colocaron en la tolva y se hicieron pasar a través del extrusor variando únicamente las temperaturas de 120°, 140° y 160 °C. Los extrudidos se colocaron en charolas de aluminio y se secaron a 60 °C.

La humedad final de los mismos fue de 4.51 ± 0.56 %. Los extrudidos se secaron a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se molieron usando un molino de café marca Krups de acero inoxidable (modelo GX410011V) y se hizo pasar por una malla #100 ($149\text{ }\mu\text{m}$).

5.2.4. Determinación de factores antinutricios

5.2.4.1. Cuantificación de inhibidores de tripsina

La cuantificación de inhibidores de tripsina se llevó al cabo mediante la técnica desarrollada por Kakade *et al.*, (1974). Se tomó 1 g de la harina extrudida de frijol y se adicionaron 50 ml de NaOH 0.01 N durante 3 horas con mezclado continuo. Una vez pasado el tiempo de extracción, se procedió al ajuste de pH a 8.2 con HCl 0.1 N y se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos. Se tomaron 5 ml del sobrenadante y se le agregó 15 ml de agua destilada para obtener un extracto 1:4 con menor turbidez. De la dilución anterior se tomaron 500 μl para el tubo muestra y otros 500 μl para el blanco de muestra. Se procedió a realizar diluciones sucesivas tomando 250 μl del tubo de muestra más 250 μl de agua destilada obteniendo una dilución 1:8. Se repitió este procedimiento hasta obtener diluciones 1:16, 1:32, 1:64. Se hizo lo mismo para los blancos de muestra.

Para el tubo muestra de cada dilución, se adicionaron 250 μl de tripsina, se dejó reposar 5 minutos. Enseguida se agregaron 625 μl de BAPNA (N- α -benzoyl-arginine-p-nitroanilide) y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. Para detener la reacción, se adicionaron 125 μl de ácido acético al 30%. En el caso del tubo blanco de muestra, se adicionaron para cada dilución 250 μl de tripsina más 125 μl de ácido acético al 30%, se mezclaron y se agregó 2.5 ml de BAPNA. Se preparó un tubo control de máxima absorbancia colocando 250 μl de agua destilada más 250 μl de tripsina. Se dejó en reposo durante 5 minutos, enseguida se adicionaron 625 μl de BAPNA y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al final de la incubación se adicionaron 125 μl de ácido acético al 30%.

Como blanco para el análisis se preparó un tubo de cero absorbancia, mezclando 250 µl de agua destilada más 250 µl de tripsina, 125 µl de ácido acético al 30 % y 625 µl de BAPNA, respetando el orden de adición de los reactivos. Se colocaron 250 µl de cada muestra en una microplaca de 96 pozos. Finalmente se midió la absorbancia a 410 nm. Los resultados fueron expresados como unidades inhibidas de tripsina (UIT) por miligramo de muestra utilizando la siguiente fórmula:

$$UIT = \frac{[\text{Tubo abs máx} - (\text{Tubo muestra} - \text{Tubo bco muestra})] \times FD}{0.01}$$

5.2.4.2. Cuantificación de lectinas

Las lectinas presentes tanto en harina de frijol crudo como en harina de frijol cocido se extrajeron usando una solución amortiguadora de fosfatos (K_2HPO_4 5mM y 0.15 M de NaCl pH 7.4). Se usó 0.1 gramos de harina de frijol y se agregaron 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos. Después de agitación continua durante 18 horas la mezcla se centrifugó a 12 000 g. El sobrenadante se usó para el ensayo de hemaglutinación usado por (Reynoso-Camacho *et al.*, 2003).

Usando un tubo con heparina se tomó una muestra de sangre (fresca y siempre de la misma fuente) a partir de la cual se tomó 1 ml y se agregaron 13 ml de solución amortiguadora de fosfatos. Los eritrocitos se lavaron dos veces con la misma solución, entre cada lavado se recuperaron los eritrocitos por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se hizo una solución al 4% de eritrocitos a la cual se agregó 1ml de solución de proteasa al 0.2% y se dejó incubar durante una hora a 37 °C. Al término de ese tiempo los eritrocitos se resuspendieron y se lavaron nuevamente tres veces como ya se describió. Del paquete de eritrocitos se hizo una nueva dilución al 4% en solución amortiguadora.

A continuación en una placa de 96 pozos con fondo cónico se colocaron 50 µl del extracto de harina de frijol (crudo y extrudido), como control positivo se usó lectina de *Phaseolus vulgaris* L. al 0.2% en solución amortiguadora y como control negativo se usó solución amortiguadora. Se realizaron diluciones del orden 2 con la solución amortiguadora tanto para los controles como para las muestras. A cada pozo se agregaron 50 µl de la solución de eritrocitos. La placa se dejó en reposo a temperatura ambiente durante una hora. La actividad hemaglutinante se expresa en unidades de hemaglutinina/mg de proteína. Las unidades de hemaglutinina se definen como el inverso de la última dilución que presenta aglutinación positiva.

5.2.4.2.1. Cuantificación de proteínas solubles

El contenido de proteínas solubles se determinó por el método de Bradford. En un tubo eppendorf se colocó 1 ml de reactivo de Bradford (5 mg de azul de Coomassie, 2.5 ml de etanol, 5 ml de ácido fosfórico aforado a 50 ml de agua destilada, filtrado y protegido de la luz) y se le agregaron 20 µl de muestra. Se tomó una alícuota de 200 µl de cada tubo y se colocaron en una microplaca de 96 pozos. Se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro UV-visible dentro de los primeros 30 minutos de la reacción. La concentración de proteínas se determinó al comparar la absorbancia con una curva de calibración usando BSA.

5.2.4.3. Cuantificación de ácido fítico

El contenido de ácido fítico se determinó por el método de Lolos y Markakis (1975). Se pesaron dos gramos de muestra y se agregaron 100 ml de HCl 2%, la muestra se sometió a agitación constante durante 3 horas.

Posteriormente la muestra se filtró a través de un papel filtro Whatman No. 1. Se tomaron 50 ml del filtrado al que además se le agregaron 10 ml de agua destilada y 10 ml de tiocianato de amonio al 0.3 %. Enseguida se tituló con FeCl_3 conteniendo 0.00195 g de Fe ml. El punto final de la valoración fue dado por la persistencia de la coloración anaranjada. El porcentaje de ácido fítico se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Ácido fítico (\%)} = y \times 1.19 \times 100$$

Donde y = volumen de titulación $\times$ 0.00195

5.2.5. Formulación de la bebida

5.2.5.1. Determinación de viscosidad de la base de frijol

Se llamó base de frijol a la mezcla de harina de frijol extrudido y agua. Para elegir la cantidad de harina de frijol los ensayos preliminares se realizaron en un equipo Soyabella (Automatic Soymilk Maker y Coffee Grinder Model SB-130) en el cuál se agregaron diferentes proporciones de harina de frijol extrudido y agua. El equipo alcanza una temperatura de 90 °C y la mantiene durante 20 minutos. Equipos similares se han usado en la preparación de otras bebidas vegetales (Bernat *et al.*, 2015).

La viscosidad del producto obtenido se evaluó usando un reómetro Anton Paar MCR 101 en un rango de velocidad de corte entre 100 y 300 (1/s) usando una geometría de cilindros concéntricos.

Por otra parte, se realizó la medición de viscosidad con una rampa de temperatura en un rango de 35 a 90 °C usando la geometría de paletas en el mismo equipo con la finalidad de evaluar si la viscosidad cambiaba al aumentar la temperatura.

5.2.5.2. Preparación de la emulsión

Para preparar la emulsión se usó 0.3% (p/v) de lecitina de soya como emulsificante y 0.75% (p/v) de aceite de canola. La mezcla se calentó a 60°C en agitación constante y posteriormente se homogenizó en una licuadora comercial durante un minuto. Finalmente se sometió a una homogenización durante 3 minutos a 8000 RPM en un equipo homogenizador Ultra-Turrax IKA T18 basic, lo anterior con el fin de mejorar la suspensión de las partículas e impartir una apariencia uniforme a la bebida.

5.2.5.3. Fortificación

Se agregaron a los componentes grasos 0.15% (p/v) de ácido linoleico conjugado. El palmitato de vitamina A, vitamina D-3 y vitamina E (DL- α -tocoferol) se agregaron en esta fracción en cantidades correspondientes a 30, 35 y 30% del IGD (150 μ g, 0.75 μ g y 1.5 μ g respectivamente para 100 ml). Como fuente de calcio se usó carbonato de calcio calculando la concentración en 35% de la IDR. Los niveles de vitaminas y calcio se establecieron con base en los IDR del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y con base en los productos existentes en el mercado.

5.2.5.4. Elección de los niveles de hidrocoloides

Como hidrocoloides se agregaron goma xantana y carboximetil celulosa. Se probaron los niveles de las mismas a 0.08, 0.010 y 0.12 % (p/v). Las variables de respuesta fueron la viscosidad y la estabilidad relativa del producto.

5.2.5.4.1. Determinación de la tasa de asentamiento

La tasa de asentamiento del sustituto de leche se determinó usando el método usado por Traynor *et al.*, (2013). Se colocaron 100 ml de la bebida en probetas de vidrio y se marcó el volumen de la misma al inicio y posteriormente cada dos días hasta completar diez. Las probetas para cada tratamiento se almacenaron a 4 °C. La tasa de asentamiento de la bebida se calculó de la siguiente manera

$$\% \text{ TS} = \frac{\text{volumen inicial}}{\text{volumen final}} \times 100$$

y se reportó como la tasa de asentamiento.

5.2.5.4.2. Determinación de la viscosidad de la bebida

La viscosidad del producto obtenido en el paso anterior se evaluó usando un reómetro Anton Paar MCR 101 en un rango de velocidad de corte entre 100 y 300 (1/s) usando una geometría de cilindros concéntricos. La viscosidad se reportó en centipoises (cP). 100 cP = 1 g/ cm.s

5.2.4.5. Preparación del sustituto de leche

Una vez homogeneizada la emulsión a ésta se agregaron los hidrocoloides (GX y CMC) en concentración de 0.01% cada uno, 0.1% carbonato de calcio (p/v), 0.015% de sucralosa y 3.5% de harina de frijol extrudido (p/v).

La mezcla se homogeneizó nuevamente bajo las condiciones usadas para la emulsión. La mezcla se vertió en el equipo Soyabella donde se sometió a un calentamiento de 90 °C durante 20 minutos. El producto obtenido se enfrió y almacenó a 4 °C hasta su análisis.

5.2.5. Evaluación sensorial

5.2.5.1. Evaluación sensorial de aceptación

La evaluación sensorial consistió en una prueba de aceptación del producto preparado en los atributos de color, dulzor y agrado global usando una escala hedónica de 7 puntos. Se usaron además productos comerciales de soya y de almendra. El formato usado fue el que se muestra en la figura 4.

5.2.5.2. Evaluación sensorial de preferencia

Se realizó un análisis sensorial de preferencia entre el producto natural y el producto con sabores añadidos. Se eligieron los sabores de chocolate, café y fresa. Se usó 10% (v/v) de jarabe de chocolate y de jarabe de fresa; para el sabor café se agregó 0.25 % de esencia de café. Todo lo anterior se realizó previo al tratamiento térmico con el Soyabella. Se les pidió a los evaluadores, no entrenados, que colocaran el orden de preferencia de cada una de las cuatro muestras. El formato usado se muestra en la figura 5.

PRECAUCIÓN. Algunos de los productos contienen almendra y soya.

Edad: _____ Sexo: M () F ()

Frente a usted hay tres muestras codificadas de un **sustituto de leche**, las cuales debe probar una a la vez y marque con una X la calificación que otorga a cada muestra

	COLOR			OLOR			DULZOR			AGRADO GLOBAL		
	168	670	421	168	670	421	168	670	421	168	670	421
Me gusta extremadamente												
Me gusta mucho												
Me gusta moderadamente												
No me gusta ni me disgusta												
Me disgusta moderadamente												
Me disgusta mucho												
Me disgusta extremadamente												

Seleccione la muestra de **mayor preferencia**.

Muestra	Orden de preferencia
168	
670	
421	

¿Compraría la muestra que seleccionó?

SI _____ NO _____, ¿Por qué?

Observaciones:

Figura 4. Anverso y reverso del formato para evaluación sensorial de agrado

5.3.2. Determinación de color

Se colocaron 10 ml del sustituto de leche en la celda y posteriormente se protegió de la luz exterior. Se realizaron mediciones de las coordenadas cromáticas usando el equipo Minolta CM 2002 usando el sistema CIELAB se tomaron las coordenadas L^* , a^* y b^* . Tales coordenadas se muestran en la figura 6.

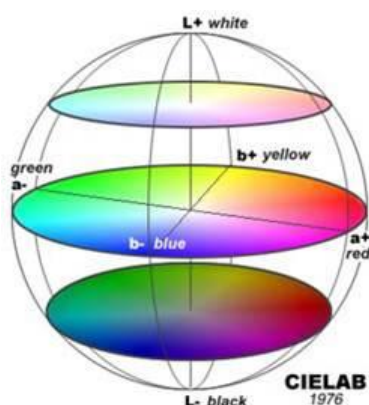


Figura 6. Coordenadas de color para el sistema CIELAB. (Hoces de la Guardia Ch et al., 2011)

5.3.3. Análisis proximal

Se usaron los métodos de la AOAC (2002): grasa (920.39), proteína (954.01), humedad (925.09B) y cenizas (923.03) y carbohidratos por diferencia de los anteriores.

5.3.3.1. Grasa (método 920.39)

Dentro de un cartucho de celulosa se colocó 1 g de sustituto de leche de frijol previamente liofilizado, se colocó un tapón de algodón y se colocó en el compartimiento de extracción Soxhlet. Éste se ensambló a un matraz receptor (previo al ensayo se puso a peso constante y se registró su peso inicial) el cual contenía 200 ml de éter de petróleo y a un refrigerante. A continuación el matraz que contenía el solvente se colocó sobre una parrilla de calentamiento hasta su punto de ebullición y el calentamiento se ajustó a 10 reflujos por hora durante 5 horas. Terminado el tiempo el matraz se retiró y se recuperó el solvente por destilación. El matraz se colocó dentro de una estufa a 60 °C para la completa eliminación de solvente y humedad, con el fin de obtener únicamente el peso de la fracción lipídica. Los matraces se pesaron y la diferencia de peso final y del matraz previo a la extracción se registra para obtener el porcentaje de grasa.

