

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA



“Fermentación en medio sólido y su efecto sobre la calidad nutrimental y funcional de frijol
Ayocote (*Phaseolus coccineus* L)”

Por:

CARLOS ALONSO GRIMALDO SÁNCHEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México.

Mayo de 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA



“Fermentación en medio sólido y su efecto sobre la calidad nutrimental y funcional del frijol Ayocote (*Phaseolus coccineus* L.)”

Por:

CARLOS ALONSO GRIMALDO SÁNCHEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

**DR. JULIO CÉSAR TAFOLLA
ARELLANO**

Asesor Principal Interno

**DR. JOSÉ JUAN BUENROSTRO
FIGUEROA**

Asesor Principal Externo

Saltillo, Coahuila, México.

Mayo de 2022.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

“Fermentación en medio sólido y su efecto sobre la calidad nutrimental y funcional de frijol Ayocote (*Phaseolus coccineus L*)”

Por:

CARLOS ALONSO GRIMALDO SÁNCHEZ

TESIS

Que somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

La cual fue revisada y aprobada por:

EI JURADO EXAMINADOR



**DR. JULIO CÉSAR
TAFOLLA ARELLANO**
Asesor Principal Interno



**DR. JOSÉ JUAN
BUENROSTRO FIGUEROA**
Asesor Principal Externo



**QFB. MARÍA DEL CARMEN
JULIA GARCÍA**
Coasesor



**M.C. EMILIO OCHOA
REYES**
Coasesor



MC. SERGIO SÁNCHEZ MARTINEZ
Coordinador de la División de Ingeniería

Saltillo, Coahuila, México.

Mayo de 2022.

Derechos de Autor y Declaración de no plagio

Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado. Adjuntamos reporte del análisis de plagio mediante Ithenticate.

A t e n t a m e n t e.

Alma Terra Mater



Carlos Alonso Grimaldo Sánchez
Autor principal



Dr. Julio César Tafolla Arellano
Asesor Principal

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, doy gracias a **Dios** por haberme regalado la dicha de existir, por la familia que me asignaste y por proporcionarme las armas suficientes para llegar hasta este momento, porque gracias a ti hoy logre satisfactoriamente una meta más en mi vida, gracias porque en los momentos de mi vida que me sentí débil y sin ganas de seguir, tu iluminas mi camino y me empujabas a seguir tú iluminabas mi camino y me empujabas a seguir con fe y esperanza, pero sobre todo porque en cada paso que doy tu estas presente guiándome con tu luz.

A mi **ALMA MATER**, por abrirme las puertas y marcar mi vida llenando de experiencias, oportunidades, pero sobre todo el aprendizaje que me ha dejado claro que por los sueños se lucha y se persevera.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD)**, por abrirme las puertas para poder llevar a cabo este proyecto, por la beca tesis asigna del proyecto.

A mis padres, **Wenceslado Grimaldo Bertadillo** y **Patricia Sánchez Dávila** que son los principales pilares que sostienen mi vida y fuertes motores que hacen andar mis sueños, porque siempre son quienes han estado dispuestos a levantarme, sostenerme y no soltarme, inmensamente gracias.

A mi hermana **Sandra Grimaldo** y sobrina **Anisahi** por hacerme sonreír en momentos complicados y saber que siempre cuento con ustedes.

A mis tíos (as) por sus buenos consejos que me dieron cada uno de ellos para poder llevar acabo mis sueños, pero especialmente a mis tías **Yolanda, Flora, Rosa María** y **María Guadalupe Grimaldo** por estar siempre conmigo, sin importar la hora ni el día, siempre han estado pendiente de mí motivando para seguir adelante con mis sueños, también quiero agradecer inmensamente a mi tío **Héctor Grimaldo** por su apoyo incondicional porque además de ser mi tío es un excelente amigo por brindarme esa confianza de poder contar con él tanto emocional como económicamente, a **Iliana Márquez**, que siempre estuvo dándome los mejores consejos, también a mi tío **Francisco Grimaldo** por su gran apoyo que me brindo para llevar acabo mis estudios. Inmensamente gracias.

A mis abuelos paternos † **Pedro Grimaldo Chávez** y † **Ma. Transito Bertadillo Torres**, agradezco a ellos porque ellos me enseñaron el buen camino, mi abuelo quien me enseñó las bases del trabajo en el campo para que yo pudiera defenderme trabajando en la vida y por todos esos consejos y momentos que compartimos juntos, inmensamente gracias.

Mis abuelos maternos **Salomón Sanchez** y **Ma. Luisa Dávila** quienes de una u otra manera me motivaron a seguir con mis estudios para lograr mis sueños dándome ánimos y su apoyo.

A el **Dr. Julio César Tafolla Arellano** por su apoyo incondicional que me ha brindado para llevar a cabo este proyecto, por la confianza, por el tiempo y la dedicación de asesorar las dudas.

Al **Dr. José Juan Buenrostro Figueroa** por el tiempo dedicado a la investigación por brindarme la asesoría y todo el apoyo, por su gran paciencia, que en cada momento estuvo ahí para apoyarme especialmente por abrirme las puertas de su laboratorio para que este proyecto se llevara a cabo, pero sobre todo gracias por tu amistad y consejos.

Al **M.C Emilio Ochoa Reyes** por tu gran paciencia y tolerancia, porque no fue nada fácil, gracias por tu valioso apoyo técnico y por brindarme un poco de tus infinitos conocimientos y aportaciones a la realización del presente trabajo, pero sobre todo gracias por tu amistad y consejos.

A la maestra **María del Carmen Julia** por su gran apoyo y las facilidades brindados dentro del laboratorio, sus buenos consejos y motivación en la elaboración de este proyecto.

A mis compañeros del LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, por el apoyo brindado.

DEDICATORIA

A mis padres Wenceslado Grimaldo Bertadillo y Patricia Sánchez Dávila les dedico este trabajo con todo mi cariño a quienes debo todo lo que soy, primero por darme la vida y después por formarme como una persona de bien, como una forma de recordarles cuanto los amo y respeto. Realmente no hay palabras para agradecer todo lo que me han dado, por su lucha incansable, por su guía y ejemplo, por su cariño, lealtad y confianza y por todo lo que han hecho por mí. A mi padre por siempre buscar la manera de que yo estuviera bien tanto emocional como económicamente. A mi madre gracias por tu amor y comprensión que sin ellos yo no hubiera salido adelante, porque tú haces que la vida no sea difícil. Inmensamente gracias.

A mi hermana Sandra Grimaldo y a mi sobrina Anisahi porque ustedes siempre están conmigo escuchándome y ayudándome, gracias por los momentos que hacen que mi vida sea feliz, por eso y más les dedico este triunfo con todo mi corazón.

A mis abuelos † Pedro Grimaldo Chávez y † Ma. Transito Bertadillo Torres que Dios los tenga en su santa gloria y ahora son unos ángeles en mi vida y sé que se encuentran muy orgullosos de mí y desde donde están me bendicen, por eso quiero dedicar este trabajo con todo mi cariño hasta el cielo. A mis abuelos Salomón Sánchez y Ma. Luisa Dávila quienes de una u otra manera me motivaron a seguir con mis estudios para lograr mis sueños dándome ánimos y su apoyo por eso y más les dedico este triunfo con mucho cariño.

A cada uno de mis tíos(as) pero especialmente Yolanda, Flora, Rosa María, María Guadalupe a mis tíos Héctor y Francisco Grimaldo a todos por su apoyo, consejos y motivaciones a seguir adelante, gracias por el cariño demostrado y aunque al principio pocos creían en mí, sé que en estos momentos tengo su confianza y sincero cariño.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Pág.
DERECHOS DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
DEDICATORIA.....	VII
ÍNDICE GENERAL.....	VIII
ÍNDICE DE CUADROS.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
RESUMEN.....	XIII
I. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1. Justificación.....	14
1.2.Hipótesis.....	15
1.3.Objetivos.....	16
1.3.1. General.....	16
1.3.2. Específicos.....	16
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	17
2.1. Generalidades del Ayocote.....	17
2.1.1. Producción.....	18
2.1.2. Importancia económica.....	19
2.1.3. Composición química	19
2.1.4. Compuestos con actividad biológica	19
2.1.5. Propiedades no nutricionales.....	20
2.2. Fermentación en medio solido (FMS)	20
2.2.1. Factores que influyen en el proceso de la FMS.....	21
2.2.2. Ventajas y desventajas de la FMS.....	21
2.2.3. Hongos filamentosos	21
2.2.4. Sustratos.....	21
2.2.5. Aplicaciones de la FMS.....	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1. ETAPA 1. Obtención y caracterización fisicoquímica del frijol ayocote para ser	

utilizado como soporte en la FMS.....	23
3.1.1. Caracterización fisicoquímica del material vegetal.....	23
3.1.1.1. Índice de absorción de agua.....	23
3.1.1.2. Punto crítico de humedad.....	23
3.1.1.3. Análisis químico proximal.....	24
3.1.1.3.1. Humedad.....	24
3.1.1.3.2. Proteína.....	24
3.1.1.3.3. Extracto etéreo (Grasa).....	24
3.1.1.3.4. Cenizas.....	25
3.1.1.3.5. Fibra cruda.....	25
3.1.1.3.6. Carbohidratos.....	26
3.2. ETAPA 2. Efecto de la cepa y tiempo de fermentación sobre la extracción y recuperación de compuestos fenólicos a partir de ayocote y su capacidad antioxidante.....	26
3.2.1. Microorganismos.....	26
3.2.2. Fermentación en medio sólido (FMS).....	26
3.2.3. Análisis químico.....	27
3.2.3.1. Fenoles Hidrolizables.....	27
3.2.3.2. Fenoles Condensados.....	27
3.2.3.3. Fenoles totales (FT).....	27
3.2.3.4. Capacidad antioxidante.....	27
<i>DPPH</i>	27
<i>ABTS</i>	28
<i>FRAP</i>	28
3.2.3.5. Análisis de resultados.....	29
3.3. ETAPA 3. Efecto de las condiciones de fermentación sobre el contenido nutrimental, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de extractos de frijol Ayocote.....	29
3.3.1. Fermentación en medio solido (FMS).....	29
3.3.2. Análisis de resultados.....	30
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1. ETAPA 1. Obtención y caracterización fisicoquímica del frijol ayocote para ser	

utilizado como soporte en la fermentación en medio sólido.....	32
4.2. ETAPA 2. Evaluación del efecto de la cepa y tiempo de fermentación sobre la extracción y recuperación de compuestos fenólicos a partir de ayocote y su capacidad antioxidante.	34
4.3. ETAPA 3. Efecto de las condiciones de fermentación de frijol Ayocote y su efecto sobre el contenido nutrimental, compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante.....	40
V. CONCLUSIONES	48
Perspectivas	49
VI. BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXOS	55

ÍNDICE DE CUADROS

Contenido	Pág.
Cuadro 1. Matriz experimental Box-Hunter & Hunter (BHH) 2^k con tres puntos centrales para determinar el efecto de la concentración de inóculo, temperatura, humedad y concentración de sales (KH_2PO_4 , NaNO_3 , MgSO_4 y KCl) sobre el contenido de FT y la capacidad antioxidante de ayocote fermentado por <i>A. niger</i> HT4.....	30
Cuadro 2. Efecto del tiempo de cultivo sobre el contenido de fenoles hidrolizables (FH), condensados (FC) y totales (FT) y la capacidad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP) de extractos obtenidos de la FMS de ayocote con <i>A. niger</i> HT4 y <i>A. awamori</i>).....	37
Cuadro 3. Efecto de la cepa (<i>A. niger</i> GH1 y <i>A. awamori</i>) sobre el contenido de FH, así como la capacidad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP) de extractos obtenidos de la FMS de ayocote.....	39
Cuadro 4. Matriz experimental Box-Hunter & Hunter (BHH) 2^k con tres puntos centrales para determinar de las condiciones de FMS sobre el contenido de FT y la capacidad antioxidante de ayocote fermentado por <i>A. niger</i> HT4.....	44
Cuadro 5. Coeficiente de correlación por Pearson entre las variables en estudio.....	45
Cuadro 6. Efecto de los parámetros de FMS de ayocote con el hongo <i>A. niger</i> HT4 sobre el contenido de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante.....	45
Cuadro 7. Análisis proximal de frijol ayocote fermentado por <i>A. niger</i> HT4 (AF) y sin fermentar (ASF).....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Pág.
Figura 1. Componentes del frijol ayocote (<i>Phaseolus coccineus</i> L.)	18
Figura 2. Determinación de cenizas en el ayocote	32
Figura 3. Determinación de grasa en el ayocote.....	33
Figura 4. Determinación de fibra en el ayocote.....	33
Figura 5. Efecto del tiempo de cultivo sobre el contenido de a) FH y b) FC en frijol ayocote fermentado por <i>A. awamori</i> (●) y <i>A. niger</i> HT4 (●).....	35
Figura 6. Efecto del tiempo de cultivo sobre el contenido de FT en frijol ayocote fermentado por <i>A. awamori</i> (●) y <i>A. niger</i> HT4 (●).....	35
Figura 7. Efecto del tiempo de cultivo sobre la capacidad antioxidante a) DPPH y b) ABTS de extractos de frijol ayocote fermentado por <i>A. awamori</i> (●) y <i>A. niger</i> HT4 (●)....	36
Figura 8. Efecto del tiempo de cultivo sobre la capacidad antioxidante (FRAP) de extractos de frijol ayocote fermentado por <i>A. awamori</i> (●) y <i>A. niger</i> HT4 (●).....	36
Figura 9. Material fermentado (ayocote) con <i>A. niger awamori</i> a las 60 h.....	38
Figura 10. Reactores en columna empacados con el frijol ayocote al tiempo inicial (a) y a 60 h (b) de FMS con <i>A. niger</i> HT4	38
Figura 11. Diagrama de Pareto que muestra los efectos estimados a partir del diseño BHH (a) y el efecto de la temperatura sobre el contenido de fenoles hidrolizables (b).....	40
Figura 12. Diagrama de Pareto que muestra los efectos estimados a partir del diseño BHH para fenoles condensados (a) y totales (b).....	41
Figura 13. Diagrama de Pareto que muestra los efectos estimados a partir del diseño BHH para la actividad antioxidante frente al radical a) ABTS y b) DPPH.....	41
Figura 14. Diagrama de Pareto que muestra los efectos estimados a partir del diseño BHH (a) y el efecto de la concentración de inóculo sobre la actividad antioxidante en el método FRAP (b).....	42