5.3.3.2. Proteína (método 954.01)

Se determinó en el sistema Kjeldhal. Se colocaron 25 ml de muestra en un matraz de digestión Kjeldhal. A cada matraz se agregó una tableta de catalizadores (sulfato de sodio y sulfato de cobre), Se agregaron 10 ml de ácido sulfúrico concentrado y los tubos se colocaron en una parrilla de digestión a 450 °C hasta que el contenido se tornó verde turquesa. Una vez fríos, a cada tubo se le agregaron 100 ml de agua destilada y se colocaron uno a uno en el destilador, donde se además se colocó un matraz Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 25 ml de ácido bórico conteniendo los indicadores. El destilado recibido en el matraz ya mencionado se tituló con ácido clorhídrico 0.1 N. Se determinó el nitrógeno total (N) multiplicado por un factor de conversión equivalente al porcentaje de proteína presente en el alimento, en este caso 6.25.

5.3.3.3. Cenizas (método 945.46)

Se colocó 1 ml e muestra en un crisol de porcelana (previamente puesto a peso constante y registrado su peso inicial). La muestra se secó primero durante tres horas a 110 °C, posteriormente se calcinó en una parrilla de calentamiento dentro de una campana de extracción hasta que dejaron de salir vapores de la misma. Posteriormente el crisol se colocó dentro de una mufla a temperatura de 550 °C durante 3 horas. Una vez fría la muestra ésta se pesó y se determinó el porcentaje de cenizas.

5.3.3.4. Humedad (método 925.09B)

Se pesó 1 ml del sustituto de leche de frijol en un crisol previamente colocado a peso constante y pesado, El crisol se colocó en una estufa a 130°C durante 3 h. Al término de las mismas el crisol se dejó enfriar dentro de un desecador y posteriormente se pesó y se colocó en un desecador a temperatura ambiente. Una vez fría la muestra se pesó y se determinó el porcentaje de humedad.

5.3.4. Composición nutracéutica

5.3.4.1. Extracción de compuestos fenólicos

La extracción de compuestos fenólicos del sustituto de leche se hizo según lo descrito por Cardador-Martínez *et al.*,(2002). Se tomaron 10 ml del sustituto de leche de frijol y se agregaron 10 ml de de metanol durante 24 horas a 25 °C.

5.3.4.2. Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se llevó a cabo por la técnica propuesta por Singleton y Rossi, (1965). Se tomaron 500 µl de extracto metanólico, enseguida se adicionó el reactivo de Folin-Ciocalteu (1:1 en agua destilada), la reacción se neutralizó con NaCO₃ (7 %), se mantuvo en reposo por 2 horas protegiéndolo en todo momento de la luz. La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro (UV-visible) a 760 nm. Se realizó una comparación de los resultados obtenidos con una curva de calibración de ácido gálico. El contenido de fenoles totales se expresó como miligramos equivalentes de ácido gálico por ml de muestra.

5.3.4.3. Cuantificación de flavonoides

La cuantificación de flavonoides se desarrolló por el método sugerido por Oomah *et al.*, (2005). Se mezclaron 50 µl de extracto metanólico con 180 µl de metanol, se adicionaron 20 µl de solución de 2-aminoetilendifenilborato (10 mg/ml) y se adicionaron a una placa de 96 pozos. La cuantificación se hizo en un espectrofotómetro (UV-Visible) a 404 nm. Se realizó una comparación de los resultados obtenidos con una curva de calibración de rutina. El contenido de flavonoides se expresó en miligramos equivalentes de rutina/ml de muestra.

5.3.4.4. Cuantificación de taninos

La cuantificación de taninos se desarrolló mediante la metodología sugerida por Deshpande y Cheryan (1985), adaptado a microplaca por Feregrino-Pérez *et al.* (2008). En un pozo se colocaron 50 µl del extracto metanólico. Se adicionaron 200 µl de vainillina (0.5 % vainillina, 4 % HCl en metanol). La

absorbancia se leyó a 492 nm en un espectrofotómetro (UV-visible). Se usó un blanco de reactivo con 50 µl de metanol y 200 µl de HCl 4%. La concentración de los taninos se calculó a partir de una curva de calibración con (+)-catequina a concentraciones de 0.1-0.8 mg/ml. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de (+)-catequina de muestra.

5.3.5. Capacidad antioxidante

5.3.5.1. Capacidad antioxidante por el método FRAP

Se siguió la metodología propuesta por (Benzie y Strain, 1996). En una microplaca de 96 pozos se colocaron 25 µl de extracto metanólico Posteriormente se agregaron 175 µl de la solución FRAP (10 ml de solución amortiguadora de acetato, 1 ml de solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM y 1 ml de TPTZ 10 mM). En el caso de los blancos de muestra se agregaron 175 µl de solución amortiguadora de acetato (300 mM pH 3.6). Conforme se agregaban los reactivos la placa se cubrió con Parafilm^{MR} y papel aluminio para evitar que se volatilizaran los solventes y proteger la reacción de la luz. Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-visible a 595 nm. Se toman lecturas al tiempo 0, y a los 4, 10, 30, 60 y 90 minutos. Se realizó una curva de calibración de 0-150 µM de Trolox® y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en metanol (7 mM).

5.3.5.2. Capacidad antioxidante por el método DPPH

Se siguió el método descrito por (Fukumoto y Mazza, 2000). En una microplaca se añadieron 20 µl de extracto metanólico y 200 µl de solución de DPPH. Se tomó la lectura a 0 y 90 minutos a 520 nm en un espectrofotómetro UV-visible. La microplaca se mantuvo cubierta y en la oscuridad a temperatura

ambiente. Los resultados se extrapolaron en una curva de calibración (50-800 μM de Trolox®) y se expresaron como μmol equivalentes de trolox/ml de muestra.

5.3.6. Determinación de fibra soluble e insoluble

La fibra insoluble se determinó siguiendo el método propuesto por Shiga *et al.*, (2003). Se pesaron 0.5 gramos de bebida desgrasada y liofilizada y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, protegiéndolo de la luz. Se le adicionaron 50 mL de solución amortiguadora de fosfatos (0.08 mM, pH 6) y 100 μL de α -amilasa y se incubó a 95 °C en un baño maría con agitación constante. Al término, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se les ajustó el pH a 7.5 con NaOH 0.275 N. Se adicionaron 100 μL de proteasa (5 mg/mL preparada al momento de su uso, disolver en solución amortiguadora de fosfatos fría a pH 6). La muestra se incubó a 60°C en un baño María durante 30 min con agitación continua. Al término del tiempo, se atemperó y se ajustó el pH a 4.0 con HCl y se adicionaron 300 μL de amiloglucosidasa y nuevamente se incubó en baño María a 60 °C durante 30 min con agitación continua. Las muestras se filtraron con un papel Whatman No. 4 (a peso constante) utilizando un matraz kitazato con un embudo Büchner al vacío. El residuo se lavó veces con agua destilada a 60°C, y el filtro se secó en una estufa y se pesó. El contenido de fibra insoluble se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Fibra insoluble (\%)} = \frac{\text{Papel filtro con muestra} - \text{Peso papel filtro}}{\text{Peso inicial de muestra}} \times 100$$

Al filtrado obtenido se le agregó un volumen de etanol al 80%, y se dejó reposar durante un mínimo de 24 h a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de reposo el contenido del matraz se filtró usando papel Whatman No. 42 (a peso constante) utilizando un matraz kitazato y un embudo Büchner al vacío, finalmente

el residuo se lavó dos veces con acetona. El papel filtro se secó en una estufa y se pesó. El contenido de fibra soluble se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Fibra soluble (\%)} = \frac{\text{Papel filtro con muestra} - \text{Peso papel filtro}}{\text{Peso inicial de la muestra}} \times 100$$

5.3.7. Diseño experimental.

Para determinar los niveles de hidrocoloides se usó un diseño factorial 2^3 para establecer el nivel de los mismos. Las medias se compararon entre sí usando la prueba de Tukey con $\alpha=0.05$. Para el análisis sensorial se usó la prueba de chi cuadrado. Todos los análisis se hicieron en el programa JMP® 8.0. En la figura 7 se muestra el diagrama de la metodología experimental.

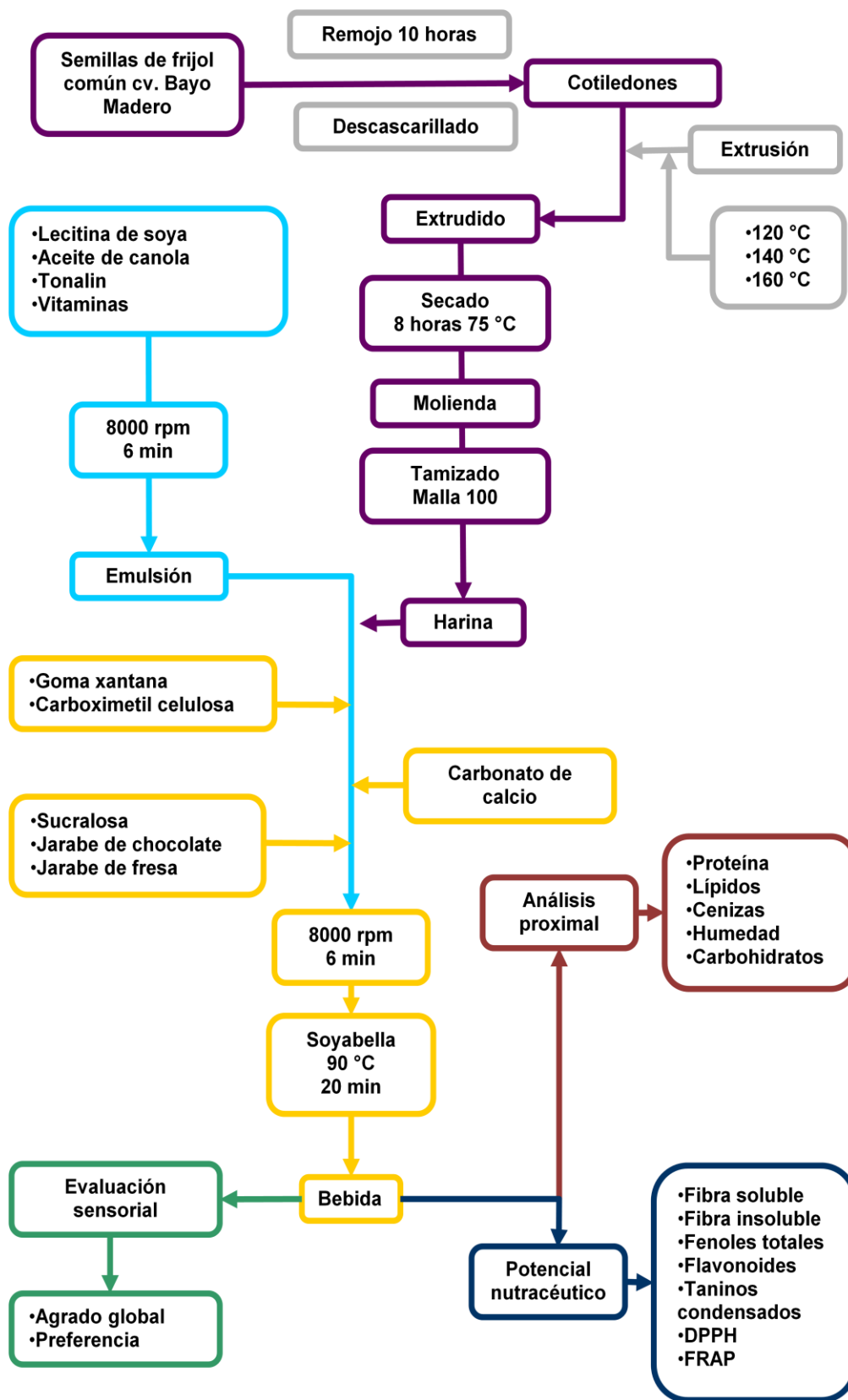


Figura 7. Diagrama de la metodología experimental

VI. Resultados y discusión

6.1. Factores antinutricios en extrudidos de frijol.

6.1.1. Concentración de inhibidores de tripsina

En la figura 6 se observa que el contenido de UIT/mg es considerablemente menor en cualquiera de los tres tratamientos de extrusión diferencia del frijol crudo cuya inhibición aún superaba el 40 % después de un factor de dilución de 64.

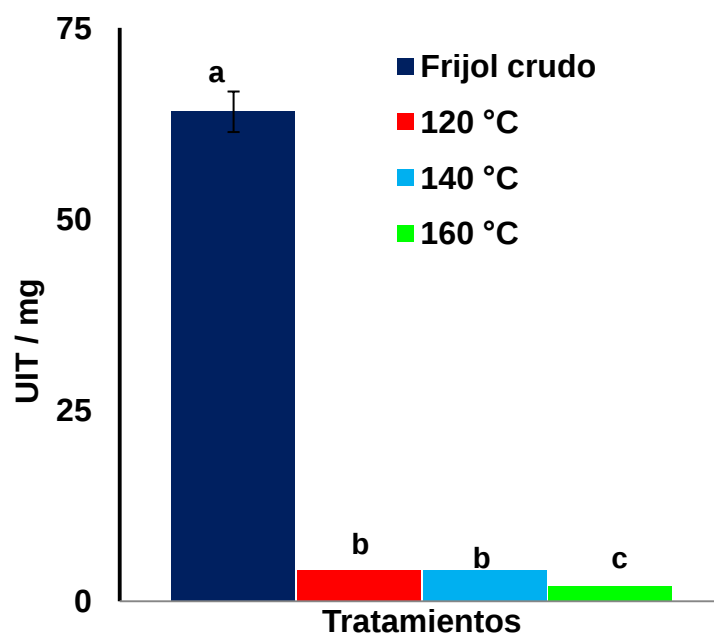


Figura 8. Inhibición de tripsina en extrudidos de frijol.