RESUMEN

El frijol ayocote es una leguminosa con excelente valor nutricional, al otorgar beneficios a la salud del consumidor, atribuidos a la presencia de compuestos bioactivos como los compuestos fenólicos. Sin embargo, estos compuestos se encuentran presentes en forma libre o ligada a otros componentes de pared celular, lo cual dificulta su biodisponibilidad. En el presente estudio se desarrolló un proceso de fermentación en medio sólido para evaluar su efecto sobre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L). Para ello, se evaluaron dos cepas fúngicas (*Aspergillus awamori* y *A. niger* HT4) y se determinó el tiempo de máxima liberación de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante. Una vez seleccionada la mejor cepa y tiempo de cultivo, se realizó una segunda fermentación empleando un diseño Box-Hunter & Hunter 2^k para evaluar el efecto de la humedad, temperatura, [inóculo], así como la concentración de sales en el medio (KH₂PO₄, NaNO₃, MgSO₄, KCl) sobre el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de los extractos fermentados de ayocote. Las condiciones que favorecen una mayor liberación de compuestos fenólicos con actividad antioxidante fueron: *A. niger* HT4 (1x10⁷ esp/gms), 30°C, 60 h, humedad del 35% y una concentración de sales en el medio de (g/L): KH₂PO₄ (1.52), NaNO₃ (3.04), MgSO₄ (3.04) y KCl (3.04). Bajo estas condiciones, es posible obtener hasta 8.91 mgEC/gms y una actividad antioxidante de 1.93 mgET/gms y 6.76 mgFe⁺², lo cual significa un incremento de 7.6 veces el contenido de fenoles condensados, principales compuestos presentes en el ayocote, y hasta 2.85 veces la capacidad antioxidante. La estrategia biotecnológica desarrollada permite incrementar el contenido de compuestos fenólicos presentes en frijol ayocote, potenciando las propiedades funcionales y los beneficios a la salud que se atribuyen a dichos compuestos.

INTRODUCCIÓN

El frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*) es una leguminosa nativa de México con un gran potencial como alimento para la población, debido a los beneficios que otorga a la salud de quien lo consume, derivado del contenido de compuestos bioactivos, los cuales son utilizados para el control de enfermedades crónicas degenerativas (Rojas-Victoria *et al.* 2017). Dentro de los compuestos bioactivos presentes en el ayocote se encuentran ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas, compuestos a los que se les atribuyen propiedades antioxidantes y antimutagénicas. El mayor contenido de compuestos bioactivos en ayocote se reporta en la cubierta de la semilla y sus cotiledones, siendo mayor en la semilla, con valores de hasta 1123-1940 mg de GAE/kg (Alvarado-López *et al.* 2019).

La fermentación en medio sólido (FMS) implica la biotransformación de un sustrato, el cual, mediante acción microbiana, da origen a cambios en la apariencia, olor, color, sabor, composición nutrimental y características funcionales (Adebo-Ayodeji *et al.* 2020). Se ha demostrado que la FMS incrementa el contenido de compuestos fenólicos con carácter funcional (Chen *et al.* 2021; Leite *et al.* 2019). (Guzmán-Uriarte *et al.* 2019) reportaron la bioconversión en estado sólido como una estrategia efectiva para mejorar el contenido de fenoles totales de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) e incrementar la funcionalidad al mejorar la actividad antioxidante y el potencial antihipertensivo. En el caso del frijol ayocote, no se ha reportado su uso como sustrato en procesos de fermentación para incrementar su potencial funcional al mejorar su contenido de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante. Por ello, en el presente proyecto se propone una alternativa biotecnológica para potenciar las propiedades funcionales del frijol ayocote.

1.1.Justificación

El frijol ayocote es una fuente importante de compuestos fenólicos. Sin embargo, muchos de ellos se encuentran ligados mediante enlaces covalentes a componentes de pared celular (celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina y proteínas) lo cual dificulta su biodisponibilidad. Para mejorar la biodisponibilidad, se requiere una hidrólisis química o enzimática que permita liberar estos compuestos. En este sentido, la fermentación en medio sólido (FMS) representa una alternativa biotecnológica, en la cual se involucra el uso de microorganismos o enzimas producidas por los microorganismos, para favorecer la liberación de estos compuestos y a la vez mejorar el contenido nutrimental y funcional. Durante la FMS ocurren una serie de biotransformaciones que provocan la degradación del material vegetal, la liberación de los compuestos fenólicos y, en consecuencia, una mejora en la capacidad antioxidante. Aunado a ello, el método propuesto es económico y amigable con el medio ambiente.

1.2. Hipótesis

El desarrollo de un proceso de FMS mejorará el potencial funcional al incrementar el contenido de compuestos antioxidantes en frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.).

1.3. Objetivos

1.3.1. General

Evaluar el efecto de la fermentación en medio sólido sobre el potencial funcional de frijol Ayocote (*Phaseolus coccineus* L.).

1.3.2. Objetivos específicos

- Obtener y caracterizar fisicoquímicamente el frijol Ayocote.
- Evaluar el efecto de la cepa fúngica y tiempo de fermentación sobre la extracción y recuperación de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP).
- Explorar las condiciones de fermentación de frijol Ayocote y su efecto sobre el contenido de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante.

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades del Ayocote

El frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.), conocido como patol, frijolon, pak y cimarrón, es una leguminosa nativa de México con gran potencial de uso y aprovechamiento con fines alimenticios para la población humana mediante el uso de su follaje, flores, vainas y semillas (Ayala-Garay *et al.* 2006). El ayocote se cultiva en regiones templadas húmedas o templadas semiáridas entre los 1300 y 2650 metros de altitud, en los estados de Aguascalientes, Chiapas, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala, Veracruz y San Luis Potosí (Lopez-Baez *et al.* 2018). En España, Reino Unido y Holanda, su consumo ha sustituido al frijol común *Phaseolus vulgaris* y es consumido principalmente como grano seco y judías verdes en el sur de Italia.

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Fabales*

Familia: *Fabaceae*

Género: *Phaseolus*

Especie: *Phaseolus coccineus*

La fracción comestible corresponde a la semilla, que de acuerdo a (Rosales-Vicelis *et al.* 2019) es exalbuminosa, por lo tanto, sus reservas nutritivas se encuentran en sus cotiledones, que presentan diferentes formas (cilíndricas, de riñón y esféricas).

Sus principales partes externas son (Fig. 1):

- La testa o cubierta.
- El hilum, el cual conecta la semilla con la placenta.

- El micrópilo que es una abertura en la cubierta de la semilla cerca del hilum. Por la abertura en la cubierta se realiza principalmente la absorción de agua.
- El rafe proveniente de soldadura del funículo con los tegumentos extremos del ovulo campilotropo.

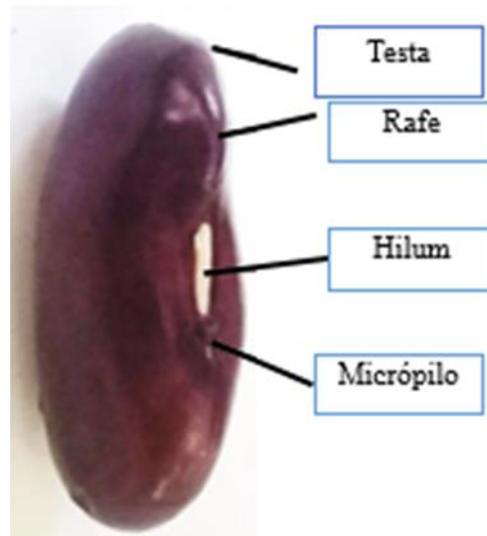


Figura 1. Rosales, E. (2019). Composición externa de la semilla (*Phaseolus coccineus* L). (Figura) Recuperado de <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/9975>.

El interior de la semilla está conformado por un embrión, el cual está formado por la plúmula, dos hojas primarias, el hipocótilo, los dos dicotiledóneas y la radícula. Tiene una gran variación de colores, los más frecuentes son el negro, el crema y blanco (Rosales-Vicelis *et al.* 2019).

2.1.1. Producción

De acuerdo a datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por su sigla en inglés) en 2019, México fue el noveno productor mundial de frijol con un total de 879,404 toneladas. Esto representa alrededor del 3% de la producción mundial. En términos del valor de la producción primaria, y de acuerdo a las cifras de cierre de producción pecuaria de 2019 del SIAP, este grano ocupa la posición número 20, considerando cultivos cíclicos y perennes. En términos de valor de campo, 2019 fue el séptimo año más importante con poco más de 13 mil millones de pesos, lo que equivale al 3.7% del valor total de la producción agrícola de

cultivos anuales y el 81.5% por ciento dentro de las legumbres secas. El 85% se siembra en el ciclo Primavera-verano. Se registra que el 99% de los productores que tienen menos de 20 ha, aportan el 91% de la producción y siembran el 91% de la superficie dedicada a esta semilla. Cabe mencionar que, en México, el frijol representa el 36% de la ingesta diaria de proteínas de la población, con consumo promedio de 7.7 kg (SMATTCOM, 2021).

2.1.2. Importancia económica

Si bien no existe una estadística para el frijol ayocote, durante el 2020 se observó una tendencia volátil respecto a las cotizaciones al mayoreo del frijol en general, debido a una menor producción nacional de la leguminosa. Durante la mitad del año anterior, los precios del frijol aumentaron considerablemente, debido a un incremento en la demanda interna y una significativa depreciación de la moneda nacional en medio de la pandemia del Covid-19. No obstante, para el cierre del 2020, las cotizaciones empezaron a bajar. Se estima que, para este año, los precios presenten una tendencia al alza, debido a que hubo una baja en la producción del ciclo primavera-verano anterior, lo que provocó la disminución en los inventarios (SMATTCOM, 2021).

2.1.3. Composición química

El ayocote se emplea como alimento, no solo por su bajo costo, sino por su aporte a la nutrición humana, así como los beneficios a la salud que brinda debido a la presencia de compuestos nutraceuticos, empleados para el control de enfermedades crónico-degenerativas (Teniente-Martínez *et al.* 2019). El ayocote es una fuente importante de proteínas, carbohidratos, fibra y minerales (Alvarado-López *et al.* 2019). La composición química de *Phaseolus coccineus* depende de la variedad y las condiciones de cultivo. Según (López-Martínez *et al.* 2020), el frijol ayocote está compuesto por 4.11 % Cenizas, 18.9 % proteína, 1.62 % lípidos, 67.7 % carbohidratos y 6.74 % de fibra cruda.

2.1.4. Compuestos con actividad biológica

Además de ser una fuente importante de carbohidratos y proteínas, el ayocote es fuente de compuestos con características nutraceuticas que aportan una serie de beneficios a la salud, como promover la reducción en el contenido de colesterol en sangre, disminución de enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes, enfermedades de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, estrés ansiedad, depresión, enfermedades de tracto digestivo y prevención de cientos tipo de cáncer. (Capistran-Carabarin *et al.* 2019) encontraron diferencias respecto al contenido de polifenoles,

flavonoides y antocianinas, así como la actividad antioxidante de *P. coccineus* y *P. vulgaris*, como también en su actividad antioxidante en la cubierta de la semilla y los cotiledones. Existe un mayor contenido de antocianinas en la cubierta de la semilla y un mayor contenido de flavonoides en los cotiledones de *P. coccineus*. En sus reportes mostró un contenido de fenoles totales de 126.5 mg C3G/gps con una actividad antioxidante de 1261.0 $\mu\text{mol ET/gps}$ y un contenido de flavonoides de 22.7 mgEC/gps en la cubierta de la semilla. Por otro lado, en los cotiledones un contenido de fenoles totales de 2.16 mg C3G/gps con una actividad antioxidante de 9.08 $\mu\text{mol ET/gps}$ y un contenido de flavonoides de 0.32 mgEC/gps. Se ha reportado la presencia de compuestos fenólicos como, cianidin-3-glucosido, delphinidin-3-glucosido, cianidina, metildelphinidina y metilcianidina son más comunes en *P. coccineus* lo cual su presencia es mayor comparado con otras especies de *Phaseolus* como lo es el caso de *Phaseolus vulgaris*. La coloración de la semilla del frijol ayocote se debe a la presencia de flavonoides como glicósidos de flavonol, antocianinas y proantocianidinas (López-Martínez *et al.* 2020).