Cada valor representa la media de dos repeticiones $\pm$ DS. Valores con la misma letra no son diferentes entre sí (Tukey α 0.05)

La cuantificación de las unidades inhibidas de tripsina se hizo en las diluciones de los extractos de proteínas solubles de cada muestra (frijol crudo y

extrudidos). Se tomaba como positiva la inhibición de tripsina cuando ésta era igual o mayor al 40%. A pesar de la estabilidad térmica de los inhibidores de tripsina, la combinación de calor y humedad en el proceso de extrusión redujeron considerablemente su actividad inhibitoria en concordancia con lo reportado por (Batista *et al.*, 2010). Cabe recordar que este resultado corresponde a la materia prima del producto el cual aún sería sometido a un proceso de pasteurización, además fue diluido para ajustar la cantidad de sólidos del producto.

6.1.2. Concentración de hemaglutininas

La aglutinación de los eritrocitos está dada por la formación de un entrecruzamiento entre las lectinas y la superficie de las células. Al diluir de manera seriada las lectinas y agregar una cantidad constante de eritrocitos puede estimarse la cantidad de lectinas (Hirabayashi, 2014). En la tabla 3 se muestra el título de hemaglutinación de la harina de frijol crudo en comparación con las harinas extrudidas.

Tabla 3. Concentración de hemaglutinación/mg de proteína soluble

Muestra	Título de hemaglutinación / mg de proteína
Frijol crudo	471 ± 213
Harina extrudida 120 °C	ND
Harina extrudida 140 °C	ND
Harina extrudida 160 °C	ND

ND: No detectado. Cada valor representa la media de dos repeticiones ± DS.

Como puede verse el frijol crudo tiene un alto título de hemaglutinación y éste no fue detectable después de que se aplicó el tratamiento térmico a las muestras, datos que concuerdan con lo reportado por (Batista *et al.*, 2010) quienes no observaron hemaglutinación después del proceso de extrusión a 150 °C. Estos resultados demostraron que el proceso de extrusión a altas temperaturas como las que se usaron en el presente trabajo tiene los mayores efectos en la reducción de inhibidores enzimáticos y enzimas para el caso del frijol común (Batista *et al.*, 2010). La estimación del contenido de lectinas por hemaglutinación de eritrocitos no es un método muy preciso aunque tal técnica sirve como un método para asegurar la eficiencia de los tratamientos a las semillas sobre la toxicidad de las mismas (Alonso *et al.*, 2000).

6.1.3. Concentración de ácido fítico

En la tabla 4 se muestran los porcentajes de ácido fítico en las muestras de estudio. El tratamiento de extrusión redujo el ácido fítico en un 33.3%, valores que se encuentran por encima de lo reportado por (Batista *et al.*, 2010) quienes reportaron reducción del 17 y del 26 % en el contenido de ácido fítico de dos cultivares de frijol después de un proceso de extrusión de 150°C, menores a los encontrados en el presente trabajo.

Tabla 4. Concentración de ácido fítico presente en la harina de frijol crudo y extrudido

Muestra	Ácido fítico (%)
Frijol crudo	0.302 ± 0.040 ^a
Harina extrudida 120 °C	0.201 ± 0.035 ^b
Harina extrudida 140 °C	0.201 ± 0.027 ^b

Harina extrudida 160 °C 0.201 ± 0.013^b

Los resultados representan la media de dos experimentos independientes $\pm$ la desviación estándar. Diferentes letras en la misma columna expresan diferencias significativas $\alpha=0.05$ en las pruebas de Tukey

6.2. Formulación de la bebida

6.2.1. Viscosidad de la base de frijol

Se ha reportado que el contenido de almidón en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) oscila entre el 22 y el 45 %, siendo así, sería de esperar que al mezclar harina de frijol y agua el contenido de almidón contribuya al incremento en la viscosidad de dicha mezcla. (Eyaru *et al.*, 2009) reportaron que en semillas de frijol cocidas a presión y alta temperatura (121 °C) se incrementó la cantidad de almidón total, en especial la de almidón de rápida digestión, mientras el contenido de almidón de lenta digestión y el almidón resistente disminuyeron. El remojo previo a la cocción asegura que la semilla se expanda e hidrate de manera uniforme contribuyendo así al ablandamiento del tejido vegetal durante la cocción. Siendo así, el almidón en semillas de frijol remojadas tiende a gelatinizarse de manera marcada durante la cocción a presión, ya que en el proceso de gelatinización los gránulos de almidón se rompen y como resultado se obtienen fragmentos de distintas longitudes. En este contexto y dado el contenido de almidón (o fragmentos del mismo) en la harina de frijol cocido por extrusión, se espera que la viscosidad de la bebida fuese muy elevada en comparación a la viscosidad de productos comerciales pudiendo resultar en una bebida de alta viscosidad más parecida a los productos usados en el tratamiento de disfagias, lo que podría representar una desventaja frente a los productos comerciales cuyas características fisicoquímicas, pero sobre todo sensoriales los han colocado en el

agrado de los consumidores (O'Leary *et al.*, 2010). Lo ideal sería obtener una bebida con una viscosidad muy similar a éste tipo de productos. Para efectos comparativos se usó el sustituto de leche de soya. Se obtuvo que las mezclas de extrudidos (3.5 % de harina de frijol) a 120 y 140 °C mostraron una viscosidad ligeramente mayor a la de un producto comercial a diferencia de la muestra de 160 °C que mostró una viscosidad incluso menor que la del producto comercial (figura 9).

Cabe recordar que además de almidón, el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) también contiene una cantidad considerable de proteína y que después de someterse a un tratamiento térmico, esta podría contribuir al incremento de la viscosidad como efecto de la desnaturalización de la misma. Se realizó también una rampa de temperatura (figura 10) de la mezcla de frijol al 3.5 % en agua (o base de frijol), obteniendo que a diferencia del ensayo anterior la viscosidad de la muestra extrudida a 160 °C fue mayor que la muestra de 140 °C, este comportamiento es atribuirse a que cuando los gránulos de almidón estén gelatinizados el contenido de proteína en el frijol tenga una sinergia con el resto de los componentes de la matriz resultando en una alta viscosidad. (Siddiq *et al.*, 2013) reportaron que las harinas de frijol extrudido mostraban menor viscosidad que harinas de frijol cocido al vapor, lo cual atribuyeron a que los tratamientos térmicos resultan, en la gelatinización completa de los gránulos de almidón, ya que se hidroliza la amilopectina y aumenta la absorción de agua. Estos mismos autores reportaron que el índice de absorción de agua aumenta proporcionalmente con la temperatura de procesamiento, debido probablemente a la dextrinización del almidón. El contenido de proteína en el frijol (20-25%) podría contribuir a la formación de puentes de hidrógeno entre las cadenas polipeptídicas permitiendo así mayor retención de agua. El índice de solubilidad en agua incrementa con la despolimerización del almidón y la consecuente reducción de la longitud de las cadenas de amilosa y amilopectina. Tanto las harinas de frijol blanco y pinto extrudido mostraron mayor índice de solubilidad que las harinas preparadas con frijol crudo y con frijol cocido al vapor a 82 °C debido a que el proceso de extrusión produce moléculas solubles y desnaturaliza proteína.

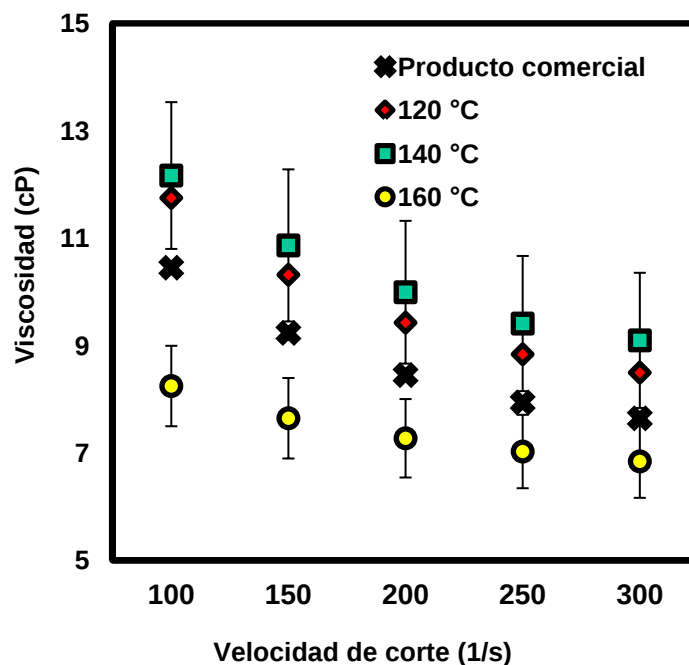


Figura 9. Viscosidad en cP de base de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (3.5% de harina de frijol extrudido) a una velocidad de corte de 100 a 300 (1/s) y de una muestra comercial. Cada valor representa la media de tres repeticiones $\pm$ DS

También se puede observar que en la rampa de temperatura (figura 8) no se tiene el comportamiento convencional de la gelatinización del almidón puesto que este ya pasó por el proceso térmico de la extrusión a alta humedad ($56.10 \pm 1.24\%$). El otro compuesto que pudiese alterar y contribuir al incremento de la viscosidad de una solución es la proteína ya que estas podría contribuir a la formación de una matriz proteína-almidón o proteína-proteína como ya se ha observado en el sustituto de leche de soya cuando se somete a dos procesos térmicos y cuya viscosidad se ve incrementada por la desnaturalización de proteínas (Liu *et al.*, 2004). Pudiendo atribuirse a la gelatinización incompleta del almidón la alta viscosidad cuando la muestra extrudida a 120 °C se enfría. La

desnaturalización de proteínas podría ser la causante de la alta viscosidad en las muestras extrudidas a 160 °C. Podría sugerirse que la muestra extrudida a 140°C contenía menos gránulos de almidón por

y que al mismo tiempo con la temperatura de extrusión se desnaturalizaron menos. Se eligió así la temperatura de 140 °C para continuar con la formulación. Cabe recordar que la base de frijol sería sometida a otro proceso térmico a 90 °C y que sería de interés que la bebida fuese poco viscosa (entre 15 y 25 cP).

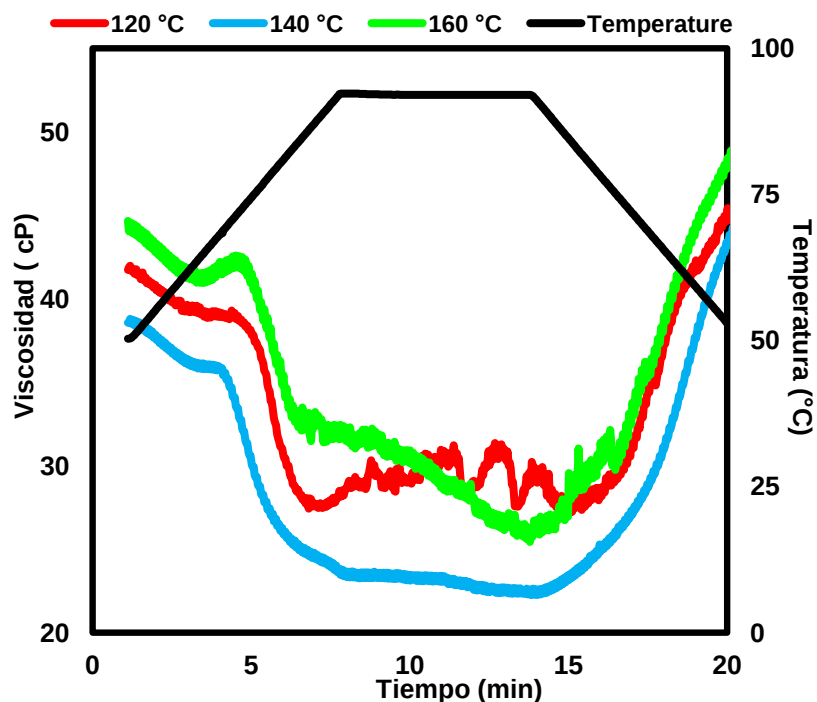


Figura 10. Rampa de temperatura de la base de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Cada valor representa la media de dos repeticiones

6.2.2. Formulación de la bebida

En la tabla 5 se muestran los componentes principales que se utilizaron en la formulación de la bebida.

Una vez establecido que se usaría la harina de frijol extrudido a 140 °C al 3.5 % ya que un mayor porcentaje del mismo resultaba en mezclas altamente viscosas se procedió a la formulación de la bebida. El primer paso fue obtener la emulsión. Una vez obtenida, ésta se mezcló con la harina de frijol y el resto de los aditivos de textura y de fortificación que se mencionaron en la sección de materiales y métodos.

Tabla 5. Ingredientes usados y su función

Ingrediente
Agua
Harina de frijol extrudido
Emulsificante
Vehículo para los compuestos grasos
Estabilizante 1
Estabilizante 2
Saborizante, endulzante, mejorador del sabor
Fortificación con vitaminas A, D y E
Fortificación con una fuente de calcio
Escencia de café, jarabe de chocolate y de fresa
Otros ingredientes funcional

6.3. Parámetros fisicoquímicos de la bebida

6.3.1. Viscosidad y tasa de sedimentación

Los resultados del experimento factorial se muestran en las figuras 9 y 10. Se observa que los tratamientos con mayor concentración de goma xantana (GX) son también los que presentan mayor viscosidad. Los tratamientos con menor tasa de sedimentación coinciden con aquellos de mayor viscosidad como era de esperarse, a excepción del tratamiento que contiene 0.12 % tanto de GX como de carboximetil celulosa (CMC) en el cual se observó un efecto antagónico en la sedimentación.

Dado que lo deseable era que la bebida fuese estable sin tener al mismo tiempo una viscosidad muy alta, se eligieron los niveles medios de ambos hidrocoloides para continuar con la formulación.