2.1.5. Propiedades no nutricionales

El frijol es rico en compuestos antinutricionales, como pueden ser inhibidores de proteasas, inhibidores de amilasas, lectinas, anti-vitaminas, saponinas, taninos y ácido fítico (Elizalde *et al.* 2009). Se ha descrito que las lectinas son proteínas que promueven el crecimiento del páncreas en ratas, ocasionando úlceras y necrosis a nivel intestino. Los taninos forman complejos con las proteínas, el almidón y enzimas digestivas, reduciendo el valor nutritivo y la digestibilidad de las proteínas, además de limitar la biodisponibilidad de minerales (Fe y Zn). Por otra parte, el ácido fítico afecta la asimilación de Zn (Luo *et al.* 2012). López-Martínez *et al.* (2020) reportaron la presencia de soyasaponina αg y soyasaponina βg en *Phaseolus coccineus*, inhibidores de tripsina que actúan como un mecanismo de defensa contra algunos microbios e insectos invasores, pero su presencia reduce la digestibilidad de las proteínas de las legumbres.

2.2. Fermentación en Medio Sólido (FMS)

La FMS se define como el crecimiento de microorganismos en una matriz sólida (soporte inerte o soporte/sustrato, en el cual existe la humedad suficiente para mantener el crecimiento y el metabolismo microbiano, sin presencia de agua libre en movimiento (Pandey *et al.* 2003). Durante el proceso de FMS ocurre una serie de biotransformaciones derivadas de la actividad metabólica y síntesis de enzimas, que originan cambios fisicoquímicos en el material fermentado, mejorando la

biodisponibilidad y calidad de los nutrientes presentes en el alimento (Adebo-Ayodeji *et al.* 2020; Torres-León *et al.* 2021).

2.2.1. Factores que influyen en el proceso de FMS

Existen diferentes factores que influyen en el proceso de FMS, y el rendimiento de producto dependerá significativamente de una optimización adecuada, incluyendo la selección adecuada de los microorganismos y el sustrato o composición de la matriz sólida, la correcta selección de humedad, la temperatura, así como la selección eficaz de técnicas de extracción y purificación (Leonard *et al.* 2021; Yepes-Betancur *et al.* 2021).

2.2.2. Ventajas y desventajas de la FMS

Algunas ventajas que nos ofrece FMS, es la mayor productividad de fermentación, mayor concentración de producto final, mayor estabilidad del producto, menos represión catabólica, cultivo de microorganismos especializados para los sustratos insolubles en agua, como también que se lleva en pequeños volúmenes de sustrato (menos costo operativo), medios y sustratos en bajo costo, bajo costo de energía, bajo contenido de humedad del sustrato evitando la contaminación (Cano y Postigo *et al.* 2021). Dentro de las desventajas se encuentra la necesidad de mejorar aspectos relacionados a fenómenos de transferencia de masa, aireación, agitación y máxima conversión de sustrato en producto, de manera que el proceso sea más eficiente (Srivastava *et al.* 2019).

2.2.3. Hongos filamentosos

Los microorganismos más empleados en FMS son hongos, levaduras y bacterias, siendo los hongos el microorganismo ideal debido a su habilidad para desarrollarse rápidamente en sustratos con niveles de humedad bajos, y producir una amplia variedad de enzimas que permiten obtener diversos compuestos de interés. Dentro de los hongos más empleados, destacan los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Rhizopus*, entre otros (Herrera-Beltrán *et al.* 2021).

2.2.4. Sustratos

Los residuos agrícolas y forestales son el sustrato más utilizado para realizar una FMS, debido a su gran abundancia y uso no específico, que representan una alta fuente de contaminación. Algunos ejemplos de residuos agrícolas empleados son el bagazo de la caña de azúcar y la yuca, así como los residuos de algunos cereales, como el trigo, el arroz y la avena. También se ha utilizado la

cáscara de numerosos frutos, pulpa de café y otros residuos de diferentes plantas (Soccol *et al.* 2017). Todos estos sustratos tienen un alto contenido de moléculas como celulosa, hemicelulosa, almidón, lignina, pectinas, entre otras, que son aprovechados por los microorganismos para su crecimiento. Si bien estos materiales contienen las fuentes mínimas necesarias, en algunos casos es necesario adicionar algunos macro y micronutrientes (P, S, Ca, Mg, Fe, Zn, Co, I) para un mejor crecimiento (Soccol *et al.* 2017). La composición de estos materiales permite que sean empleados como fuente de nutrientes para la obtención de una amplia gama de productos de interés como enzimas, células microbianas y otros metabolitos (Garro *et al.* 2021; Moran-Aguilar *et al.* 2021).

2.2.5. Aplicaciones de la FMS

La FMS ha sido objeto de estudio para la producción de diversos metabolitos de interés industrial como azúcares, antibióticos, biocombustibles (bioetanol, biodiesel, biometanol, biobutanol, biohidrógeno), biosurfactantes, enzimas, lípidos, aromas y sabores para la industria alimentaria, así como en la producción/extracción de compuestos bioactivos o para la producción de agentes de control biológico (Lizardi-Jiménez *et al.* 2017; Torres-León *et al.* 2021). En el caso particular del hongo *Aspergillus niger*, se ha reportado que su uso mejora el contenido nutricional de los alimentos, particularmente en cuanto al contenido de proteína (Aguilar-Navarro *et al.* 2014; Herrera-Beltrán *et al.* 2021).

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Etapa 1. Obtención y caracterización fisicoquímica del frijol ayocote para ser utilizado como soporte en la fermentación en medio sólido.

El ayocote (*Phaseolus coccineus* L.) fue adquirido en un mercado local de Zacatlán de las Manzanas, Puebla; y trasladado al laboratorio de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Delicias, Chihuahua. Se sometió a un proceso de molienda y tamizado hasta obtener un tamaño de partícula de 1 mm². Este material fue empleado para determinar el punto crítico de humedad y el índice de absorción de agua. Otra fracción de ayocote de menor tamaño (<1 mm) se utilizó para los análisis fisicoquímicos.

3.1.1. Caracterización fisicoquímica del material vegetal

3.1.1.1. Índice de absorción de agua

Para determinar el índice de absorción de agua (IAA) se pesaron 1.5 g de muestra dentro de un tubo de centrifuga de 50 mL (previamente tarado), y se añadieron 15 mL de agua destilada. Esta mezcla se agitó durante 1 min (vórtex) y posteriormente se centrifugó (3000 rpm; 10 min; 25 °C). Después de ello, se desechó el sobrenadante y se registró el peso del precipitado, calculando el IAA a partir del peso del gel restante, y se expresó como g de gel/g de material (Buenrostro-Figueroa *et al.* 2014).

3.1.1.2. Punto crítico de humedad

El punto crítico de humedad (PCH) se estimó agregando 1 g de muestra en una termobalanza (OHAUS MB120) a 120 °C durante 60 min. El valor de PCH se obtuvo después de estimar la tasa de secado durante la cinética de deshidratación del material. Posteriormente, dichas velocidades se relacionaron con la cantidad de agua eliminada respecto al tiempo (Buenrostro-Figueroa *et al.* 2014).

3.1.1.3. Análisis Proximal

La caracterización del frijol ayocote consistió en determinar el contenido de humedad, cenizas, grasa, fibra cruda, carbohidratos y proteína. Todos los análisis se realizaron por triplicado, reportando el promedio \pm la desviación estándar.

3.1.1.3.1. Humedad

Para conocer la humedad del material se pesaron 2 g de muestra y se colocaron dentro de una termobalanza (OHAUS MB90) a 120 °C hasta obtener un peso constante (AOAC, 1980). Se registró la pérdida de peso y se reportó como la humedad de la misma.

3.1.1.3.2. Proteína

El contenido de proteína se determinó de acuerdo a la metodología de (AOAC, 1980). Para ello, se pesó 1 g de muestra (previamente molida) y se colocó en un matraz Kjeldhal y se agregó una cucharada de Selenio, se añadieron seis perlas de vidrio. Posteriormente se adicionaron 30 mL de H₂SO₄ concentrado, se colocó el matraz en el digestor Kjeldhal. La mezcla se mantuvo en reacción hasta observar un cambio de color café oscuro a verde claro, se agregaron 30 mL de agua destilada. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se mezclaron 50 mL de H₃BO₃ ácido bórico y 6 gotas de indicador mixto, se colocó la manguera del destilador Kjeldhal dentro del matraz. Se adicionaron 110 mL de NaOH al 45% y una cucharada de Zn, se mezclaron y se conectó al aparato de destilación, calentando hasta obtener 300 mL. Se corrió un blanco (H₂SO₄) en lugar de la muestra, para emplearlo en el cálculo de los resultados. Se procedió a titular ambas muestras, y el contenido de proteína se expresó en porcentaje, de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% N = \frac{(mL \text{ de ácido}) (N \text{ de ácido}) - (mL \text{ blanco})(N \text{ blanco}) * 0.014}{\text{gramos de muestra}} * 100$$

$$\% \text{ Proteína Cruda} = \%N \times 6.25$$

3.1.1.3.3. Extracto etéreo (Grasa)

En esta técnica, la grasa presente en la muestra se extrae con hexano y se reporta el porcentaje del peso después de eliminar el solvente (AOAC, 1980). Para ello, se pesaron sobre un papel

filtro 3 g de muestra molida y se colocaron dentro de un dedal de asbesto. Se agregaron 250 mL de hexano en un matraz bola de fondo plano, previamente tarado. El dedal se introdujo en la unidad de extracción (sifón Soxhlet) y se conectó al extractor el matraz bolo, calentando a ebullición durante 6 h. Pasado el tiempo de extracción, se retiró el dedal para recuperar el sobrenadante. Finalmente, se colocó el matraz en una estufa a 80 °C durante 12 h para eliminar completamente el hexano. Después de ello, el matraz se retiró de la estufa para enfriarlo y registrar su peso. La fórmula para determinar el extracto libre de nitrógeno fue la siguiente.

$$\% \text{Extracto Etereo} = \frac{\text{peso de matraz+grasa} - \text{peso de matraz vacío}}{\text{gramos de muestra}} * 100$$

3.1.1.3.4. Cenizas

Este componente se obtiene después de incinerar la muestra hasta lograr una combustión completa de la materia orgánica, misma que se lleva a peso constante (AOAC, 1980). Para ello, se pesaron crisoles y se les colocó 1 g de muestra, calentando suavemente la muestra con un mechero hasta carbonizar. Posteriormente se colocaron los crisoles dentro de la mufla a 500 °C durante 24 h. Después de ello, los crisoles se colocaron en un desecador por 30 min para enfriarlos, antes de registrar su peso y obtener el contenido de cenizas a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{Ceniza} = \frac{\text{Peso del crisol} + \text{ceniza} - \text{Peso de crisol vacío}}{\text{gramos de muestra}} * 100$$

3.1.1.3.5. Fibra Cruda

En este método se cuantifican las sustancias resistentes a la digestión acida y alcalina de la muestra. Para ello se pesaron 2 g de muestra seca y desengrasada, posteriormente fue colocada en un vaso de Berzelius de 600 mL. Se agregaron 100 mL de solución sulfúrico 0.255 N, fue sometido a calentar hasta encontrar el punto de ebullición, tomando tiempo de 30 min una vez que comience a hervir y bajar temperatura. Después de ello, se hizo el filtrado a través de la tela de lino con ayuda de un embudo de filtración, lo cual se hicieron lavados con agua destilada caliente para eliminar el ácido. Posteriormente se hizo el mismo proceso, pero para la digestión alcalina lo cual para esto se hizo uso de la solución de NaOH al 0.313 N. Para finalizar se metió a un proceso de secado donde se transfirió la muestra a un crisol previamente pesado a peso constante, dejándose en la estufa durante 12 h, pasando el tiempo se dejó enfriar en el desecador y fue pesado a peso constante para

después pasar a un proceso de calcinación donde se colocó el crisol dentro de la mufla y calcinar a 600 °C por 2 h, pasando el tiempo se dejó enfriar por 1 h en un desecador para después pesar a peso constante y obtener el contenido de fibra cruda a partir de la siguiente ecuación:

$$\%Fibra = \frac{\text{peso del crisol} + \text{muestra seca} - \text{peso del crisol} + \text{cenizas}}{\text{gramos de muestra desengrasada}} * 100$$

3.1.1.3.6. Carbohidratos

El contenido de carbohidratos se obtuvo por diferencia, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Carbohidratos} = 100 - (\% \text{ cenizas} + \% \text{ extracto etéreo} + \% \text{ proteína cruda} + \% \text{ fibra cruda})$$

3.2. ETAPA 2. Efecto de la cepa y tiempo de fermentación sobre la extracción y recuperación de compuestos fenólicos a partir de ayocote y su capacidad antioxidante.

3.2.1. Microorganismos

Se emplearon dos cepas fúngicas, codificadas como *Aspergillus awamori* y *A. niger* HT4, proporcionadas por el DIA-FCQ-UAdC. Las cepas fúngicas se mantuvieron -20 °C en una mezcla de glicerol-leche descremada. Las esporas se reactivaron en agar papa dextrosa (PDA-Bioxon®) e incubadas a 30 °C durante 5 días. Ya reactivadas, se inocularon en matraces Erlenmeyer (250 mL) con 30 mL de PDA y se incubaron a 30 °C durante 5 días. Las esporas se colectaron con una solución estéril de Tween-80 al 0.01 % (v/v), se agitó suavemente y se realizó el conteo en una cámara de Neubauer.

3.2.2. Fermentación en medio sólido (FMS)

El proceso de FMS se llevó a cabo empleando el frijol ayocote como soporte y fuente de nutrientes, impregnado con el medio mineral Czapek-Dox. La composición del medio fue (g/L): 1.52 KCl, 1.52 MgSO₄, 7.65 NaNO₃, 3.04 K₂HPO₄. El ayocote (190 g) se mezcló con el medio previamente inoculado con 1x10⁶ esp/g de cada hongo hasta alcanzar una humedad inicial de 45 %. Se colocaron 13 g de la mezcla en reactores de columna (31.5 x 180 mm). La fermentación se llevó a cabo a 30 °C durante 72 h, tomando muestra cada 12 h. Para obtener los extractos fermentados se agregaron 12 mL de alcohol al 50 %, se agitó y se prensó el material. Los extractos obtenidos se almacenaron en viales de 2 mL y se almacenaron a -18 °C hasta su uso para determinar el contenido de fenoles

hidrolizables (FH), condensados (FT), y totales (FT), así como la capacidad antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP).

3.2.3. Análisis químico

3.2.3.1. Fenoles Hidrolizables

Finalmente se utilizó el concentrado, para ello se colocaron 20 μL de muestra añadiendo 20 μL de reactivo Folin-Ciocalteu dejando reposar durante 5 min, posteriormente se añadió 20 μL de carbonato de sodio, se dejó en reposo de 5 min. Finalmente se agregó 125 μL de agua destilada se registró la absorbancia a 790 nm en un lector de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific). El ensayo se hizo por triplicado y los resultados se expresaron como mg equivalentes ácido gálico por mg de ayocote (mgEAG/mg) empleando una curva de calibración con ácido gálico a 0.2 mg/mL ($y=3.594x+0.0128$; $R^2 = 0.9914$) (Anexo 1).

3.2.3.2. Fenoles Condensados

Los fenoles condensados (FC) presentes en los extractos se determinaron empleando el reactivo HC-1: Butanol (1:9) (Swan y Hillis, 1959). Para ello, se colocaron 250 μL de muestra en un tubo de ensaye, y se mezclaron con 1500 μL de HCl-Butanol. Se añadieron 50 μL de reactivo férrico (Fe 55.845g/mol; O 63.997g/mol; S 32.065g/mol). Los tubos se taparon y se llevaron a ebullición durante 40 min. Después de este tiempo, las muestras se atemperaron a 25 °C. Finalmente, se colocaron 200 μL de cada muestra en los pozos de la microplaca, y se registró su absorbancia a 460 nm en un lector de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific). El ensayo se hizo por triplicado y los resultados se expresaron como mg de equivalentes de catequina por mg de Ayocote (mgEC/mg) empleando una curva de calibración con catequina de 0.2 a 1 mg/mL ($y=0.6491x-0.0097$; $R^2=0.9895$) (Anexo 2).

3.2.3.3. Fenoles totales (FT)

Se obtuvo de la suma del contenido de fenoles condensados e hidrolizables.

3.2.3.4. Capacidad antioxidante

DPPH

La determinación de la capacidad de la muestra para eliminar los radicales libres se realizó de acuerdo a lo reportado por (Meléndez *et al.* 2014) empleando una solución de radical DPPH \cdot (2,2-difenil-1-picrilhidracilo, Sigma-Aldrich®, México) a 60 μM (2.365 mg en 100 mL de etanol

absoluto). Se mezclaron 7 μL de muestra (extracto de Ayocote) con 193 μL de solución DPPH. Se preparó un control (DPPH-Etanol) y un blanco (Etanol). La mezcla se dejó reaccionar en la oscuridad por 30 min y se registró la absorbancia a 517 nm en un lector de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific). El ensayo se hizo por triplicado y los resultados se expresaron como mg de equivalentes Trólox por mg de Ayocote (mgET/mg) empleando una curva de calibración con Trólox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico; Sigma-Aldrich®, México) de 0.2 a 1 mg/mL ($y=1.9686x-0.0029$; $R^2=0.9965$) (Anexo 3).

ABTS

El ensayo ABTS se basa en cuantificar la decoloración del radical ABTS^+ , inducida por la reducción a ABTS en presencia de antioxidantes (Re et al. 1999). El radical catión ABTS^+ se genera mediante la oxidación del ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) con persulfato de potasio, dando lugar a un cromóforo verde que absorbe a 734 nm. Por lo tanto, el grado de decoloración del radical ABTS^+ es proporcional a la concentración de antioxidantes en la muestra. Para preparar el radical catión ABTS^+ se mezcló una solución de ABTS 7 μM (0.3602 g en 100 mL agua) con persulfato de potasio (2.45 μM , 0.0662 g en 100 mL agua), y se mantuvo durante 12-16 h a temperatura ambiente y en oscuridad. La solución catión ABTS se diluyó con etanol hasta ajustar la absorbancia a 0.7 ± 0.02 nm. Para el ensayo, se colocaron 10 μL de muestra y 190 μL de la solución de ABTS^+ ; después de 1 min de reacción en reposo, se registró la absorbancia a 734 nm en un lector de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific). Se empleó un control (ABTS^+) y un blanco (etanol). El ensayo se hizo por triplicado y los resultados se expresaron como mg de equivalentes Trólox por mg de Ayocote (mgET/mg) empleando una curva de calibración con Trólox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico; Sigma-Aldrich®, México) de 0.2 a 1 mg/mL ($y=2.4243x+0.0022$; $R^2=0.9902$) (Anexo 4).

FRAP

El ensayo de FRAP para determinar la capacidad antioxidante de una muestra se basa en la reducción del hierro presente en el reactivo FRAP de Fe^{+3} a Fe^{+2} , por presencia de antioxidantes. El reactivo FRAP posee una coloración azul, de intensidad proporcional a la capacidad de reducción de la muestra, misma que se puede detectar a 593 nm con base a un patrón de sulfato ferroso. El ensayo se hizo acorde a lo reportado por (Álvarez-Parrilla *et al.* 2005).

Para preparar el reactivo se utilizaron 35 mL de buffer de acetatos (ácido acético-acetato de sodio) a 0.3 M (pH 3.6), 3.5 mL de solución TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (Sigma-aldrich®, México) al 10 mM en ácido clorhídrico 40 mM y FeCl₃.6H₂O 20 mM. Se mezclaron cada uno de los reactivos utilizando las proporciones de 10:1:1, y se incubaron a 39 °C por 30 min. Para el ensayo, se mezclaron 6 µL de muestra con 18 µL de agua destilada (1:3 v/v), y posteriormente se agregaron 180 µL de reactivo FRAP. La mezcla se agitó y se incubó a 37 °C por 60 min. Finalizado el tiempo de reacción, se determinó la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific), empleando como blanco etanol al 50 %. El ensayo se hizo por triplicado y los resultados se expresaron como mg de equivalentes Fe⁺² por mg de Ayocote (mgFe⁺²/mg) empleando una curva de calibración con Fe₂SO₄ (Sulfato ferroso, Sigma-Aldrich®, México) de 0.1 a 1 mg/mL en metanol al 80 % ($y=1.4038x-0.0244$; $R^2=0.9977$) (Anexo 5).

3.2.3.5. Análisis de resultados

Para realizar el estudio se planteó un Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial 2x6 para evaluar el efecto de la cepa empleada sobre el contenido de FT (FC y FH) y la capacidad antioxidante de los extractos fermentados de Ayocote. Los factores fueron A: la cepa fúngica dos niveles (1. *Aspergillus awamori* y 2. *A. niger* HT4) y B: tiempo con seis niveles (0, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, empleando el software SAS 9.0. Se estableció una $p<0.05$ como valor crítico para determinar diferencias entre tratamientos. Cuando fue necesario, se realizó una prueba de comparación de medias usando el procedimiento de rangos de Tukey ($P<0.05$).

3.3. ETAPA 3. Efecto de las condiciones de fermentación sobre el contenido nutrimental, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de extractos de frijol Ayocote.

3.3.1. Fermentación en medio sólido (FMS)

Para evaluar las condiciones del proceso de FMS, se realizó una fermentación empleando el hongo *A. niger* HT4 a un tiempo de 60 h, parámetros seleccionados en la etapa anterior. El proceso se realizó en reactores de columna (31.5mm x 180 mm) empleando ayocote como sustrato, a las diferentes condiciones de proceso que se muestran en el cuadro 1. Al final de la fermentación, se procedió a obtener los extractos, tal como se reporta en la sección 3.2.2. Los extractos obtenidos

se emplearon para determinar el contenido de fenoles totales (hidrolizables + condensados) y la capacidad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP), tal como se reportó en la sección 3.2.3.

Cuadro 1. Matriz experimental Box-Hunter & Hunter (BHH) 2^k con tres puntos centrales para determinar el efecto de la concentración de inóculo, temperatura, humedad y concentración de sales (KH_2PO_4 , NaNO_3 , MgSO_4 y KCl) sobre el contenido de FT y la capacidad antioxidante de ayocote fermentado por *A. niger* HT4.

Tratamiento	A	B	C	D	E	F	G
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	1	-1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1
9	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0

Código	Factor	Nivel bajo (-1)	Nivel medio (0)	Nivel alto (1)
A	Inoculo (esp/gms)	1×10^6	5.5×10^6	1×10^7
B	Temperatura (°C)	30	35	40
C	Humedad (%)	35	40	45
D	KH_2PO_4	1.52	2.28	3.04
E	NaNO_3	3.04	4.56	7.65
F	MgSO_4	1.52	2.28	3.04
G	KCl	1.52	2.28	3.04

3.3.2. Análisis de resultados

En la primera etapa se realizó un diseño completamente al azar para determinar el efecto de la cepa y el tiempo de fermentación sobre el contenido de FT y capacidad antioxidante de extractos de ayocote fermentado. En la segunda fermentación, se planteó un diseño factorial 2^k Box-Hunter &

Hunter con tres puntos centrales (Cuadro 1) empleando el software Statistica 7.0 (Stat Soft, TULSA, Ok, usa) para evaluar el efecto de la [inóculo], temperatura, humedad y [sales] (KH_2PO_4 , NaNO_3 , MgSO_4 y KCl) sobre las variables de respuesta [FT (FH+FC), capacidad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP)]. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se expresan como el promedio ($n=3$) \pm su desviación estándar. Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y, cuando fue necesario, se realizó una prueba de comparación de medias para establecer diferencia entre tratamientos (Tukey). Los valores de $p<0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ETAPA 1. Obtención y caracterización fisicoquímica del frijol ayocote para ser utilizado como soporte en la fermentación en medio sólido.

El análisis químico proximal comprende las determinaciones que se realizan más frecuentes para conocer la composición de los macro componentes presentes en un alimento e incluye la determinación de humedad, cenizas, extracto etéreo (grasa cruda), proteína total, fibra dietética y carbohidratos asimilables (Vázquez *et al.* 2020). En las figuras 2, 3 y 4 se muestran algunos de los análisis realizados al frijol ayocote.



Figura 2. Determinación de cenizas en el ayocote.



Figura 3. Determinación de grasa en el ayocote.



Figura 4. Determinación de fibra cruda en el ayocote.

Con base en los resultados obtenidos, el frijol ayocote presentó la siguiente composición (%): cenizas 7.49, proteína 11.97, lípidos 2.08, carbohidratos 74.52, fibra 4.10 y humedad 6.29. Estos valores se encuentran dentro del rango reportado por diversos autores (López-Martínez *et al.* 2020; Alvarado-Salas *et al.* 2009; Alvarado-López *et al.* 2019), con los siguientes valores (%): cenizas 2-5, proteína 15-22, lípidos 1-3%, fibra cruda 5-7%, carbohidratos 47-70 y humedad de 6-8%. Ligeras diferencias en el análisis proximal pueden ser debido a la variedad de frijol, ya que involucra otros factores como el genotipo, las prácticas agronómicas, la madurez en la cosecha, las condiciones de almacenamiento y finalmente el método de extracción. Asimismo, el frijol ayocote presentó valores de IAA y PCH de 3.42 g.gel/gm y 7.0 % respectivamente, aptos para ser empleado como soporte en procesos de FMS. Según (Pastrana *et al.* 2009) son puntos muy importantes en el crecimiento microbiano donde los rangos van de 3 a 7.5 %.

4.2. ETAPA 2. Evaluación del efecto de la cepa y tiempo de fermentación sobre la extracción y recuperación de compuestos fenólicos a partir de ayocote y su capacidad antioxidante.

En esta etapa se estudió el efecto de la cepa y el tiempo de cultivo sobre la liberación de compuestos fenólicos por FMS a partir del frijol ayocote. Se emplearon dos cepas fúngicas, *A. awamori* y *A. niger* HT4, realizando una fermentación por 72 h, y los resultados obtenidos se muestran en las figuras 5, 6, 7 y 8, así como los cuadros 2 y 3.

Si bien el contenido de FH es muy bajo en el frijol ayocote, durante la FMS se presentó un comportamiento similar para ambas cepas fúngicas, donde se aprecia liberación y consumo de los compuestos, con los valores más altos a las 12 y 24 h de cultivo, siendo ligeramente superiores al emplear la cepa *A. niger* HT4 (Fig. 5a). Respecto a los FC, se observó que la mayor liberación de estos ocurre a las 60 h con la cepa *A. niger* HT4, con un valor de hasta 3.6 veces superior al reportado con *A. awamori* al mismo tiempo de cultivo (Fig. 5b). Este comportamiento se repite en el contenido de FT (Fig. 6), con un valor máximo a las 60 h con *A. niger* HT4. Esta similitud se debe a que la mayor parte de compuestos fenólicos presentes en el frijol ayocote son FC, y los FT representan la suma de FH y FC.