Traynor *et al.*, (2013) utilizaron GX para estabilizar una emulsión de aceite de girasol y lecitina de soya, reportaron que la concentración de GX fue la variable que tuvo la mayor influencia tanto en la viscosidad como en la tasa de asentamiento. La calidad percibida de una emulsión está influenciada por su estabilidad y apariencia por lo que resulta necesario que la emulsión resista los cambios en sus propiedades dentro de un periodo de tiempo. Cuanto más estable es una emulsión, más lentamente cambiarán sus propiedades. (Akkarachaneeyakorn y Tinrat, 2015) informaron que al comparar la viscosidad de una bebida estabilizada ya fuese con CMC o con GX, el uso de ésta última daba productos más viscosos.

Por otro lado, la lecitina es una molécula surfactante usada comúnmente como emulsificante en la industria alimentaria. Traynor *et al.*, (2013) reportaron que ésta tiene un efecto desestabilizador a niveles mayores de 2.5 % (p/v). En dicho estudio se obtuvo que la mayor estabilidad se encontró a

concentraciones de 19.02 % de aceite de girasol, 1.2 % de lecitina y 0.28 % de goma xantana.

La CMC reduce o previene la separación de las fases oleosas. La concentración a la que se usa normalmente oscila entre 0.1 – 0.4 % dependiendo de la viscosidad deseada, se usa sola o en combinación con otros hidrocoloides (Akkarachaneeyakorn y Tinrat 2015). Ésta ha sido utilizada para mejorar las características sensoriales y reológicas de productos como helados o sustituto leche de soya (Gatade *et al.*, 2014).

Deshpande *et al.* (2008) obtuvieron viscosidades entre 17 y 63 cP (un centipoise cP equivale a un mili-Pascal por segundo mPa.s) cuando se usaron en diferentes proporciones jarabe de chocolate, harina de soya y harina de cacahuete. Al usar un aislado proteico de soya en lugar de harina de soya la viscosidad incrementó notablemente y se obtuvieron valores entre 42-132 cP.

Con los niveles de hidrocoloides elegidos en el presente trabajo se obtuvieron viscosidades de 15-25 cP, lo que indicaría que con el fin de aumentar el potencial nutracéutico del sustituto de leche se podría añadir mayor porcentaje de harina de frijol extrudido, otra opción sería probar el efecto de otros hidrocoloides (goma guar, carragenina, etc.) en la estabilidad y viscosidad de la bebida

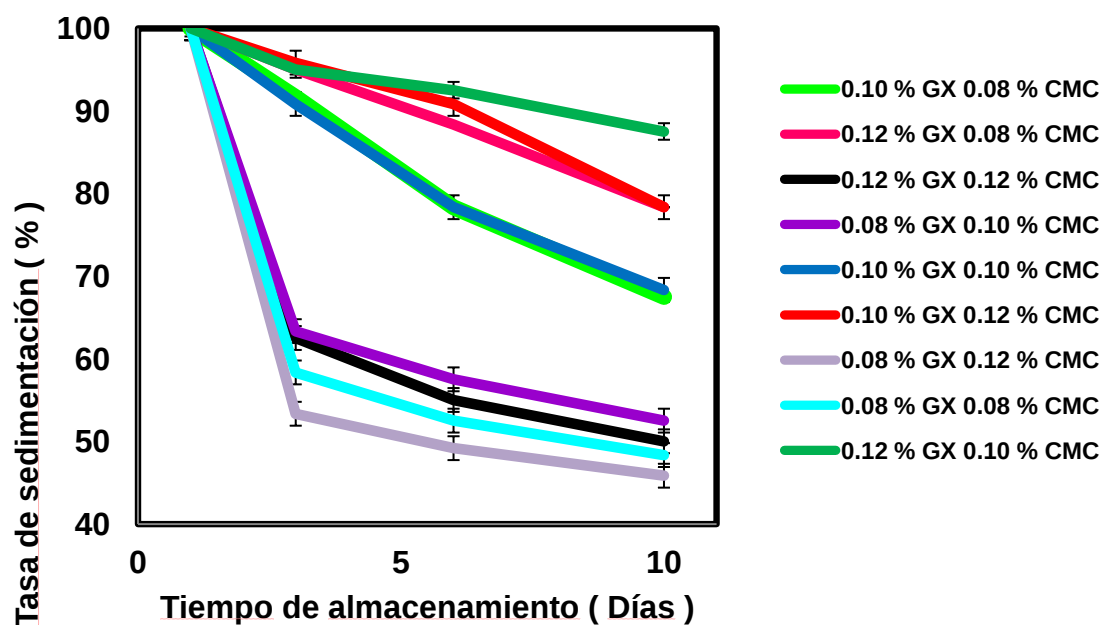


Figura 11. Asentamiento relativo de la bebida usando goma xantana (GX) y carboximetil celulosa (CMC). Cada valor representa la media de dos repeticiones $\pm$ DS

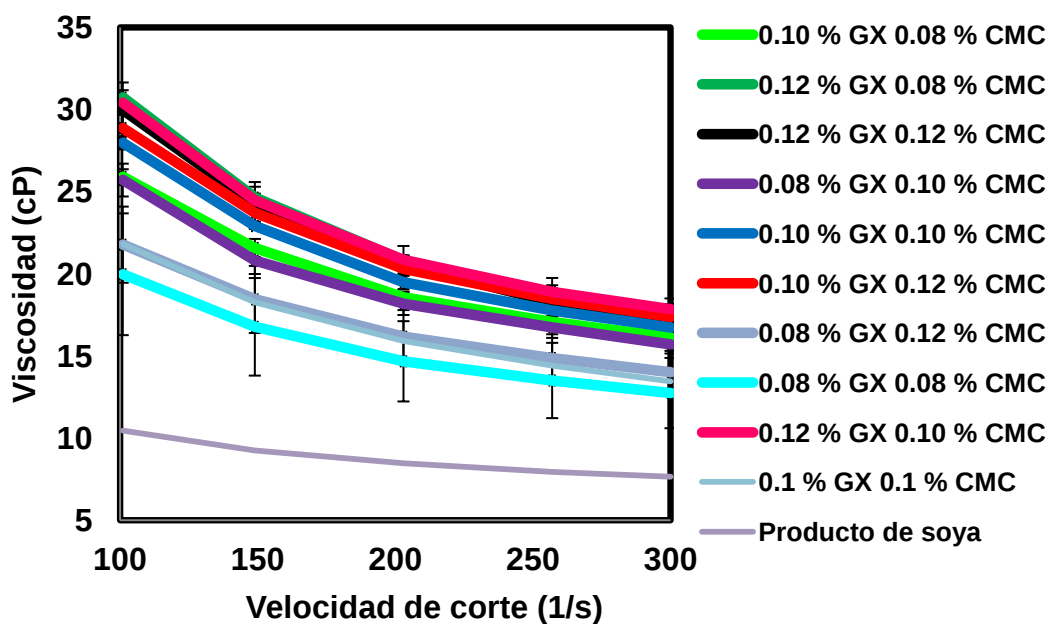


Figura 12. Viscosidad de la bebida preparada a una velocidad de corte en el rango 100-300 1/s. Cada valor representa la media de dos repeticiones $\pm$ DS

6.3.2. pH y color

Una vez establecidos los niveles de hidrocoloides y agregados los aditivos de fortificación, y terminado el proceso térmico, el sustituto de leche con harina de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) tuvo un pH de 6.66, similar al obtenido por (Faccin *et al.*, 2009) para un sustituto de leche de arroz.

Para comparar el color de la bebida de frijol común con las muestras comerciales se usó el sistema CIELAB. En la tabla 6 se muestran las coordenadas de color del sustituto de leche a base de harina de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.).

La L* (luminosidad) más baja fue para el sustituto de leche de frijol, es decir, dicha muestra fue la más oscura de las tres; se observa también que de acuerdo a la coordenada a* el sustituto de leche de frijol común es la que más se aleja del color rojo.

Tabla 6. Coordenadas cromáticas de los sustitutos de leche de frijol común, almendra y soya

Bebida	L*	a*	b*	C*
Frijol	52.75 ± 0.009 ^a	-2.33 ± 0.008 ^a	2.80 ± 0.025 ^a	3.64 ± 0.024 ^a
Almendra	68.75 ± 0.103 ^b	-1.38 ± 0.013 ^b	9.06 ± 0.035 ^b	9.16 ± 0.037 ^b
Soya	71.06 ± 0.008 ^c	-0.93 ± 0.011 ^c	13.93 ± 0.023 ^c	13.97 ± 0.023 ^c

Los resultados representan la media de tres experimentos independientes ± la desviación estándar. Diferentes letras en la misma columna expresan diferencias significativas $\alpha=0.05$ en las pruebas de Tukey

También para la coordenada b^* tiene el menor valor, lo cual indica que es la que tiene menor coloración amarilla de las tres. El valor C^* corresponde a la intensidad de color de la bebida. Hay que destacar que el color claro de la bebida se debe en gran medida a que las semillas se descascarillaron antes de comenzar con el proceso de extrusión. Es en la cascarilla de las leguminosas y oleaginosas donde se encuentran la mayor parte de los compuestos fenólicos que dan origen a la coloración en bebidas vegetales y bebidas vegetales fermentadas (Beuchat y Nail, 1978; Blouin *et al.*, 1981).

La homogenización también es un paso importante del proceso ya que cuando las partículas son pequeñas, particularmente glóbulos de grasa, éstas pueden dispersar más luz dando como resultados productos con mayor luminosidad (Diarra *et al.*, 2005). En la Figura 6.6 del apartado de materiales y métodos se observa que las coordenadas positivas en b^* indican la intensidad del color amarillo. En este caso la bebida comercial de soya presentó el mayor valor para este parámetro seguido por la de almendra y finalmente la bebida de frijol fue la menos amarilla de las tres. Si se deseara aprovechar la totalidad de la semilla de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) resultaría necesaria la adición de un colorante para enmascarar los colores oscuros que se han observado cuando se usa la totalidad de la semilla (Diarra *et al.*, 2005).

6.4. Evaluación sensorial

6.4.1. Evaluación sensorial de agrado

Se realizó una prueba de nivel de agrado y preferencia con la finalidad de comparar cómo era percibido el sustituto de leche de frijol común con respecto a sustitutos comerciales de soya y de almendras, siendo estos últimos los productos que más se consumen. Los atributos que se evaluaron fueron color,

olor, dulzor y agrado global. Se usó una escala hedónica de 7 puntos donde: 1= Me gusta extremadamente mostrado en azul oscuro, 2=Me gusta mucho mostrado en azul celeste, 3=Me gusta moderadamente mostrado en azul claro 4=Ni me gusta ni me disgusta mostrado en verde claro, 5= Me disgusta moderadamente mostrado en amarillo, 6=Me disgusta mucho mostrado en rojo y 7=Me disgusta extremadamente mostrado en rojo oscuro. La escala anterior aparece del lado derecho de las gráficas de frecuencia en el nivel de agrado (figuras 12-15). Esta prueba se aplicó a 100 panelistas no entrenados con edad promedio de 24.5 ± 4 años, 66 mujeres y 34 hombres, dentro de las instalaciones de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Los resultados fueron analizados con la prueba estadística del chi cuadrado (χ^2) con un valor α de 0.05. Cabe recordar que cuando $p < 0.0001$ se rechaza a hipótesis nula, es decir, se rechaza que las muestras sean iguales entre sí, o expresado con otras palabra, se acepta que las muestras son diferentes entre sí. Cuando $p > 0.0001$ se acepta la hipótesis nula, es decir, se acepta que las muestras son iguales.

En la figura 12 se presenta el diagrama de mosaicos que muestra el nivel de agrado para el atributo color. La proporción de panelistas a los que les agradó el color de la muestra comercial de soya fue casi de uno, tal muestra como se observa en la tabla 6, tenía un color amarillo tenue. El producto de frijol fue el que resultó menos favorecido en este atributo ya que la mitad de los panelistas le asignaron valores entre 5-7 en la escala hedónica de agrado, lo cual indica que el color es un atributo que disgustó moderadamente.

El sustituto de leche de almendra agradó a la mitad de los panelistas y desagradó a una cuarta parte de los mismos. (Rustom *et al.*, 1995) reportaron una correlación entre el la baja luminosidad de una bebida de cacahuete y valores de pH cercanos a 7 como en el presente trabajo. Tales investigadores propusieron que tal fenómeno se debía a una reacción de Maillard la cual podría ser responsable de la falta de luminosidad de la bebida y además podría estar relacionada con la disminución en los valores de pH de la bebida de cacahuete ya

que el grupo NH_2 de los aminoácidos y los azúcares presentes pueden dar lugar a este tipo de reacciones oscureciendo así el producto final y disminuyendo el número de cargas positivas disponibles. (Lee y Rhee, 2003) proponen que el descenso en el pH podría deberse además a la desnaturalización de proteínas y consecuente liberación de protones.

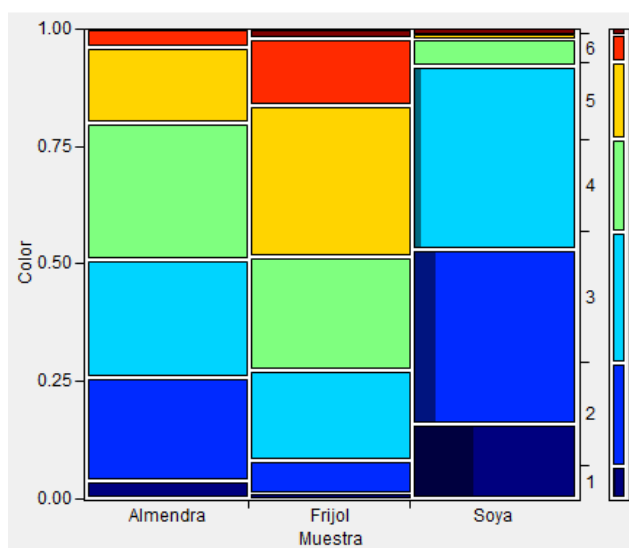


Figura 13. Frecuencia de nivel de agrado para el atributo color para los sustitutos de leche. 1= Me gusta extremadamente, 2=Me gusta mucho, 3=Me gusta moderadamente, 4=Ni me gusta ni me disgusta, 5= Me disgusta moderadamente, 6=Me disgusta mucho y 7=Me disgusta extremadamente

La figura 13 corresponde al atributo olor, en dónde se puede observar que no hay diferencia entre las muestras de frijol y de almendra y que al igual que en el atributo color, los panelistas prefirieron el olor del producto de soya. Se observa que la mayoría de los panelistas situaron a los productos de frijol y de almendra en el punto medio de la escala hedónica (punto 4), correspondiente a “Ni me gusta ni me disgusta”.