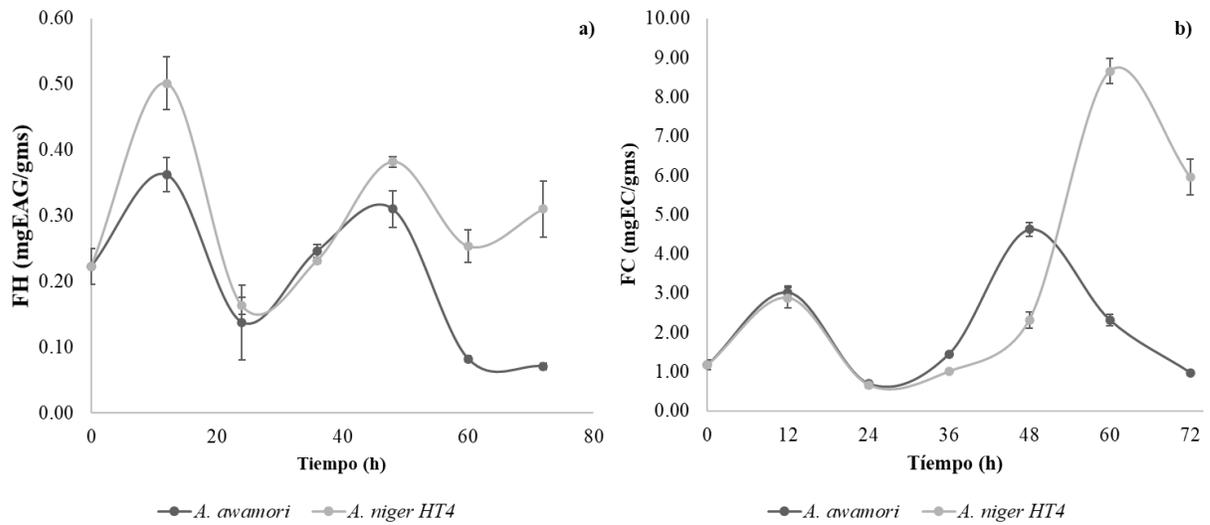


Figura 5. Efecto del tiempo de cultivo sobre el contenido de a) FH y b) FC en frijol ayocote fermentado por *A. awamori* (●) y *A. niger HT4* (●).

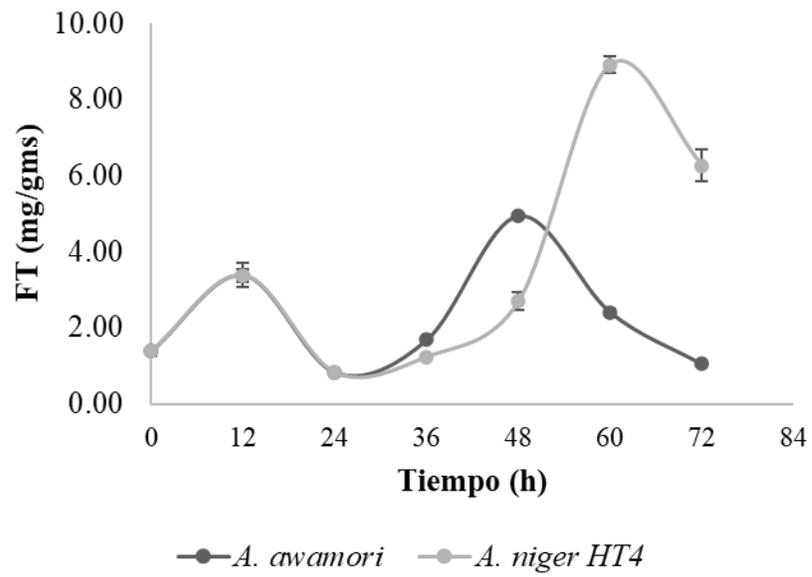


Figura 6. Efecto del tiempo de cultivo sobre el contenido de FT en frijol ayocote fermentado por *A. awamori* (●) y *A. niger HT4* (●).

Durante la fermentación ocurre una serie de biotransformaciones, derivadas de la acción de diversas enzimas producidas por el microorganismo, las cuales degradan los componentes de la

pared celular, liberando de esta manera los compuestos fenólicos, aumentando así la capacidad antioxidante de la muestra. En las figuras 7 y 8 se aprecia el efecto del tiempo de cultivo sobre la actividad antioxidante de los extractos de frijol ayocote fermentados por las dos cepas evaluadas, de acuerdo a los ensayos DPPH, ABTS y FRAP. Al igual que en los FC, la mayor actividad antioxidante en los tres ensayos se observó a las 60 h con el hongo *A. niger* HT4.

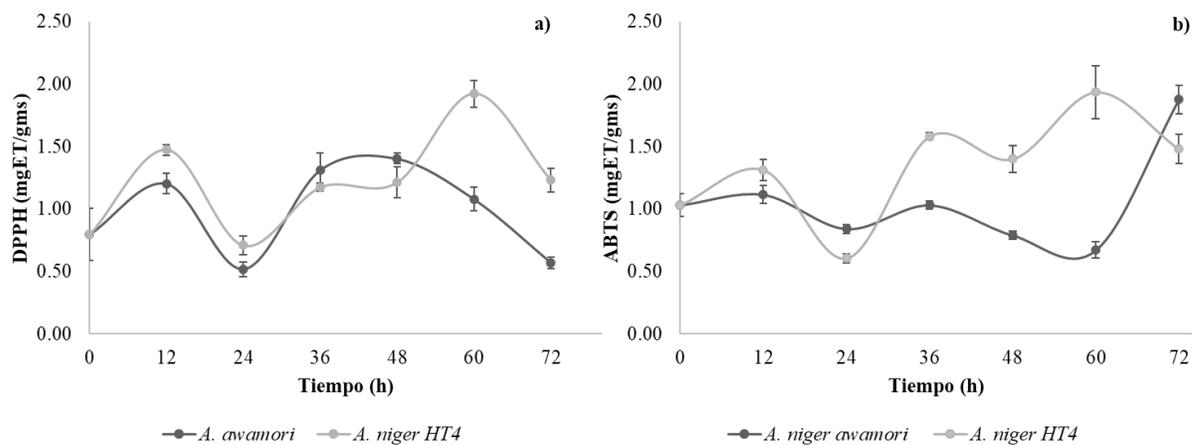


Figura 7. Efecto del tiempo de cultivo sobre la capacidad antioxidante a) DPPH y b) ABTS de extractos de frijol ayocote fermentado por *A. awamori* (●) y *A. niger* HT4 (◻).

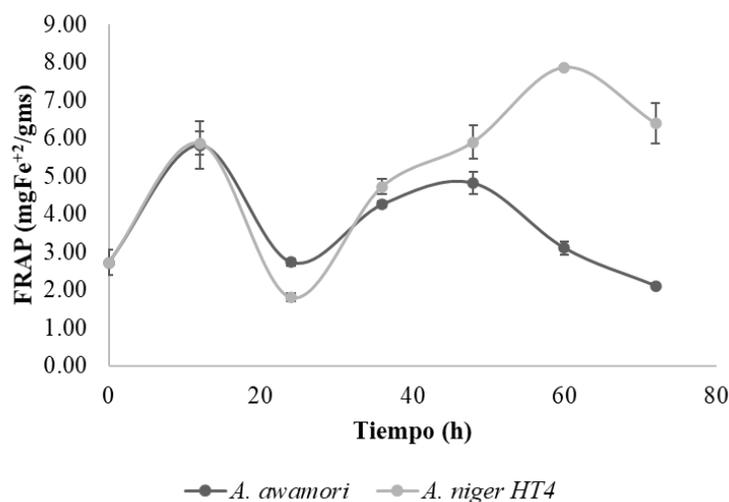


Figura 8. Efecto del tiempo de cultivo sobre la capacidad antioxidante (FRAP) de extractos de frijol ayocote fermentado por *A. awamori* (●) y *A. niger* HT4 (◻).

Para determinar el efecto del tiempo de cultivo sobre el proceso de FMS de frijol ayocote, se realizó un ANOVA donde se agruparon los valores de ambos hongos (*A. awamori* y *A. niger* HT4), y los

resultados se muestran en el cuadro 2. Se puede apreciar un comportamiento típico de este tipo de procesos microbianos, donde se aprecian liberación y consumo de los mismos compuestos, derivado de la actividad metabólica de los hongos.

De manera general, se encontró una mayor liberación de FC y FT a las 60 h (5.49 mgEAG/gms y 5.65 mg/gms, respectivamente), sin diferencia significativa con los tiempos de 12, 48 y 72 h de fermentación ($p < 0.05$), pero con valores de hasta 4 veces mayores respecto al control sin fermentar. El valor tan alto en la desviación estándar para FT se debe a que se están considerando los valores de ambos hongos, siendo que para *A. awamori*, a las 60 h de cultivo se observó un valor de FT de 2.40 ± 0.08 mg/gms, valor hasta 3.60 veces menor al obtenido con *A. niger* HT4 al mismo tiempo de cultivo (8.66 ± 0.24 mg/gms) (Fig. 6).

Cuadro 2. Efecto del tiempo de cultivo sobre el contenido de fenoles hidrolizables (FH), condensados (FC) y totales (FT) y la capacidad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP) de extractos obtenidos de la FMS de ayocote con *A. niger* HT4 y *A. awamori*.

Tiempo (h)	FH (mgEAG)	FC (mgEC)	FT (mg)	DPPH (mgET)	ABTS (mgET)	FRAP (mgFe ⁺²)
0	0.22±0.01b	1.17±0.01b	1.39±0.01b	0.79±0.01c	1.03±0.01bc	2.76±0.01bc
12	0.43±0.09a	2.95±0.01ab	3.38±0.01ab	1.34±0.19a	1.21±0.14abc	5.85±0.03 ^a
24	0.15±0.02b	0.67±0.02b	0.82±0.01b	0.61±0.13c	0.72±0.17c	2.27±0.46c
36	0.23±0.31b	1.22±0.01b	1.46±0.32b	1.24±0.09ab	1.30±0.39ab	4.49±0.23ab
48	0.34±1.63a	3.47±0.05ab	3.81±1.58ab	1.30±0.13a	1.09±0.43bc	5.36±0.54 ^a
60	0.16±0.12b	5.49±0.12a	5.65±4.60a	1.50±0.60a	1.30±0.89a	5.48±2.37^a
72	0.19±3.52b	3.46±0.17ab	3.65±3.69ab	0.9±0.46bc	1.68±0.28a	4.26±2.14abc

Los resultados representan la media global de los dos hongos evaluados (*A. niger* HT4 y *A. awamori*), incluyendo tres repeticiones de cada uno (N=9) y se expresan por gramo de material seco (gms). Letras diferentes entre columnas indican diferencia significativa (Tukey, $p < 0.05$).

Respecto a la actividad antioxidante de los extractos fermentados a diferentes tiempos, se observó un comportamiento similar en las tres técnicas evaluadas, con los mejores valores obtenidos a las 60 h de cultivo, con aumentos de hasta 1.9, 1.26 y 1.98 veces respecto al control, frente a los radicales DPPH, ABTS y la actividad antioxidante total (FRAP), respectivamente. Lo anterior demuestra que el mejor tiempo de FMS de frijol ayocote es de 60 h, con cualquier de los hongos

evaluados. En las Fig. 9 y 10 se muestra el ayocote empacado en los reactores, así como una vista superior al tiempo de 60 h, donde se aprecia como fue invadido por ambas cepas fúngicas evaluadas.



Figura 9. Material fermentado (ayocote) con *A. awamori* a las 60 h.



Figura 10. Reactores en columna empacados con el frijol ayocote al tiempo inicial (a) y a las 60 h (b) de FMS con *A. niger* HT4.

Al analizar el efecto de la cepa, en el cuadro 3 se muestra la comparación de las medias globales de cada hongo, durante todo el proceso de FMS. Se observaron diferencias significativas entre cepas para cada una de las variables de respuesta ($p < 0.05$). Los valores más altos se obtuvieron al emplear el hongo *A. niger* HT4, con incrementos en el contenido de FH, FT y FC, así como en la actividad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP), siendo de hasta 1.60, 1.45, 1.13, 1.24, 1.28 y 1.38 veces mayores a los reportados para *A. awamori*, respectivamente.

Cuadro 3. Efecto de la cepa (*A. niger* GH1 y *A. awamori*) sobre el contenido de FH, así como la capacidad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP) de extractos obtenidos de la FMS de ayocote.

Parámetro/Cepa	<i>A. awamori</i>	<i>A. niger</i> HT4
FC (mgEC/gms)	0.20b	0.29a
FH (mgEAG/gms)	2.04b	3.27a
FT (mg/gms)	2.24b	2.53a
ABTS (mgET/gms)	1.05b	1.34a
DPPH (mgET/gms)	0.98b	1.22a
FRAP (mgFe⁺²/gms)	3.66b	5.05a

*Los resultados representan la media global de todos los tiempos de fermentación, incluyendo tres repeticiones de cada uno (N=21). Letras diferentes entre columnas indican diferencia entre cepas fúngicas (Tukey, $p < 0.05$).

Con base a estos resultados, se seleccionó el hongo *A. niger* HT4 a un tiempo de cultivo de 60 h, ya que, comparado con el control sin fermentar, permitió incrementar hasta 6.4, 2.43, 1.87 y 2.88 veces el contenido de FT, así como incrementar la capacidad antioxidante de acuerdo a los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente.

4.3. ETAPA 3. Efecto de las condiciones de fermentación de frijol Ayocote y su efecto sobre el contenido nutrimental, compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante.

En esta etapa se evaluaron algunas variables de operación del proceso de FMS de ayocote. El diagrama de Pareto (Fig. 11-14) nos muestra el efecto de los factores sobre la liberación de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de extractos de frijol ayocote fermentado. En este diagrama permite apreciar todos aquellos factores que influyen de manera significativa, situados por encima de la línea roja punteada ($p \leq 0.05$). De los siete factores evaluados, cuatro de ellos (Temperatura, humedad, KH_2PO_4 y la concentración de inóculo) mostraron un efecto significativo sobre la liberación de FH (Fig. 11a). Al igual que la temperatura (Fig. 10b), la humedad y la concentración de KH_2PO_4 influyen de manera negativa en la liberación de FH, es decir, que a medida que se aumenta el nivel de estos, la liberación de FH disminuye.

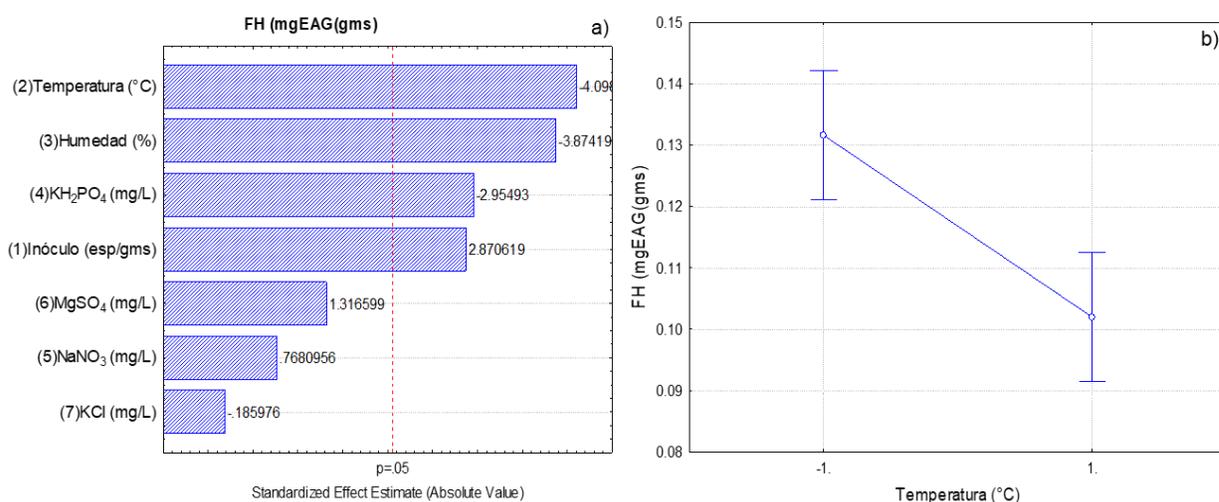


Figura 11. Diagrama de Pareto que muestra los efectos estimados a partir del diseño BHH (a) y el efecto de la temperatura sobre el contenido de fenoles hidrolizables (b).

En el caso del efecto de los parámetros de proceso de FMS sobre la liberación de FC y FT (Fig. 12 a y b), ninguno de los niveles evaluados para cada factor mostró un efecto significativo sobre estas variables de respuesta.

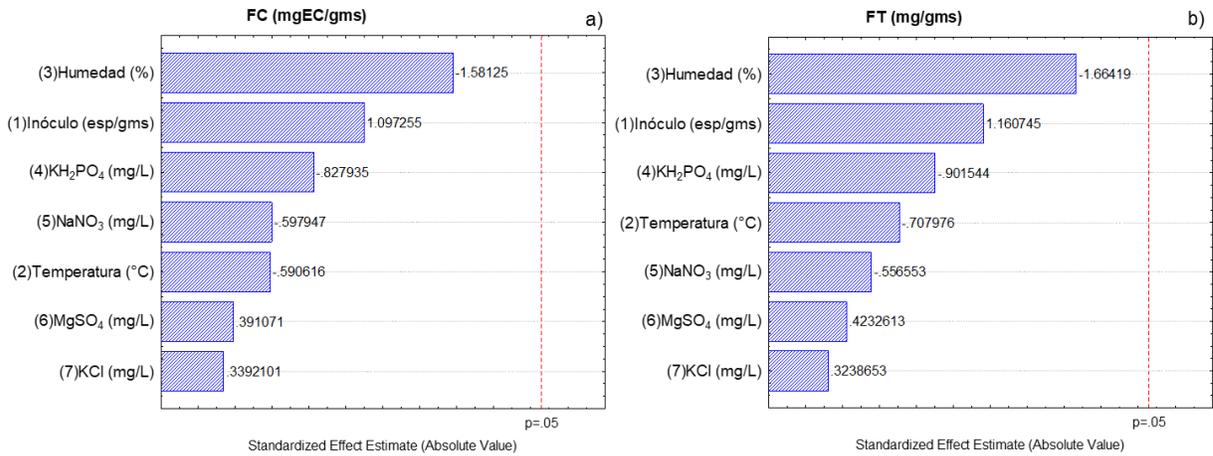


Figura 12. Diagrama de Pareto que muestra los efectos estimados a partir del diseño BHH para fenoles condensados (a) y totales (b).

Al determinar la actividad antioxidante frente a los radicales ABTS y DPPH (Fig. 13a y b), se observó que, de los parámetros evaluados, únicamente la temperatura y la humedad mostraron un efecto significativo sobre la actividad antioxidante de los extractos fermentados de ayocote. Al igual que para la liberación de FH, el efecto de estos parámetros fue negativo, por lo cual se recomienda utilizar los niveles bajos tanto de humedad como de temperatura.

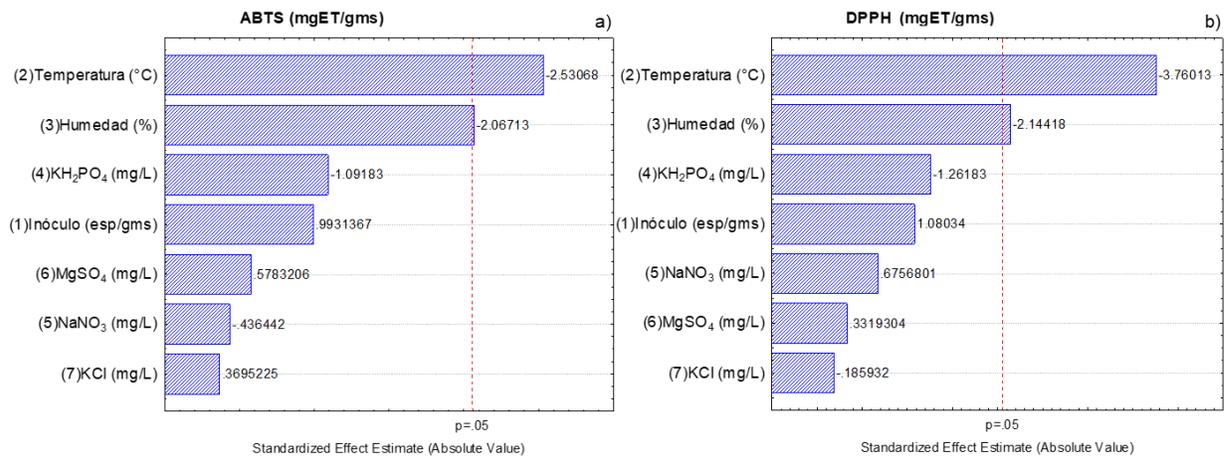


Figura 13. Diagrama de Pareto que muestra los efectos estimados a partir del diseño BHH para la actividad antioxidante frente al radical a) ABTS y b) DPPH.

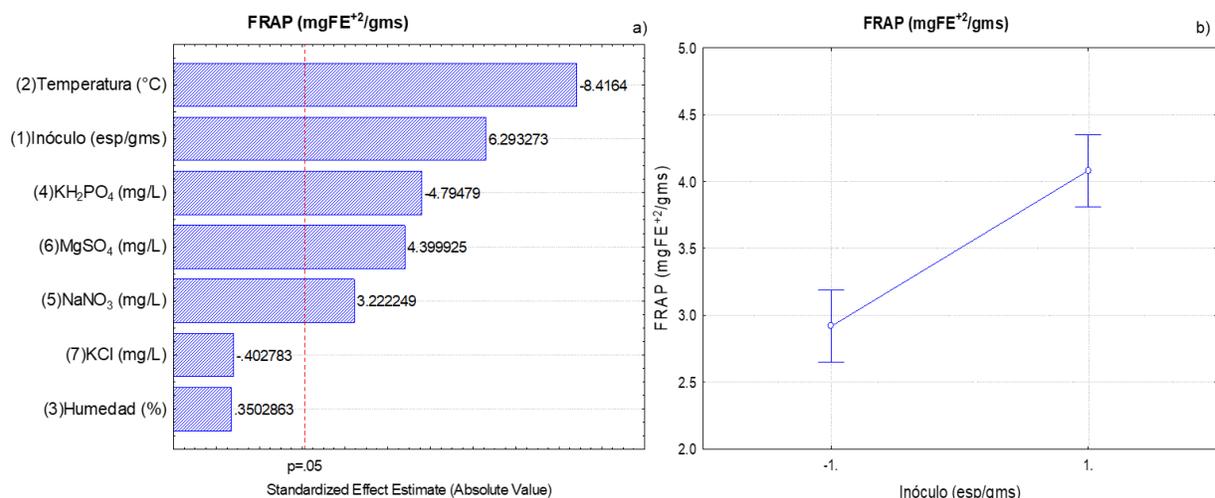


Figura 14. Diagrama de Pareto que muestra los efectos estimados a partir del diseño BHH (a) y el efecto de la concentración de inóculo sobre la actividad antioxidante en el método FRAP (b).

Finalmente, al determinar el efecto de los parámetros del proceso de FMS de ayocote sobre la capacidad antioxidante total de acuerdo al ensayo FRAP (Fig. 14a), se observó que únicamente el KCl y la humedad no mostraron un efecto significativo sobre la variable de respuesta. La temperatura y la concentración de KH₂PO₄ influyen de manera negativa, de tal manera que, al aumentar los niveles de estos parámetros, la capacidad antioxidante total FRAP disminuye. Al igual que la concentración de inóculo (Fig. 14b), un aumento en los niveles de concentración de MgSO₄ y NaNO₃ promueve una mayor actividad antioxidante FRAP en los extractos fermentados de ayocote.

Al analizar los resultados obtenidos en la matriz BHH (Cuadro 4), se encontraron valores de FH de 0.09 a 0.17 mgEAG/gms, siendo el más alto obtenido en el tratamiento 2, ligeramente mayor al obtenido en el tratamiento 9, pero sin diferencia significativa entre ellos ($p < 0.05$), mostrando un ligero incremento (0.15 veces) respecto al control sin fermentar. Resultados similares se observaron para el contenido de FC y FT, con los valores más altos en el tratamiento 9, seguido del tratamiento 2, con incrementos de hasta 1.54 y 1.41 veces en el contenido de FC y FT, respectivamente, respecto al control sin fermentar.

Respecto a la capacidad antioxidante de los extractos fermentados frente a los radicales DPPH y ABTS, los valores más altos se obtienen en el tratamiento 9, seguido del tratamiento 2, con incrementos de hasta 1.45 y 2 veces, comparado con el control sin fermentar, respectivamente.

Para la capacidad antioxidante total por el método de FRAP, el mejor valor se obtiene en el tratamiento 2 (5.34 mgFe⁺²) sin diferencia significativa con el tratamiento 6, con un aumento de hasta 2 veces la capacidad antioxidante respecto al control sin fermentar.

Al explorar las condiciones del proceso de FMS, se esperaba encontrar un aumento en las variables de respuesta. Sin embargo, los valores obtenidos en la primera fermentación con el hongo *A. niger* HT4 a las 60 h de cultivo (Fig. 5-9) son superiores a los obtenidos en cualquiera de los tratamientos de la segunda fermentación (Cuadro 4). Lo anterior se puede deber a un mal almacenamiento de la muestra, que haya permitido la degradación de los compuestos fenólicos presentes, y por consecuencia, la disminución en la actividad antioxidante.

Cuadro 4. Matriz experimental Box-Hunter & Hunter (BHH) 2^k con tres puntos centrales para determinar de las condiciones de FMS sobre el contenido de FT y la capacidad antioxidante de ayocote fermentado por *A. niger* HT4.