Lo anterior se refleja en el valor de $p=0.1022$, es decir, no se rechaza la hipótesis de nulidad (ambas muestras son iguales), lo que sugiere que al menos para el atributo de olor del sustituto de leche hecho de frijol no resulta desagradable a los consumidores y es equivalente a los productos comerciales de almendra y de soya.

Rustom *et al.*, (1995) compararon dos muestras de una bebida de cacahuete que se habían sometido a diferentes tiempos de pasteurización a 137 °C no hallando diferencia entre estos tratamientos, cabe destacar que para tal estudio se agregó sabor vainilla a ambos tratamientos. En el caso de la leche de soya se han reportado ampliamente aromas desagradables atribuidos a los productos de descomposición por oxidación enzimática (lipoxigenasa e hidroperóxido liasa) de los lípidos presentes en la semilla de soya. Entre los compuestos identificados como posibles causantes de tales aromas se encuentran lípidos, azúcares, aminoácidos y ácido ferúlico (Kaneko *et al.*, 2011).

En el caso del frijol común no se han reportado aromas desagradables aun cuando las semillas son sometidas a radiaciones gamma (Armelim *et al.*, 2006), cabe recordar que el contenido de lípidos en el frijol común es de 1.1% (Vergara-Castañeda *et al.* 2010) y el de la soya es de 19% (Dwevedi y M. 2011) mientras que en la almendra es de cerca del 44% (Ahrens *et al.*, 2005), por tanto los productos de descomposición de lípidos y consecuente aroma no serían un problema en la producción a gran escala de una bebida de frijol común.

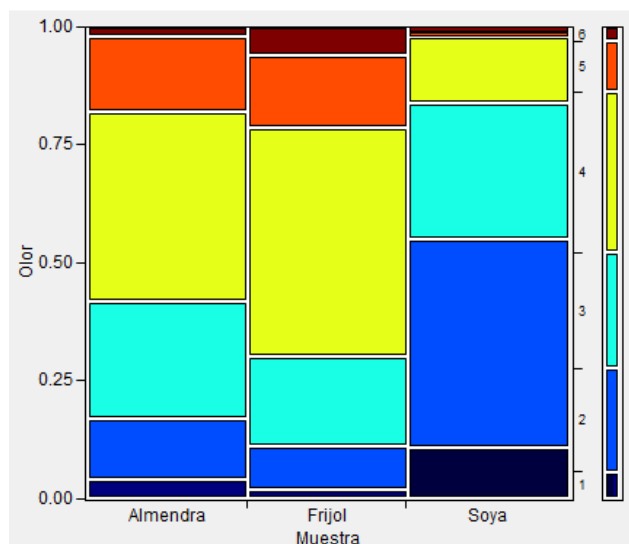


Figura 14. Frecuencia de nivel de agrado para el atributo olor para los sustitutos de leche. 1= Me gusta extremadamente, 2=Me gusta mucho, 3=Me gusta moderadamente, 4=Ni me gusta ni me disgusta, 5= Me disgusta moderadamente, 6=Me disgusta mucho y 7=Me disgusta extremadamente

En la figura14 se muestra la preferencia para el atributo dulzor. Puede observarse que casi el 60 % de los panelistas situaron al producto de frijol entre los puntos 1 y 4 de la escala hedónica, es decir, no fue desagradable el producto endulzado con sucralosa en concentración al 0.015 %. Tanto el producto de soya como el de almendra reportan azúcar de caña como endulzante, tal ingrediente aumentaría el valor calórico de dichas bebidas. Lo anterior indica que incluso cuando se esperaría un sabor neutro de un sustituto de leche, el sabor dulce agradó al consumidor. En futuros trabajos habría que describir a qué grupos de edades agrada y a cuales no el dulzor y si la edad es un factor determinante para el agrado de tal sabor en este tipo de productos. La aceptación de las bebidas de origen vegetal se ve afectada cuando se perciben sabores desagradables, entre los compuestos que imparten sabores desagradables se encuentran las saponinas

presentes principalmente en la cáscara de semillas como cacahuate o frijol común (Rustom *et al.*, 1995; Guajardo-Flores *et al.*, 2012), para el desarrollo de este trabajo las semillas se descascarillaron y se procesaron únicamente los cotiledones, así las saponinas u otro compuesto presente en la cascarilla no tuvieron influencia sobre el sabor. Ya se mencionó que algunos de los compuestos asociados a sabores astringentes en los productos de soya son los productos de descomposición de lípidos catalizados por cicloxigenasas (Achouri *et al.*, 2006). K

Koyama y Kitamura, (2014) prepararon una bebida de arroz sin agregando únicamente goma xantana como aditivo. Observaron que sensorialmente la bebida que contenía 0.3% de goma xantana mostró mayor agrado en aroma y sabor, reportaron también que el material que no contenía tal hidrocoloide fue calificado como “sin sabor y débil”. Lo anterior les sugirió que la viscosidad impacta en el sabor de las bebidas vegetales, para ese estudio la viscosidad fue de 15 ± 5 cP en el caso de la bebida desarrollada en el presente trabajo la viscosidad oscila entre 15 y 25 cP otorgada en gran medida por la adición de hidrocoloides. Dependerá de la preferencia del consumidor la adición o no de saborizantes, son pocos los trabajos de desarrollo de sustitutos de leche a partir de semillas o cereales donde no se adiciona ningún sabor.

Tanto Koyama y Kitamura (2014) como Pineli *et al.* (2015) recomiendan la adición de sabores para futuros trabajos. Incluso las bebidas comerciales que se promocionan con sabor “Natural” contienen algún edulcorante, razón por la cual se agregó sucralosa en la bebida de frijol común. Según el reporte de la firma Rockville de investigación de mercados las bebidas alternas a la leche de vaca representan un mercado creciente, y de éstas los productos no endulzados representan el 27% (Dairy alternatives continue to increase market share | 2015-11-12 | Beverage Industry n.d.).

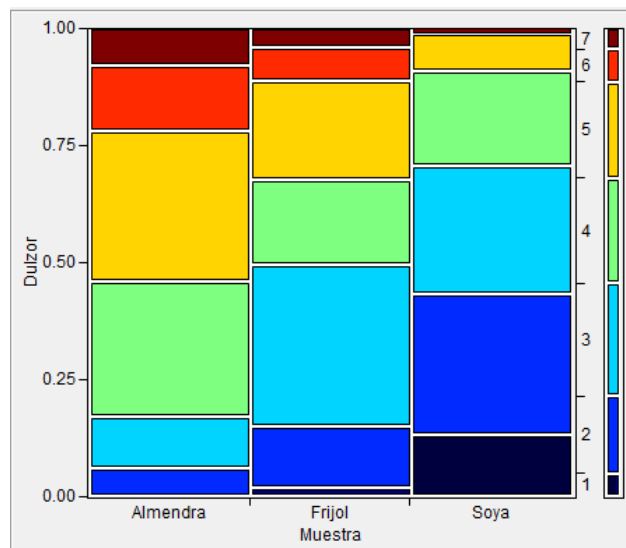


Figura 15. Frecuencia de nivel de agrado para el atributo dulzor para los sustitutos de leche. 1= Me gusta extremadamente, 2=Me gusta mucho, 3=Me gusta moderadamente, 4=Ni me gusta ni me disgusta, 5= Me disgusta moderadamente, 6=Me disgusta mucho y 7=Me disgusta extremadamente

Finalmente en la figura 15 se puede observar el resultado para el atributo agrado global. Como se podía esperar, en concordancia con los niveles de agrado mostrados para los parámetros anteriores, el producto comercial de soya es el que resultó agradable para el 75% de los panelistas mientras que el producto de frijol se situó en segundo lugar de agrado para los panelistas quienes lo colocaron en los puntos 1-3 de la escala hedónica mientras que otros se mantuvieron neutrales frente a este producto y lo colocaron en el punto 4. Para el caso del producto de almendra se observa que menos de una cuarta parte de los panelistas lo definieron como agradable y una cuarta parte lo colocó en el punto 4 (neutral). La mitad de los panelistas lo calificó con los puntos 5-7, es decir los correspondientes al desagrado. No obstante cuando se comparó al producto de almendras y el de frijol con la prueba de chi cuadrado se obtuvo un valor de $p=0.088$, es decir, no

hay diferencias entre ambas muestras para este atributo como ya se había observado en el atributo olor. Para la evaluación sensorial de bebidas de soya Shi *et al.* (2015) entrenaron a un panel de 10 personas para evaluar leche de soya preparada con diferentes cultivares de la semilla. Tal panel describió los atributos de la leche de soya como sigue: aroma de avena cocida, sabor a cereal, aroma de frijoles cocidos, sabor afrijolado, sabor de cascarilla de arroz y aceite oxidado. Lo anterior podría darnos una idea de las características puntuales que se podrían evaluar en el sustituto de leche de frijol común con el fin de dar un perfil más preciso del producto.

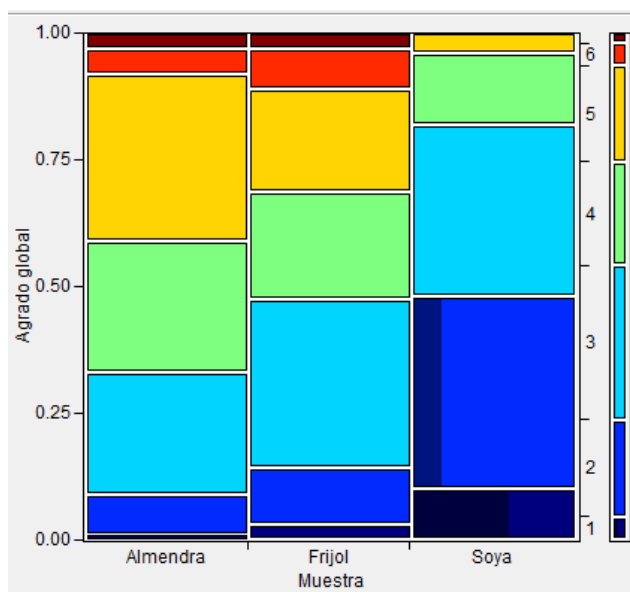


Figura16. Frecuencia de nivel de agrado para la variable agrado global para los sustitutos de leche. 1= Me gusta extremadamente, 2=Me gusta mucho, 3=Me gusta moderadamente, 4=Ni me gusta ni me disgusta, 5= Me disgusta moderadamente, 6=Me disgusta mucho y 7=Me disgusta extremadamente

En la tabla 7 se muestran los valores de p para la prueba de chi cuadrado del análisis sensorial de agrado de los sustitutos de leche. Aun cuando se esperaba que el agrado fuese menor al de las muestras comerciales ya que los sabores nuevos no siempre se aceptan, es un logro considerable que en agrado global el producto que se propone sea igual al producto comercial de almendra. Éste último es el que reporta las ventas más altas en cuanto a sustitutos de leche se refiere en Estados Unidos (WhiteWave Foods n.d.).

Tabla 7. Comparación entre el nivel de agrado de los sustitutos de leche usando la prueba de chi cuadrado

Muestras	Color	Olor	Dulzor	Agrado global
Almendra-Soya	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Soya-Frijol	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Almendra-Frijol	<0.0001	0.1022	<0.0001	0.088

6.4.2. Evaluación sensorial de preferencia

Algunos autores recomiendan la adición de sabor para mejorar la aceptabilidad para los sustitutos de leche preparados de fuentes vegetales (Faccin *et al.*, 2009; Reyes-Moreno *et al.*, 2012; Pineli *et al.*, 2015). Para la prueba sensorial de preferencia se probaron tres diferentes sabores: café, chocolate y fresa. Las bebidas con sabores añadidos de café y de chocolate fueron las que mostraron mayor preferencia entre los panelistas (en azul marino) como lo muestra la figura 16, cuando se compararon con la bebida natural.

En la tabla 8 se muestra que sólo entre la comparación entre el sabor café y el sabor chocolate el valor de $p=0.5617$ indica que se acepta la hipótesis nula, es decir que no hubo diferencias en la preferencia de ambas muestras. También se puede observar que la mayoría de los panelistas colocaron al sabor natural el último lugar (en rojo). El color azul oscuro corresponde al primer lugar en la preferencia, el azul claro al segundo, el amarillo al tercero y el rojo al cuarto y último (menos preferido). La evaluación se llevó a cabo con 50 participantes con una media de edad de 24.2 ± 3.8 años, 28 mujeres y 22 hombres, en las instalaciones de la Universidad Autónoma de Querétaro.