Trat	A	B	C	D	E	F	G	FH (mgEAG)	FC (mgEC)	FT (mg)	DPPH (mgET)	ABTS (mgET)	FRAP (mgFe ⁺²)
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0.13±0.01bcd	0.55±0.01cde	0.69±0.01cd	0.85±0.16b	1.10±0.04d	3.96±0.06c
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1	0.17±0.01a	1.17±0.03b	1.34±0.04b	1.15±0.09ab	1.74±0.04bc	5.34±0.15a
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1	0.11±0.01cde	0.59±0.04cd	0.71±0.01cd	0.60±0.04c	0.74±0.03e	2.41±0.06fg
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0.11±0.01de	0.71±0.06c	0.82±0.07c	0.54±0.05c	0.73±0.03e	2.16±0.12g
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1	0.09±0.01e	0.33±0.02e	0.42±0.02e	0.057±0.03c	0.70±0.04e	2.54±0.05ef
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1	0.14±0.01bc	0.54±0.01cde	0.68±0.01cd	0.84±0.05b	0.98±0.02d	5.26±0.22a
7	-1	1	1	-1	1	-1	-1	0.09±0.01e	0.39±0.02de	0.48±0.01de	0.41±0.01c	0.43±0.01f	2.76±0.11e
8	1	1	1	1	1	1	1	0.09±0.01e	0.40±0.02de	0.49±0.02de	0.43±0.01c	0.40±0.01f	3.56±0.10d
9	0	0	0	0	0	0	0	0.16±0.01ab	1.80±0.13a	1.96±0.15a	1.15±0.06a	2.07±0.13 ^a	4.80±0.41b
10	0	0	0	0	0	0	0	0.13±0.01bcd	1.32±0.03b	1.45±0.02b	0.98±0.03ab	1.71±0.10c	3.92±0.12c
11	0	0	0	0	0	0	0	0.13±0.01bcd	1.63±0.19b	1.77±0.23a	1.00±0.03ab	1.86±0.11bc	3.92±0.14c

Código	Factor	Nivel bajo (-1)	Nivel medio (0)	Nivel alto (1)
A	Inóculo (esp/gms)	1x10 ⁶	5.5x10 ⁶	1x10 ⁷
B	Temperatura (°C)	30	35	40
C	Humedad (%)	35	40	45
D	KH ₂ PO ₄ (g/L)	1.52	2.28	3.04
E	NaNO ₃ (g/L)	3.04	4.56	7.65
F	MgSO ₄ (g/L)	1.52	2.28	3.04
G	KCl (g/L)	1.52	2.28	3.04

*Los resultados representan la media de tres repeticiones, expresados por mg de ayocote. Letras diferentes entre columnas indican diferencia significativa (Tukey, p<0.05).

En el cuadro 5 se muestran los coeficientes de correlación de Pearson, que nos indica la relación que existe entre las variables de respuesta, con valores de -1 a 1, lo cual indica una correlación negativa o positiva, respectivamente.

Cuadro 5. Coeficiente de correlación por Pearson entre las variables en estudio.

	FHID	FCON	FT	DPPH	ABTS	FRAP
FHID	1	0.34*	0.99**	0.77**	0.42*	0.81**
FCON		1	0.38*	0.57**	0.15*	0.68**
FT			1	0.79**	0.42*	0.83**
DPPH				1	0.33*	0.86**
ABTS					1	0.51*
FRAP						1

*Significativo (≤ 0.05); ** Altamente significativo (≤ 0.0001)

Todas las variables de respuesta mostraron una correlación positiva significativa entre ellas, es decir, que a medida que aumenta una, lo hace la otra. Se observó que existe una alta correlación positiva ($p < 0.0001$) de FH con FT y ABTS. Otras correlaciones altamente significativas ($p < 0.0001$) se presentaron en FC y FT con DPPH y FRAP, así como DPPH con FRAP. Estos resultados son similares a lo reportado por López-Martínez *et al.* (2020), quienes encontraron una correlación positiva entre el contenido de FT y la capacidad antioxidante (DPPH) de extractos etanólicos.

Con base en los resultados descritos, se establece que los mejores resultados se obtienen con el tratamiento 9 y el tratamiento 2 (Cuadro 4). Con el análisis de datos y diagramas de Pareto (Fig. 10-13) se elaboró un cuadro que resume el efecto de los parámetros de FMS sobre cada una de las variables de respuesta, y los resultados se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Efecto de los parámetros de FMS de ayocote con el hongo *A. niger* HT4 sobre el contenido de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante.

Parámetro/Variable	FH	FC	FT	ABTS	DPPH	FRAP
Temperatura	-	NS	NS	-	-	-
Humedad	-	NS	NS	-	-	NS
Inóculo	+	NS	NS	NS	NS	+
KH₂PO₄	-	NS	NS	NS	NS	-
MgSO₄	NS	NS	NS	NS	NS	+
NaNO₃	NS	NS	NS	NS	NS	+
KCl	NS	NS	NS	NS	NS	NS

(-) Efecto negativo; (+) efecto positivo; (NS) Sin efecto significativo.

En el cuadro 6 se aprecia que la temperatura, humedad y concentración de KH_2PO_4 mostraron un efecto negativo, por lo cual se recomienda utilizar niveles bajos (-1). Contrario a lo anterior, niveles altos (+1) de concentración de inóculo, NaNO_3 y MgSO_4 favorecen un incremento en las variables de respuesta. La concentración de KCl , a los niveles evaluados, no mostró un efecto significativo sobre alguna de las variables. Con base en este argumento, el tratamiento 2 presenta las condiciones más similares a lo mostrado en el cuadro 4, ya que emplea niveles bajos (-1) para temperatura, humedad y concentración de KH_2PO_4 , y niveles altos (+) para concentración de inóculo y MgSO_4 . Por tal motivo, se seleccionó el tratamiento 2 (Inóculo: 1×10^7 esp/gms; Temperatura: 30 °C; Humedad: 35%; KH_2PO_4 : 1.52 g/L; NaNO_3 : 3.04 g/L; MgSO_4 : 3.04 g/L; KCl : 3.04 g/L). En el cuadro 7 se resume el efecto de la FMS con *A. niger* HT4 sobre el potencial funcional del frijol ayocote.

Cuadro 7. Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante de frijol ayocote sometido a FMS con el hongo *A. niger* HT4 durante 60 h.

Parámetro	Control (Sin fermentar)	Ayocote fermentado
Fenoles Totales	1.39±0.01b	8.65±4.60a
Condensados	1.17±0.12b	8.91±0.21a
Hidrolizables	0.22±0.03a	0.25±0.02a
Actividad antioxidante		
DPPH	0.79±0.01b	1.92±0.11a
ABTS	1.03±0.01b	1.93±0.21a
FRAP	2.76±0.01b	7.87±0.04a

Los resultados representan la media de 3 repeticiones. Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$).

Al comparar ambos tratamientos (cuadro 7), resulta destacable el hecho que la FMS de frijol ayocote permitió incrementar hasta 6.22 veces el contenido de FT, y 7.6 veces el contenido de FT, principales compuestos presentes en el ayocote, con incrementos en la capacidad antioxidante de hasta 2.43, 1.87 y 2.85 veces de acuerdo a los ensayos DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente.

La calidad de la composición fisicoquímica de los productos obtenidos de la FMS puede variar según la naturaleza del alimento, fuente de alimento, método de extracción y los parámetros de almacenamiento, así como también los microorganismos utilizados. Los resultados confirman la mejora en la composición fisicoquímica del frijol ayocote a través del proceso de FMS. Este trabajo

ofrece una alternativa para mejorar el potencial funcional del frijol ayocote, incrementando así los beneficios a la salud del consumidor.

CONCLUSIONES

El frijol ayocote presenta niveles adecuados de carbohidratos y proteína, que pueden ser empleados como fuente de nutrientes para el crecimiento de microorganismos. Adicionalmente, presenta valores adecuados de IAA y PCH para ser usado como soporte en procesos de FMS.

Aspergillus niger HT4 y *A. awamori* fueron capaces de crecer en el frijol ayocote, incrementando el contenido de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante. Sin embargo, los mejores valores se obtienen al emplear la cepa de *A. niger* HT4 a un tiempo de 60 h de cultivo. Los factores que influyen en mayor medida sobre la liberación de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante a partir de FMS de frijol ayocote con *A. niger* HT4 fueron la temperatura y la humedad, ya que ambos parámetros influyeron en todas las variables de respuesta de manera negativa. Las condiciones que favorecen una mayor liberación de compuestos fenólicos con actividad antioxidante fueron: *A. niger* HT4 (1×10^7 esp/gms), 30°C, 60 h, humedad del 35% y una concentración de sales en el medio de (g/L): KH_2PO_4 (1.52), NaNO_3 (3.04), MgSO_4 (3.04) y KCl (3.04).

El proceso de FMS permitió incrementar 7.6 veces el contenido de fenoles condensados, principales compuestos presentes en el ayocote, aumentando hasta 2.85 veces la capacidad antioxidante. El proceso de FMS de frijol ayocote con el hongo *A. niger* HT4 representa una alternativa para potenciar las propiedades funcionales del frijol ayocote, incrementando los beneficios a la salud del consumidor.

PERSPECTIVAS

Este es el primer estudio donde se aborda el proceso de FMS de frijol ayocote. Por lo tanto, queda mucho por explorar para seguir aportando al conocimiento en este tema. Dentro de los estudios a futuro, se sugiere:

- Caracterizar los compuestos presentes en los extractos de ayocote fermentado y sin fermentar mediante técnicas de cromatografía líquida acoplada a masas.
- Evaluar las actividades enzimáticas relacionadas con la liberación de los compuestos durante el proceso de FMS del ayocote.
- Realizar estudios de toxicidad de los compuestos presente en los extractos fermentados de ayocote.
- Preparar una harina a partir del ayocote fermentado y desarrollar alimentos a base de la harina, realizando análisis microbiológico y sensorial.

Capítulo VI

BIBLIOGRAFÍA

- Adebo, OA, & Gabriela Medina-Meza, I. (2020). Impact of Fermentation on the Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Whole Cereal Grains: A Mini Review. *Molecules*, 25(4). <https://doi.org/10.3390/molecules25040927>
- Aguilar-Navarro, B., Camacho-Pozo, M., Serrat-Díaz, C. M de la J., (2014). Proteic Enrichment of Agroindustrial Wastes by Means of the Solid Fermentation with the Filamentous Fungus *Aspergillus niger*. *Revista cubana de química*. XXV (1): 17-25. <https://www.researchgate.net/publication/274084087> Proteic Enrichment of Agroindustrial Wastes by Means of the Solid Fermentation with the Filamentous Fungus *Aspergillus niger*
- Aguilar-Zárate, P., Wong-Paz, J. E., Rodríguez-Duran, L. V., Buenrostro-Figueroa, J., Michel, M., Saucedo-Castañeda, G., Favela-Torres, E., Ascacio-Valdés, J. A., Contreras-Esquivel, J. C., Aguilar, C. N., (2018). On-line monitoring of *Aspergillus niger* GH1 growth in a bioprocess for the production of ellagic acid and ellagitannase by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 247: 412-418. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.115>
- Alvarado-López, A. N., Gómez-Oliván, L. M., Heredia, J. B., Baeza-Jiménez, R., Garcia-Galindo, H. S., & Lopez-Martinez, L. X. (2019). Nutritional and bioactive characteristics of Ayocote bean (*Phaseolus coccineus* L.): An underutilized legume harvested in Mexico. *CyTA - Journal of Food*, 17(1), 199–206. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1571530>
- Álvarez-Parrilla, E.; Rosa, L. A. D. L.; Torres-Rivas, F.; Rodrigo-García, J.; González-Aguilar, G. A. (2005). Complexation of Apple Antioxidants: Chlorogenic Acid, Quercetin and Rutin by β -Cyclodextrin (β -CD). *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*. 53 (1), 121-129. <https://doi.org/10.1007/s10847-005-1620-z>
- Ayala-Garay, O.J., Pichardo-González, J.M., Estrada-Gómez, A., Carrillo-Salazar, J.A., Hernandez-Livera, A. (2006). Rendimiento y calidad de semilla de frijol ayocote en el Valle de México. *Agricultura técnica en México* 32(3): 313-321. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0568-25172006000300007