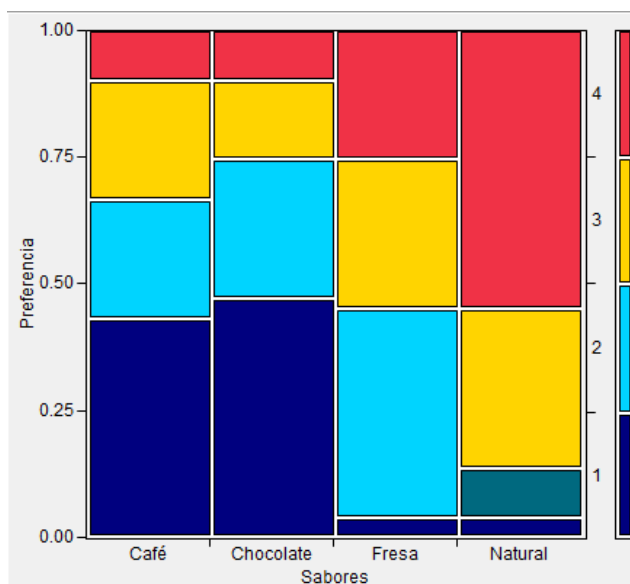


Figura 17. Proporción de preferencia global de cada bebida. (1=mayor agrado, 4=menor agrado)

Tabla 8. Comparación entre la preferencia de las bebidas saborizadas usando la prueba de chi cuadrado

Sabor de las muestras		Significancia
Natural	Chocolate	<0.0001*
Fresa	Chocolate	<0.0001*
Café	Chocolate	0.5617
Fresa	Natural	0.0004*
Café	Fresa	0.0002*
Café	Natural	<0.0001*

Se usó un valor de significancia de 0.05.

(Deshpande *et al.*, (2008) usaron jarabe de chocolate para enmascarar malos sabores derivados de la oxidación de los componentes grasos de bebidas de soya y cacahuete. En tal formulación se agregó del 13-26 % de jarabe de chocolate en la preparación de una bebida. En la formulación preparada con frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) solo se agregó el 10 % (v/v) de jarabe de chocolate y fue aceptado por los panelistas. Lo anterior sería de importancia si se desea comercializar la bebida de frijol ya que podría competir con los sustitutos de leche saborizados. Faccin *et al.* (2009) agregaron saborizantes de fresa y de chocolate siendo este último el que tuvo mayor aceptación. Según reportan Tuorila *et al.* (1994) las expectativas son una parte importante de la evaluación de un nuevo producto, en este caso la bebida de frijol al ser un producto nuevo con características y sabor desconocidos resultó del agrado de más de la mitad de los panelistas cuando se agregó sabor chocolate y sabor café.

6.5. Composición química y nutracéutica

6.5.1. Composición química

La leche de vaca se ha considerado un alimento completo al aportar macronutrientes como proteína (3.5 %), carbohidratos (4.4 %) y grasa (3.5 % en leche entera) así como micronutrientes como calcio (0.115 %), fósforo (0.093 %), además de vitaminas A, D y C (Agostoni y Turck, 2011)., sin embargo los motivos entre los que se encuentran la intolerancia a la lactosa, alergia a las proteínas de la leche, hiperlipidemias, estilos de vida veganos, y la posible relación con el desarrollo de cáncer de próstata (Melnik *et al.*, 2012; Mäkinen *et al.*, 2015) han llevado al desarrollo de sustitutos de la leche de vaca preparados a partir de fuentes vegetales, tal es el caso del presente trabajo.

Los resultados de los análisis de composición química se muestran en la tabla 9. El contenido de proteína fue de 0.99 ± 0.03 g/100 ml, valor que está por debajo de lo reportado para algunos sustitutos de leche. Por ejemplo Bernat *et al.* (2015) reportaron 1.37 g/ 100 g y 0.65 g/ 100 g de proteína para la leche de almendras y de avellana respectivamente. En ese mismo estudio el contenido de lípidos fue de alrededor de 4 g/ 100 g, es decir 8 gramos en una porción de 200 ml. En este trabajo se buscó que el producto tuviese bajo contenido de grasa ya que se observó que los productos comerciales contienen de 2.5-3 g de grasa por porción (200 ml).

En el caso de una bebida de avena se obtuvo prácticamente la misma cantidad de proteína en 100 ml (1.0 gramos), aunque el contenido de grasa para la bebida de avena fue del doble (1.5 g) que la obtenida en el presente trabajo (tabla 9) y en el caso de los carbohidratos era de esperar que dado el contenido de fibra presente en un cereal como la avena el contenido de carbohidratos fuese mayor (6.5 g). (Zhang *et al.*, 2007)

En un estudio más reciente de Pineli *et al.*, (2015) desarrollaron un sustituto de leche a partir de quinoa obteniendo valores superiores en el contenido de proteína a los del presente trabajo, independientemente de la cantidad de quinoa utilizada, ellos planteaban el uso de una solución ligeramente ácida (pH 5) para lograr una mejor extracción de las proteínas de este cereal. Por lo que en el caso de la bebida hecha a base de frijol podría mejorarse el contenido de proteína con un tratamiento similar de pH en combinación con soluciones salinas para las semillas de frijol.

El sustituto de leche de soya, al estar preparado a partir de una leguminosa fue el producto más parecido a la bebida desarrollada en este trabajo Ryan y Sutherland (2011) compararon varias marcas de sustituto de leche de soya comercializadas en Reino Unido, en todos los casos para éstos productos se reportó un contenido de alrededor de 3 g de proteína en una porción de 100 ml.

Tabla 9. Contenido de proteína, lípidos, cenizas, carbohidratos y humedad en el sustituto de leche de frijol.

Proteína (%)	Lípidos (%)	Cenizas (%)	Humedad (%)	Carbohidratos (%)
0.99 ± 0.03	0.88 ± 0.11	0.002 ± 0.0003	95.3 ± 0.03	2.83

Cada valor representa la media de tres repeticiones $\pm$ la desviación estándar.

6.5.2. Composición nutracéutica

6.5.2.1. Composición de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante

En la tabla 10 se muestra el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y taninos en el sustituto de leche de frijol. En el presente trabajo, se

usó el cotiledón de la semilla de frijol. La cascarilla retirada después del remojo se almacenó a 4 °C, ya que hay que recordar que ésta contiene muchos de los compuestos fenólicos que le otorgan al frijol una parte de su potencial antioxidante siendo así un subproducto con potencial nutracéutico como lo reportaron Servili *et al.* (2011).

Vergara-Castañeda *et al.*, (2010) reportan concentraciones 6 y 20 veces mayores de compuestos fenólicos y de taninos condensados respectivamente para frijol común cocido que los reportados en el presente trabajo. El bajo contenido de los mismos en la bebida de frijol era de esperarse ya que al retirar la cascarilla y mezclar la harina extrudida de frijol con agua se redujo la concentración de los mismos.

6.5.2.2. Capacidad antioxidante

En la tabla 10 se muestra la capacidad antioxidante del sustituto de leche de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Ryan y Sutherland (2011) reportaron valores de FRAP para el sustituto de leche de soya mil veces mayor al reportado en la tabla 10. Hay que recordar que en la bebida de frijol común se retiró la cascarilla que es donde se encuentra una gran proporción de los compuestos fenólicos de la semilla de frijol.

Tabla 10. Contenido de compuestos fenólicos y de actividad antioxidante en el sustituto de leche

Compuesto	Concentración
Compuestos fenólicos	1.52 ± 0.08 µg eq. Ácido gálico/ml
Flavonoides	5.86 ± 0.54 µg eq. Rutina/ ml
Taninos condensados	4.54 ± 0.28 µg eq. (+) catequina/ ml
DPPH	1.18 ± 0.09 µmol trolox/ml
FRAP	5.54 ± 0.21 µmol Fe ²⁺

Cada valor representa la media de tres repeticiones ± DS

6.5.2.3. Contenido de fibra

En la tabla 11 se muestra el contenido de fibra total (insoluble y soluble) del sustituto de leche de frijol. El porcentaje de fibra total fue mayor en este trabajo que el reportado por (Bernat *et al.*, 2015) quienes reportan 0.58 y 0.40 para el sustituto de leche de almendra y de avellana respectivamente.

Tabla 11. Porcentaje de fibra total, soluble e insoluble en el sustituto de leche

Fibra insoluble (%)	Fibra soluble (%)	Fibra total (%)
1.256 ± 0.078	0.046 ± 0.004	1.778 ± 0.067

Cada valor representa la media de dos repeticiones ± DS

Adedokum *et al.* (2014) usaron tres diferentes fuentes vegetales para preparar un sustituto de leche, entre ellos al tubérculo chufa (*Cyperus esculentus* L.), a la leguminosa bámbara (*Vigna subterranean* L.) y una fruta como el coco (*Cocus nucifera*) reportan valores muy similares de fibra dietaria total a los del presente trabajo. El mayor contenido de fibra para la bebida a base de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) podría atribuirse a que se está utilizando todo el cotiledón y a diferencia de otros procedimientos, no se produce ningún residuo como el okara, residuo de la producción de leche de soya (Toda *et al.*, 2007).

VII. Conclusiones

En el desarrollo tecnológico en el área de alimentos la innovación juega un papel importante, parte importante de la misma está dada por la búsqueda del reemplazo de ingredientes que obedece a tendencias nutricionales o a necesidades del consumidor.

Aun cuando el desarrollo de nuevos productos, en este caso una bebida funcional, pudiese parecer simple, desafortunadamente la realidad es diferente. El desarrollo de tales bebidas es un reto tecnológico al tener que cumplir con la aceptación sensorial (color, sabor, textura, sensación en la boca, etc) y al mismo tiempo conservar los compuestos bioactivos y/o funcionales de los ingredientes y aditivos durante su producción y almacenamiento lo cual no es una tarea sencilla aún a pequeña escala.

En el presente trabajo se buscó que además de los componentes nutraceuticos presentes en el frijol, la bebida estuviese enriquecida con vitaminas y minerales que el consumidor esperaría de este tipo de productos.

La bebida desarrollada en el presente trabajo muestra potencial para ser usada como un sustituto de leche ya que el contenido de proteína (0.9 %) fue similar al reportado en otros trabajos y a lo observado en los productos comerciales. Su bajo contenido en grasa podría ser un factor para elegir este producto entre otros en los que se ha reportado un contenido mayor de la misma.

La cantidad de fibra presente en la bebida podría impartirle potencial prebiótico. Si bien se esperaba una mayor cantidad de compuestos fenólicos y de potencial antioxidante no se descarta que en un futuro y usando hidrocoloides que impartan menos viscosidad sin sacrificar la estabilidad, pueda agregarse mayor cantidad de harina de frijol y/o extraer de la cascarilla los compuestos bioactivos que impactan esta cualidad. El potencial nutraceutico que pudiese tener la bebida estaría dado por la cantidad de proteína y potencial formación de péptidos bioactivos y así como por el contenido de fibra del frijol común. Por otro lado el

potencial funcional se lo impartirían los aditivos ácido linoleico conjugado Tonalin®, calcio y vitaminas A y D que se agregaron a la formulación.

Al no existir un producto similar en el mercado la formulación propuesta se basó tanto en reportes de la literatura científica como en los productos comerciales actualmente disponibles. Quedará como perspectiva para futuros trabajos mejorar, reformular u optimizar el producto obtenido.

VIII. Bibliografía

- 2014 State of the Industry: Dairy and alternatives.
<http://www.bevindustry.com/articles/87614-state-of-the-industry-dairy-and-alternatives?v=preview>. Fecha de consulta: 29 de noviembre de 2015.
- Achouri A., J.I. Boye, and Y. Zamani. 2006. Identification of volatile compounds in soymilk using solid-phase microextraction-gas chromatography. *Food Chem* 99:759–766.
- Agostoni C. and D. Turck. 2011. Is cow's milk harmful to a child's health? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 53:594–600.
- Ahrens S., M. Venkatachalam, A.M. Mistry, K. Lapsley, and S.K. Sathe. 2005. Almond (*Prunus dulcis* L.) Protein Quality. *Plant Foods Hum Nutr* 60:123–128.
- Aidoo H., E. Sakyi-Dawson, L. Abbey, K. Tano-Debrah, and F.K. Saalia. 2012. Optimisation of chocolate formulation using dehydrated peanut-cowpea milk to replace dairy milk. *J Sci Food Agric* 92:224–231.
- Aidoo H., E. Sakyi-Dawson, K. Tano-Debrah, and F.K. Saalia. 2010. Development and characterization of dehydrated peanut–cowpea milk powder for use as a dairy milk substitute in chocolate manufacture. *Food Res Int* 43:79–85.
- Akkarachaneeyakorn S. and S. Tinrat. 2015. Effects of types and amounts of stabilizers on physical and sensory characteristics of cloudy ready-to-drink mulberry fruit juice. *Food Sci Nutr* 3:213–220.
- Alam M.S., J. Kaur, H. Khaira, and K. Gupta. 2015. Extrusion and Extruded Products: Changes in Quality Attributes as Affected by Extrusion Process Parameters: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 0.
- Alonso R., A. Aguirre, and F. Marzo. 2000. Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chem* 68:159–165.

- Alonso R., L.A. Rubio, M. Muzquiz, and F. Marzo. 2001. The effect of extrusion cooking on mineral bioavailability in pea and kidney bean seed meals. *Anim Feed Sci Technol* 94:1–13.
- Andrés V., M.J. Villanueva, and M.D. Tenorio. 2014. Simultaneous determination of tocopherols, retinol, ester derivatives and β -carotene in milk- and soy-juice based beverages by HPLC with diode-array detection. *LWT - Food Sci Technol* 58:557–562.
- Análisis de la cadena de valor del frijol. Secretaría de Economía. https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwini9y1yrfJAhXHWD4KHY6LB_oQFggcMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.economia.gob.mx%2Ffiles%2Fcomunidad_negocios%2Findustria_comercio%2Fanalisis_cadena_valor_frijol.pdf&usg=AFQjCNFR7nf0kHNw5IOvfz9GHmEXRj-PmQ. Fecha de consulta: 29 de noviembre de 2015
- Annunziata A. and R. Vecchio. 2011. Functional foods development in the European market: A consumer perspective. *J Funct Foods* 3:223–228.
- Aparicio-Fernández X., T. García-Gasca, G.G. Yousef, M.A. Lila, E. González de Mejia, and G. Loarca-Pina. 2006. Chemopreventive activity of polyphenolics from black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on HeLa and HaCaT cells. *J Agric Food Chem* 54:2116–2122.
- Aparicio-Fernandez X., G.G. Yousef, G. Loarca-Pina, E. de Mejia, and M.A. Lila. 2005. Characterization of polyphenolics in the seed coat of Black Jamapa bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem* 53:4615–4622.
- AOAC, Association of Official Analytical chemist (2002). *Official Methods of Analysis*. 17th ed; Arlington, VA. Métodos 920.39, 920.85, 920.105, 925.23, 991.43.
- Ariza-Ortega T. de J., E.Y. Zenón-Briones, J.L. Castrejón-Flores, J. Yáñez-Fernández, Y. de las M. Gómez-Gómez, and M. del C. Oliver-Salvador. 2014. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory, antimicrobial, and antioxidant effect of bioactive peptides obtained from different varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) with in vivo antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats. *Eur Food Res Technol* 239:785–794.

- Armelim J.M., S.G. Canniatti-Brazaca, M.H.F. Spoto, V. Arthur, and S.M.S. Piedade. 2006. Quantitative Descriptive Analysis of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under Gamma Radiation. *J Food Sci* 71:S8–S12.
- Batista K.A., S.H. Prudêncio, and K.F. Fernandes. 2010. Changes in the functional properties and antinutritional factors of extruded hard-to-cook common beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *J Food Sci* 75:C286–290.
- Bello-Pérez L.A. and Paredes-López O. 2009. Starches of Some Food Crops, Changes During Processing and Their Nutraceutical Potential. *Food Eng Rev* 1:50–65.
- Benzie I.F.F. and J.J. Strain. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal Biochem* 239:70–76.
- Bernat N., M. Cháfer, C. González-Martínez, J. Rodríguez-García, and A. Chiralt. 2014. Optimisation of oat milk formulation to obtain fermented derivatives by using probiotic *Lactobacillus reuteri* microorganisms. *Food Sci Technol Int Cienc Tecnol Los Aliment Int*.
- Bernat N., M. Cháfer, J. Rodríguez-García, A. Chiralt, and C. González-Martínez. 2015. Effect of high pressure homogenisation and heat treatment on physical properties and stability of almond and hazelnut milks. *LWT - Food Sci Technol, Healthy Snacks: Recent Trends and Innovative Developments to Meet Current Needs* 62:488–496.
- Beuchat L.R. and B.J. Nail. 1978. Fermentation of Peanut Milk With. *J Food Sci* 43:1109–1112.
- Bigliardi B. and F. Galati. 2013. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends Food Sci Technol* 31:118–129.
- Blouin F.A., Z.M. Zarins, and J.P. Cherry. 1981. Role of Flavonoids in the Production of Color in Biscuits Prepared with Wheat and Cottonseed Flours. *J Food Sci* 46:266–271.
- Bonetti A., I. Marotti, and G. Dinelli. 2007. Urinary excretion of kaempferol from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in humans. *Int J Food Sci Nutr* 58:261–269.

- Campos-Vega R., R.G. Guevara-Gonzalez, B.L. Guevara-Olvera, B. Dave Oomah, and G. Loarca-Piña. 2010. Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) polysaccharides modulate gene expression in human colon cancer cells (HT-29). *Food Res Int* 43:1057–1064.
- Campos-Vega R., R. Reynoso-Camacho, G. Pedraza-Aboytes, J. a. Acosta-Gallegos, S. h. Guzman-Maldonado, O. Paredes-Lopez, B. d. Oomah, *et al.* 2009. Chemical Composition and In Vitro Polysaccharide Fermentation of Different Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Food Sci* 74:T59–T65.
- Cardador-Martínez A., E. Castaño-Tostado, and G. Loarca-Piña. 2002. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds present in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B 1. *Food Addit Amp Contam* 19:62–69.
- Cardador-Martínez A., G. Loarca-Piña, and B.D. Oomah. 2002. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem* 50:6975–6980.
- Chávez-Santoscoy R.A., J.A. Gutiérrez-Urbe, and S.O. Serna-Saldívar. 2013a. Effect of flavonoids and saponins extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats as cholesterol micelle disruptors. *Plant Foods Hum Nutr Dordr Neth* 68:416–423.
- Coda R., A. Lanera, A. Trani, M. Gobetti, and R. Di Cagno. 2012. Yogurt-like beverages made of a mixture of cereals, soy and grape must: microbiology, texture, nutritional and sensory properties. *Int J Food Microbiol* 155:120–127.
- Cohn J.S., A. Kamili, E. Wat, R.W.S. Chung, and S. Tandy. 2010. Reduction in intestinal cholesterol absorption by various food components: mechanisms and implications. *Atheroscler Suppl* 11:45–48.
- Corcoran B.M., C. Stanton, G.F. Fitzgerald, and R.P. Ross. 2005. Survival of Probiotic Lactobacilli in Acidic Environments Is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. *Appl Environ Microbiol* 71:3060–3067.
- Dairy alternatives continue to increase market share.
<http://www.bevindustry.com/articles/88870-dairy-alternatives-continues-to-increase-market-share-> Fecha de consulta: 29 de noviembre de 2015

- De Almeida Costa G.E., K. da Silva Queiroz-Monici, S.M. Pissini Machado Reis, and A.C. de Oliveira. 2006. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chem* 94:327–330.
- Deshpande R.P., M.S. Chinnan, and R.D. Phillips. 2008. Process development of a chocolate-flavoured peanut–soy beverage. *Int J Food Sci Technol* 43:886–894.
- Deshpande S.S. and M. Cheryan. 1985. Evaluation of Vanillin Assay for Tannin Analysis of Dry Beans. *J Food Sci* 50:905–910.
- Dhakal S., C. Liu, Y. Zhang, K.H. Roux, S.K. Sathe, and V.M. Balasubramaniam. 2014. Effect of high pressure processing on the immunoreactivity of almond milk. *Food Res Int* 62:215–222.
- Diarra K., Z.G. Nong, and C. Jie. 2005. Peanut milk and peanut milk based products production: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45:405–423.
- Dwevedi A. and A. M. 2011. Soybean: a Multifaceted Legume with Enormous Economic Capabilities. in T.-B. Ng ed. *Soybean - Biochem Chem Physiol*. InTech.
- Ekanayaka R. a. I., N.K. Ekanayaka, B. Perera, and P.G.S.M. De Silva. 2013. Impact of a Traditional Dietary Supplement with Coconut Milk and Soya Milk on the Lipid Profile in Normal Free Living Subjects. *J Nutr Metab* 2013:e481068.
- Eyaru R., A.K. Shrestha, and J. Arcot. 2009. Effect of various processing techniques on digestibility of starch in Red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and two varieties of peas (*Pisum sativum*). *Food Res Int* 42:956–962.
- Faccin G.L., L.A. Miotto, L. do N. Vieira P.L.M. Barreto, and E.R. Amante. 2009. Chemical, Sensorial and Rheological Properties of a New Organic Rice Bran Beverage. *Rice Sci* 16:226–234.
- Feregrino-Pérez A.A., L.C. Berumen, G. García-Alcocer, R.G. Guevara-Gonzalez, M. Ramos-Gomez, R. Reynoso-Camacho, J.A. Acosta-Gallegos, *et al.* 2008. Composition and chemopreventive effect of polysaccharides from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on azoxymethane-induced colon cancer. *J Agric Food Chem* 56:8737–8744.

- Fukumoto L.R. and G. Mazza. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 48:3597–3604.
- Furusawa Y., Y. Obata, S. Fukuda, T.A. Endo, G. Nakato, D. Takahashi, Y. Nakanishi, *et al.* 2013. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504:446–450.
- Gepts P. and F.A. Bliss. 1986. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from Colombia. *Econ Bot* 40:469–478.
- Ghosal A., V.S. Subramanian, and H.M. Said. 2011. Role of the putative N-glycosylation and PKC-phosphorylation sites of the human sodium-dependent multivitamin transporter (hSMVT) in function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1808:2073–2080.
- Granito M., J. Frias, R. Doblado, M. Guerra, M. Champ, and C. Vidal-Valverde. 2002. Nutritional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*) by natural fermentation. *Eur Food Res Technol* 214:226–231.
- Granito M., L. Trujillo, and M. Guerra. 2004. Uso de *Phaseolus vulgaris* y *Vigna sinensis* como extensores de una bebida láctea fermentada. *Arch Latinoam Nutr* 54:229–234.
- Guajardo-Flores D., M. García-Patiño, D. Serna-Guerrero, J.A. Gutiérrez-Urbe, and S.O. Serna-Saldívar. 2012. Characterization and quantification of saponins and flavonoids in sprouts, seed coats and cotyledons of germinated black beans. *Food Chem* 134:1312–1319.
- Guéguen L. and A. Pointillart. 2000. The bioavailability of dietary calcium. *J Am Coll Nutr* 19:119S–136S.
- Guerrero-Beltrán J.A., Y. Estrada-Girón, B.G. Swanson, and G.V. Barbosa-Cánovas. 2009. Pressure and temperature combination for inactivation of soymilk trypsin inhibitors. *Food Chem* 116:676–679.
- Guillamón E., M.M. Pedrosa, C. Burbano, C. Cuadrado, M. de C. Sánchez, and M. Muzquiz. 2008. The trypsin inhibitors present in seed of different grain legume species and cultivar. *Food Chem* 107:68–74.

- Gundersen T.E. and R. Blomhoff. 2001. Qualitative and quantitative liquid chromatographic determination of natural retinoids in biological samples. J Chromatogr A, Gas and Liquid Chromatography of Non-Saponifiable Lipids. Part I 935:13–43.
- Guy R. 2001. Extrusion Cooking: Technologies and Applications. Elsevier.
- Guzmán-Uriarte M.L., L.M. Sánchez-Magaña, G.Y. Angulo-Meza, E.O. Cuevas-Rodríguez, R. Gutiérrez-Dorado, S. Mora-Rochín, J. Milán-Carrillo, *et al.* 2013. Solid State Bioconversion for Producing Common Bean (*Phaseolus vulgaris*L.) Functional Flour with High Antioxidant Activity and Antihypertensive Potential. Food Nutr Sci 04:480–490.
- Hague A., A.J. Butt, and C. Paraskeva. 1996. The role of butyrate in human colonic epithelial cells: an energy source or inducer of differentiation and apoptosis? Proc Nutr Soc 55:937–943.
- Heaney R.P., M.S. Dowell, K. Rafferty, and J. Bierman. 2000. Bioavailability of the calcium in fortified soy imitation milk, with some observations on method. Am J Clin Nutr 71:1166–1169.
- Heckman M. a., K. Sherry, and E.G. De Mejia. 2010. Energy Drinks: An Assessment of Their Market Size, Consumer Demographics, Ingredient Profile, Functionality, and Regulations in the United States. Compr Rev Food Sci Food Saf 9:303–317.
- Hellendoorn E.W. 1976. Beneficial physiologic action of beans. J Am Diet Assoc 69:248–253.
- Hinds M.J., L.R. Beuchat, and M.S. Chinnan. 1997. Effects of homogenization pressure and stabilizers on some physical characteristics of a beverage prepared from partially defatted, roasted peanuts. Plant Foods Hum Nutr Dordr Neth 50:269–277.
- Hutchins A.M., D.M. Winham, and S.V. Thompson. 2012. Phaseolus beans: impact on glycaemic response and chronic disease risk in human subjects. Br J Nutr 108 Suppl 1:S52–65.
- I A.I., S.U. Okorie, and B. Barizaa. 2014. Evaluation of Proximate, Fibre Qualities and Consumer Acceptability of Bambaranut – Tigernut – Coconut Milk Beverage Blends. Int J Nutr Food Sci 3:430.

hInforme SAGARPA.

[tps://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwiw8eSLy7fJAhWGWz4KHUGvAA8QFggcMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.sagarpa.gob.mx%2Fagronegocios%2FDocuments%2FEstudios_promercado%2FGRANOS.pdf&usg=AFQjCNFviD-nPvIWR8VJcFjbX9RQKLigUA&cad=rja](https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwiw8eSLy7fJAhWGWz4KHUGvAA8QFggcMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.sagarpa.gob.mx%2Fagronegocios%2FDocuments%2FEstudios_promercado%2FGRANOS.pdf&usg=AFQjCNFviD-nPvIWR8VJcFjbX9RQKLigUA&cad=rja) Fecha de consulta: 29 de noviembre de 2015..

- Jiménez-Martínez C., H. Hernández-Sánchez, and G. Dávila-Ortiz. 2003. Production of a yogurt-like product from *Lupinus campestris* seeds. *J Sci Food Agric* 83:515–522.
- Jorge Milán-Carrillo, Alvaro Montoya-Rodríguez, and Cuauhtémoc Reyes-Moreno. 2012. High-Antioxidant Capacity Beverages Based on Extruded and Roasted Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Flour. Pp. 199–216 in *Hisp Foods Chem Bioact Compd*, ACS Symposium Series. American Chemical Society.
- Kaneko S., K. Kumazawa, and O. Nishimura. 2011. Studies on the key aroma compounds in soy milk made from three different soybean cultivars. *J Agric Food Chem* 59:12204–12209.
- Kansal R., M. Kumar, K. Kuhar, R.N. Gupta, B. Subrahmanyam, K.R. Koundal, and V.K. Gupta. 2008. Purification and characterization of trypsin inhibitor from *Cicer arietinum* L. and its efficacy against *Helicoverpa armigera*. *Braz J Plant Physiol* 20:313–322.
- Kohnhorst A.L., D.M. Smith, M.A. Uebersax, and M.R. Bennink. 1990. Compositional, nutritional and functional properties of meals, flours and concentrates from navy and kidney beans (*Phaseolus vulgaris*)1. *J Food Qual* 13:435–446.
- Korhonen H. 2002. Technology options for new nutritional concepts. *Int J Dairy Technol* 55:79–88.
- Koyama M. and Y. Kitamura. 2014a. Development of a new rice beverage by improving the physical stability of rice slurry. *J Food Eng* 131:89–95.
- Kwok K.-C. and K. Niranjana. 1995. Review: Effect of thermal processing on soymilk. *Int J Food Sci Technol* 30:263–295.
- Lajolo F.M. and M.I. Genovese. 2002. Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. *J Agric Food Chem* 50:6592–6598.

- Lee S.-W. and C. Rhee. 2003. Processing suitability of a rice and pine nut (*Pinus koraiensis*) beverage. *Food Hydrocoll* 17:379–385.
- Le Louer B., J. Lemale, K. Garcette, C. Orzechowski, A. Chalvon, J.-P. Girardet, and P. Tounian. 2014. [Severe nutritional deficiencies in young infants with inappropriate plant milk consumption]. *Arch Pédiatrie Organe Off Société Fr Pédiatrie* 21:483–488.
- Li-Chan E.C. 2015. Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Curr Opin Food Sci, Food Chemistry and Biochemistry • Food Bioprocessing* 1:28–37.
- Liu Z.-S., S.K.C. Chang, L.-T. Li, and E. Tatsumi. 2004. Effect of selective thermal denaturation of soybean proteins on soymilk viscosity and tofu's physical properties. *Food Res Int* 37:815–822.
- Luna-Vital D.A., L. Mojica, E. González de Mejía, S. Mendoza, and G. Loarca-Piña. 2015. Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. *Food Res Int, Grain legumes - Science, Technology and Impacts on Human Health* 76, Part 1:39–50.
- Mäkinen M.O.E., M.V. Wanhalinna, D.E. Zannini, and E.K. Arendt. 2015. Foods for Special Dietary Needs: Non-Dairy Plant Based Milk Substitutes and Fermented Dairy Type Products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 0:00–00.
- Makkar H.P.S., P. Siddhuraju, and K. Becker. 2007. Phytic Acid. Pp. 23–27 in *Plant Second Metab.* Humana Press, Totowa, NJ.
- Makri E.A. and G.I. Doxastakis. 2006. Study of emulsions stabilized with *Phaseolus vulgaris* or *Phaseolus coccineus* with the addition of Arabic gum, locust bean gum and xanthan gum. *Food Hydrocoll* 20:1141–1152.
- McSweeney S.L., D.M. Mulvihill, and D.M. O'Callaghan. 2004. The influence of pH on the heat-induced aggregation of model milk protein ingredient systems and model infant formula emulsions stabilized by milk protein ingredients. *Food Hydrocoll* 18:109–125.
- Megías C., M. del Mar Yust, J. Pedroche, H. Lquari, J. Girón-Calle, M. Alaiz, F. Millán, et al. 2004. Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. *J Agric Food Chem* 52:1928–1932.

- Melnik B.C., S.M. John, P. Carrera-Bastos, and L. Cordain. 2012. The impact of cow's milk-mediated mTORC1-signaling in the initiation and progression of prostate cancer. *Nutr Metab* 9:74.
- Mojica L., K. Chen, and E.G. de Mejía. 2015. Impact of commercial precooking of common bean (*Phaseolus vulgaris*) on the generation of peptides, after pepsin-pancreatin hydrolysis, capable to inhibit dipeptidyl peptidase-IV. *J Food Sci* 80:H188–198.
- Noah L., F. Guillon, B. Bouchet, A. Buléon, C. Molis, M. Gratas, and M. Champ. 1998. Digestion of carbohydrate from white beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in healthy humans. *J Nutr* 128:977–985.
- NOM-218-SSA1-2011. dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5233379&fecha=10/02/2012. Fecha de consulta: 29 de noviembre de 2015.
- Ogawa H. and K. Date. 2014. The “white kidney bean incident” in Japan. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1200:39–45.
- O’Leary M., B. Hanson, and C. Smith. 2010. Viscosity and non-Newtonian features of thickened fluids used for dysphagia therapy. *J Food Sci* 75:E330–338.
- Omuetti O. and K. Ajomale. 2005. Chemical and sensory attributes of soy-corn milk types. *Afr J Biotechnol* 4:847–851.
- Oomah B.D., A. Cardador-Martínez, and G. Loarca-Piña. 2005. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Sci Food Agric* 85:935–942.
- Oomah B.D., L. Kotzeva, M. Allen, and P.Z. Bassinello. 2014. Microwave and micronization treatments affect dehulling characteristics and bioactive contents of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Sci Food Agric* 94:1349–1358.
- Osorio-Díaz P., L.A. Bello-Pérez, S.G. Sáyago-Ayerdi, M. del P. Benítez-Reyes, J. Tovar, and O. Paredes-López. 2003. Effect of processing and storage time on in vitro digestibility and resistant starch content of two bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *J Sci Food Agric* 83:1283–1288.
- Paredes-Lopez O., F.G. Lara, and L.A.B. Pérez. 2006. Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas. Secretaría de Educación Pública.

- Pathomrungsyounggul P., M.J. Lewis, and A.S. Grandison. 2010. Effects of calcium-chelating agents and pasteurisation on certain properties of calcium-fortified soy milk. *Food Chem* 118:808–814.
- Patisaul H.B. and W. Jefferson. 2010. The pros and cons of phytoestrogens. *Front Neuroendocrinol* 31:400–419.
- Pineli L. de L. de O., R.B.A. Botelho, R.P. Zandonadi, J.L. Solorzano, G.T. de Oliveira, C.E.G. Reis, and D. da S. Teixeira. 2015. Low glycemic index and increased protein content in a novel quinoa milk. *LWT - Food Sci Technol* 63:1261–1267.
- Plahar W.A., B.O. Okezie, and C.K. Gyato. 2003. Development of a high protein weaning food by extrusion cooking using peanuts, maize and soybeans. *Plant Foods Hum Nutr* 58:1–12.
- Rackis J.J., W.J. Wolf, and E.C. Baker. 1986. Protease inhibitors in plant foods: content and inactivation. *Adv Exp Med Biol* 199:299–347.
- Renken S.A. and J.J. Warthesen. 1993. Vitamin D Stability in Milk. *J Food Sci* 58:552–555.
- Reyes-Moreno C., O.D. Argüelles-López, J.J. Rochín-Medina, J. Milán-Carrillo, J. Rivera-López, A. Valdez-Ortiz, J.A. López-Valenzuela, *et al.* 2012. High antioxidant activity mixture of extruded whole quality protein maize and common bean flours for production of a nutraceutical beverage elaborated with a traditional Mexican formulation. *Plant Foods Hum Nutr Dordr Neth* 67:450–456.
- Reyes-Moreno C. and O. Paredes-López. 1993. Hard-to-cook phenomenon in common beans--a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 33:227–286.
- Reynoso-Camacho R., E. González de Mejía, and G. Loarca-Piña. 2003. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* 41:21–27.
- Reynoso Camacho R., R. Ugalde, M. del Carmen, I. Torres Pacheco, A. Gallegos, J. Alberto, P. Salinas, *et al.* 2007. El consumo de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su efecto sobre el cáncer de colon en ratas Sprague-Dawley. *Agric Téc En México* 33:43–52.

- Riaz M.N. 2001. 3 - Selecting the right extruder*. Pp. 29–50 in R. Guy ed. Extrus Cook, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing.
- Roberfroid M.B. 2001. Prebiotics: preferential substrates for specific germs? *Am J Clin Nutr* 73:406S–409S.
- Roy F., J.I. Boye, and B.K. Simpson. 2010. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Res Int, Molecular, Functional and Processing Characteristics of Whole Pulses and Pulse Fractions and their Emerging Food and Nutraceutical Applications* 43:432–442.
- Rui X., J.I. Boye, S. Ribereau, B.K. Simpson, and S.O. Prasher. 2011. Comparative study of the composition and thermal properties of protein isolates prepared from nine *Phaseolus vulgaris* legume varieties. *Food Res Int, Improving the Nutrition and Safety of Manufactured Foods: The Quest for Better Health? Selected papers from the CIFST-AAFC 2010 Meeting held in Winnipeg, MB, Canada, May 30 to June 1, 2010* 44:2497–2504.
- Rustom I.Y. s., M. h. López-Leiva, and B.M. Nair. 1995. UHT-Sterilized Peanut Beverages: Changes in Physicochemical Properties during Storage. *J Food Sci* 60:378–383.
- Ryan L. and S. Sutherland. 2011. Comparison of the effects of different types of soya milk on the total antioxidant capacity of black tea infusions. *Food Res Int* 44:3115–3117.
- Santos C.C.A. do A., B. da S. Libeck, and R.F. Schwan. 2014. Co-culture fermentation of peanut-soy milk for the development of a novel functional beverage. *Int J Food Microbiol* 186:32–41.
- Sathe S.K. 2002. Dry Bean Protein Functionality. *Crit Rev Biotechnol* 22:175–223.
- Segura-Campos M.R., K. García-Rodríguez, J.C. Ruiz-Ruiz, L. Chel-Guerrero, and D. Betancur-Ancona. 2014. In vitro bioactivity, nutritional and sensory properties of semolina pasta added with hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysate. *J Funct Foods* 8:1–8.
- Servili M., C.G. Rizzello, A. Taticchi, S. Esposto, S. Urbani, F. Mazzacane, I. Di Maio, *et al.* 2011. Functional milk beverage fortified with phenolic compounds extracted from olive vegetation water, and fermented with functional lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 147:45–52.

- Shahidi F. and Y. Zhong. 2008. Bioactive peptides. J AOAC Int 91:914–931.
- Shamsuddin A.M., G.Y. Yang, and I. Vucenik. 1996. Novel anti-cancer functions of IP6: growth inhibition and differentiation of human mammary cancer cell lines in vitro. Anticancer Res 16:3287–3292.
- Shi X., J. Li, S. Wang, L. Zhang, L. Qiu, T. Han, Q. Wang, *et al.* 2015. Flavor characteristic analysis of soymilk prepared by different soybean cultivars and establishment of evaluation method of soybean cultivars suitable for soymilk processing. Food Chem 185:422–429.
- Siddiq M., S. Kelkar, J.B. Harte, K.D. Dolan, and G. Nyomba. 2013. Functional properties of flour from low-temperature extruded navy and pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L.). LWT - Food Sci Technol 50:215–219.
- Tangpricha V., P. Koutkia, S.M. Rieke, T.C. Chen, A.A. Perez, and M.F. Holick. 2003. Fortification of orange juice with vitamin D: a novel approach for enhancing vitamin D nutritional health. Am J Clin Nutr 77:1478–1483.
- Toda K., K. Chiba, and T. Ono. 2007. Effect of components extracted from okara on the physicochemical properties of soymilk and tofu texture. J Food Sci 72:C108–113.
- Torruco-Uco J., L. Chel-Guerrero, A. Martínez-Ayala, G. Dávila-Ortíz, and D. Betancur-Ancona. 2009. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. LWT - Food Sci Technol 42:1597–1604.
- Traynor M., R. Burke, J.M. Frias, E. Gaston, and C. Barry-Ryan. 2013. Formation and Stability of an Oil in Water Emulsion Containing Lecithin, Xanthan Gum and Sunflower Oil. Articles.
- Tuorila H., H.L. Meiselman, R. Bell, A.V. Cardello, and W. Johnson. 1994. Role of sensory and cognitive information in the enhancement of certainty and liking for novel and familiar foods. Appetite 23:231–246.
- Ukwuru M.U. and A.C. Ogbodo. 2011. Effect of Processing Treatment on the Quality of Tigernut Milk. Pak J Nutr 10:95–100.

- Valdez-Ortiz A., C.I. Fuentes-Gutiérrez, L.J. Germán-Báez, R. Gutiérrez-Dorado, and S. Medina-Godoy. 2012. Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. *LWT - Food Sci Technol* 46:91–96.
- Vasanthan T., J. Yeung, and R. Hoover. 2001. Dextrinization of Starch in Barley Flours with Thermostable alpha-Amylase by Extrusion Cooking. *Starch - Stärke* 53:616–622.
- Vergara-Castañeda H.A., R.G. Guevara-González, M. Ramos-Gómez, R. Reynoso-Camacho, H. Guzmán-Maldonado, A.A. Feregrino-Pérez, B.D. Oomah, *et al.* 2010. Non-digestible fraction of cooked bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Bayo Madero suppresses colonic aberrant crypt foci in azoxymethane-induced rats. *Food Funct* 1:294–300.
- Viladomiu M., R. Hontecillas, and J. Bassaganya-Riera. 2015. Modulation of inflammation and immunity by dietary conjugated linoleic acid. *Eur J Pharmacol*.
- Wang L.-J., J. Wang, N. Li, L. Ge, B.-L. Li, and B.-L. Song. 2011. Molecular characterization of the NPC1L1 variants identified from cholesterol low absorbers. *J Biol Chem* 286:7397–7408.
- WhiteWave Foods: “For the first time our almond milk sales exceeded our soy milk sales in the quarter.” n.d.BeverageDaily.com.
- Wu J. and X. Ding. 2001. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* 49:501–506.
- Yang B., H. Chen, C. Stanton, R.P. Ross, H. Zhang, Y.Q. Chen, and W. Chen. 2015. Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. *J Funct Foods* 15:314–325.
- Yin S.-W., C.-H. Tang, Q.-B. Wen, and X.-Q. Yang. 2010. Functional and conformational properties of phaseolin (*Phaseolus vulgaris* L.) and kidney bean protein isolate: A comparative study. *J Sci Food Agric* 90:599–607.
- Yoshiki Y., S. Kudou, and K. Okubo. 1998. Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean. *Biosci Biotechnol Biochem* 62:2291–2299.

- Zhang H., G. Önning, A.Ö. Triantafyllou, and R. Öste. 2007. Nutritional properties of oat-based beverages as affected by processing and storage. *J Sci Food Agric* 87:2294–2301.
- Zhao D. and N.P. Shah. 2014. Changes in antioxidant capacity, isoflavone profile, phenolic and vitamin contents in soymilk during extended fermentation. *LWT - Food Sci Technol* 58:454–462.
- Zhao Y., B.R. Martin, and C.M. Weaver. 2005. Calcium bioavailability of calcium carbonate fortified soymilk is equivalent to cow's milk in young women. *J Nutr* 135:2379–2382.
- Zhu Z., W. Jiang, and H.J. Thompson. 2012. Edible dry bean consumption (*Phaseolus vulgaris* L.) modulates cardiovascular risk factors and diet-induced obesity in rats and mice. *Br J Nutr* 108 Suppl 1:S66–73.