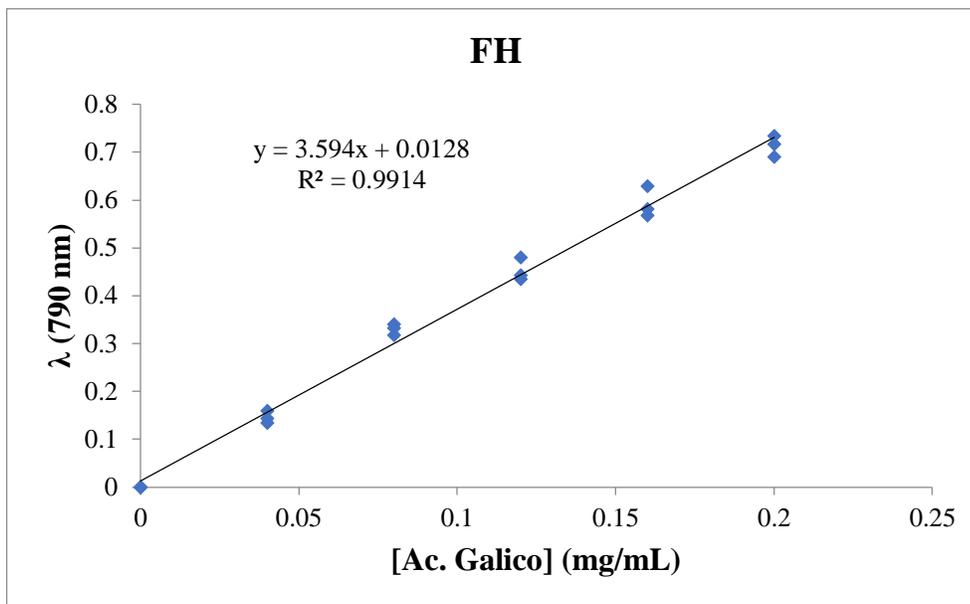
- Buenrostro-Figueroa, J., Ascacio-Valdés, A., Sepúlveda, L., De la Cruz, R., Prado-Barragán, A., Arely., Aguilar-González, M. A., Rodríguez, R., Aguilar, C. N., (2014). Potential use of different agroindustrial by-products as supports for fungal ellagitannase production under solid-state fermentation. *Food and Bioproducts Processing*. 92(4): 376-382. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.08.010>
- Cano y Postigo, L. O., Jacobo-Velásquez, D. A., Guajardo-Flores, D., García-Amezquita, L. E., García-Cayuela, T., (2021). Solid-state fermentation for enhancing the nutraceutical content of agrifood by-products: Recent advances and its industrial feasibility. *Food Bioscience*. 41 (100926): 100926. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100926>
- Capistran-Carabin, A., Aquino-Bolaños, E. N., Garcianunio-Arizona, Y. D., Chavez-Servia, J. L., Vera-Gusmanorte, A. M., Carrillo-Rodríguez, J.C., (2019). Complementariedad en los compuestos fenólicos y las actividades antioxidantes de *Phaseolus coccineus* Tierra P. *vulgaris* L. *Landraces. Alimentos*. 8 (8): 295. <https://doi.org/10.3390/foods8080295>
- Chen, G., Chen, B., & Song, D. (2021). Co-microbiological regulation of phenolic release through solid-state fermentation of corn kernels (*Zea mays* L.) to improve their antioxidant activity. *LWT*. 142: 111003. DOI: [10.1016/j.lwt.2021.111003](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111003)
- Cujilema-Quitio, M. C., León-Revelo, G., Rizo-Porro, M., Taramona-Ruiz, L., Ramos-Sánchez, L. B., (2018). Lipase Production in Solid Fermentation with *Aspergillus niger*: pH influence. *Revista centro azúcar*. 45(4):1-9. <https://www.researchgate.net/publication/328079956> Lipase Production in Solid Fermentation with *Aspergillus niger*- pH Influence
- De la Cruz, R., Ascacio, J. A., Buenrostro, J. J., Sepúlveda, L., Rodríguez, R., Prado-Barragán, A., Contreras, J. C., Aguilera, A., Aguilar. C. N., (2015): Optimization of Ellagitannase Production by *Aspergillus niger* GH1 by Solid-State Fermentation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45(7), 617-631. DOI: [10.1080/10826068.2014.940965](https://doi.org/10.1080/10826068.2014.940965)
- Dongo-Martínez, D., Vizcarra-Llerena, J. D., (2013). Obtención de celulasas y pectinasas a partir de los hongos *Trichoderma sp* y *Aspergillus niger* desarrollados en dos sustratos pectinocelulósicos para extraer el colorante natural de la semilla del achiote (*Bixa Orellana*). Licenciatura. Ingeniero Biotecnólogo. Arequipa, Perú. Pgs.145. <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/handle/UCSM/4304>

- Elizalde, A., Porrilla, Y.P., Chaparro, D.C. (2009). Antinutritional factors in eatable seeds. *Facultad de Ciencias Agropecuarias* 7(1): 45-54. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612009000100007
- Garro, M. S., Rivas, F. P., & Garro, O. A. (2021). Solid State Fermentation in Food Processing: Advances in Reactor Design and Novel Applications. In *Innovative Food Processing Technologies*. pp 165-182. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.23049-7>
- Guzmán-Urriarte, M., Sánchez-Magaña, I., Angulo-Meza, G., Cuevas-Rodríguez, E., Gutiérrez-Dorado, R., Mora-Rochín, S., Milán-Carrillo, J., Valdez-Ortiz, A. and Reyes-Moreno, C. (2013). Solid State Bioconversion for Producing Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Functional Flour with High Antioxidant Activity and Antihypertensive Potential. *Food and Nutrition Sciences*. 4(4): 480-490. <https://www.researchgate.net/publication/236648513>
- Leite, P., Silva, C., Salgado, J. M., & Belo, I. (2019). Simultaneous production of lignocellulolytic enzymes and extraction of antioxidant compounds by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. *Industrial Crops and Products*, 137:315-322. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.044>
- Leonard, W., Zhang, P., Ying, D., Adhikari, B., & Fang, Z. (2021). Fermentation transforms the phenolic profiles and bioactivities of plant-based foods. *Biotechnology Advances*, 49(April), 107763. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107763>
- Lizardi-Jiménez, M. A., & Hernández-Martínez, R. (2017). Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. *3 Biotech*, 7(1), 44.
- López-Báez, L.I., Taboada-Gaytan, O.R., Gil-Muñoz, A., López, P.A., Ortiz-Torres, E., Vargas-Vázquez, Ma. L.P., Diaz-Cervantes, R. (2018). Diversidad Morfológica del frijol Ayocote en el Altiplano Centro-Oriente de Puebla. *Revisión Técnica Mexicana* 41(4A): 487-497. <https://www.redalyc.org/journal/610/61059457001/html/>
- López-Martínez L.X. (2020) Bioactive Compounds of Runner Bean (*Phaseolus coccineus* L.). In: Murthy H.N., Paek K.Y. (eds) Bioactive Compounds in Underutilized Vegetables and Legumes. *Reference Series in Phytochemistry*. Springer pp. 1-17. https://doi.org/10.1007/978-3-030-44578-2_31-1
- Luo Y., Xie W. (2012). Effect of different processing methods on certain antinutritional factors and protein digestibility in green and white faba bean (*Vicia. faba* L.). *CyTA J. Food*. 11: 43–49. <https://doi.org/10.1080/19476337.2012.681705>

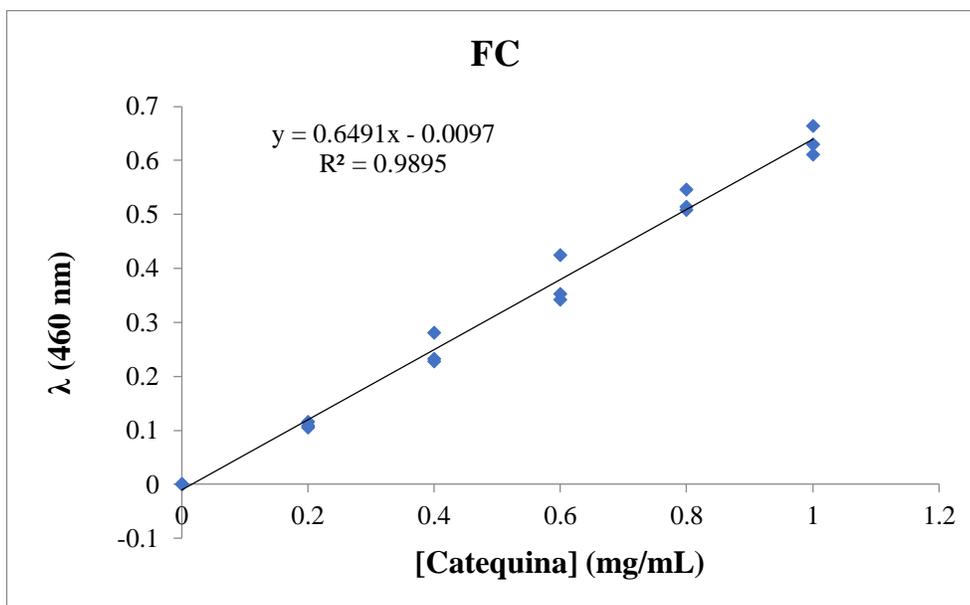
- Meléndez, N. P., Nevárez-Moorillón, V., Rodríguez-Herrera, R., Espinoza, J. C., Aguilar, C. N. (2014). A microassay for quantification of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavening. *Afr J Biochem Res.* 8 (1), 14-18.
- Mojica, L., Chen, K., & de Mejía, E. G. (2015). Impact of commercial precooking of common bean (*Phaseolus vulgaris*) on the generation of peptides, after pepsin-pancreatin hydrolysis, capable to inhibit dipeptidyl peptidase-IV: Bioactive properties of common bean.... *Journal of Food Science*, 80(1), H188-98. DOI: [10.1111/1750-3841.12726](https://doi.org/10.1111/1750-3841.12726)
- Moran-Aguilar, M. G., Costa-Trigo, I., Calderón-Santoyo, M., Domínguez, J. M., & Aguilar-Uscanga, M. G. (2021). Production of cellulases and xylanases in solid-state fermentation by different strains of *Aspergillus niger* using sugarcane bagasse and brewery spent grain. *Biochemical Engineering Journal*. 172(108060) <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108060>
- Urzúa, M. C., Mussatto, S. I., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez, R., De la Garza, H., Teixeira, J. A., Aguilar, N. A., 2009. Exploitation of agroindustrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation. *Ind Crops Prod*, 30(1): 24-27. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.02.001>
- Pastrana, L., (2009). FUNDAMENTOS DE LA FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO Y APLICACION A LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*. 1(3): 4-12.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C.(1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26 (9), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rojas-Victoria, N. J., Escalante-Estrada, J. A. S., Conde-Martínez, F. V., Mejía Contreras, J. A., Díaz-Ruíz, R., (2017). Yield of ayocote bean and maize in an associated agrosystem in function of the number of plants per hill. *Terra Latinoamericana*. 35(3): 219-228. <http://www.scielo.org.mx/pdf/tl/v35n3/2395-8030-tl-35-03-00219.pdf>
- Sánchez-Villa, C.E., Zepeda-Bautista, R., Ramírez-Ortiz, M. E., Corzo-Rios, L.J., (2020). Nixtamalized tortillas supplemented with proteins isolated from *Phaseolus coccineus* and huauzontle (*Chenopodium berlandieri* subsp. *Nuttalliae*) flour: Rheological, textural, and sensorial properties. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. 22:100274. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100274>

- SMATTCOM., (20 de junio del 2021). Panorama de la producción y precio del frijol a nivel nacional e internacional. *Comercio inteligente para el Agro*.
- Srivastava, N.; Srivastava, M.; Ramteke, P. W.; Mishra, P. K. (2019). Chapter 23 - Solid-State Fermentation Strategy for Microbial Metabolites Production: An Overview. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, Gupta, V. K.; Pandey, A., Eds. Elsevier: Amsterdam. 345-354. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63504-4.00023-2>
- Swain, T.; Hillis, W.E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of Science Food Agriculture*. 10: 63–68. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740100110>
- Teniente-Martínez, G., (2019). Caracterización bioquímica y evaluación biológica de los péptidos bioactivos de dos variedades de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.). Tesis de Doctorado. Ciencias en Ingeniería Bioquímica, Tecnológico Nacional de México. Celaya, Gto. 4: pags.87.
- Teniente-Martínez, G., González-Cruz, L., Cariño-Cortes, R., Bernardino-Nicanor, A., (2016). Caracterización de las proteínas del frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos* 1(1): 1-6. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/1/1/1.pdf>
- Torres-León, C.; Chávez-González, M. L.; Hernández-Almanza, A.; Martínez-Medina, G. A.; Ramírez-Guzmán, N.; Londoño-Hernández, L.; Aguilar, C. N., (2021). Recent advances on the microbiological and enzymatic processing for conversion of food wastes to valuable bioproducts. *Current Opinion in Food Science*. 38: 40-45. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.11.002>
- Fay Vásquez, F. M. F., & Zumbado Fernández, H. (2020). Análisis proximal en alimentos Fundamentos teóricos y técnicas experimentales. *Biblioteca Colloquium*. <https://colloquiumbiblioteca.com/index.php/web/article/view/43>
- Yepes-Betancur, D. P., Márquez-Cardozo, C. J., Cadena-Chamorro, E. M., Martínez-Saldarriaga, J., Torres-León, C., Ascacio-Valdes, A., & Aguilar, C. N. (2021). Solid-state fermentation – assisted extraction of bioactive compounds from hass avocado seeds. *Food and Bioproducts Processing*, 126, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.10.012>

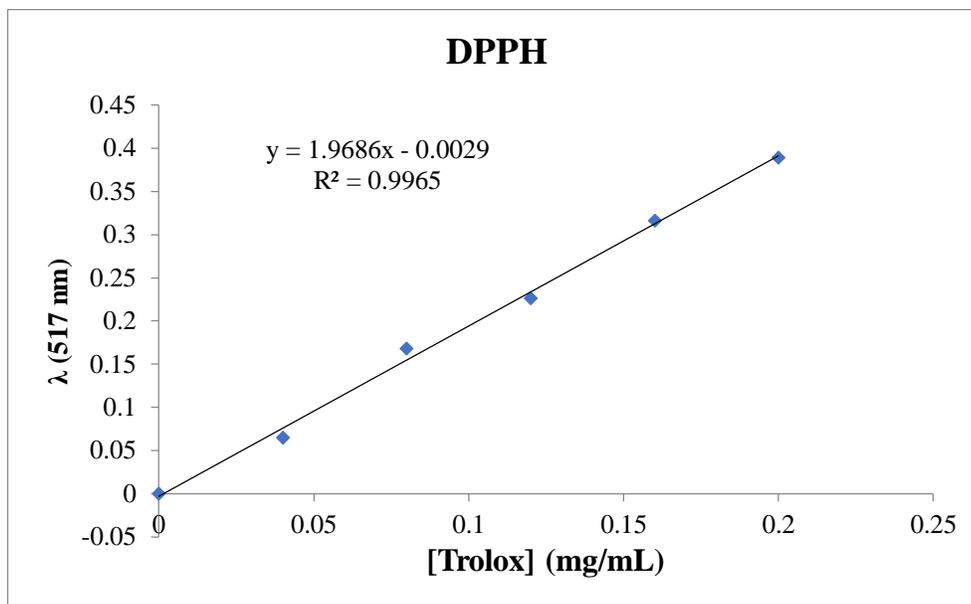
ANEXOS



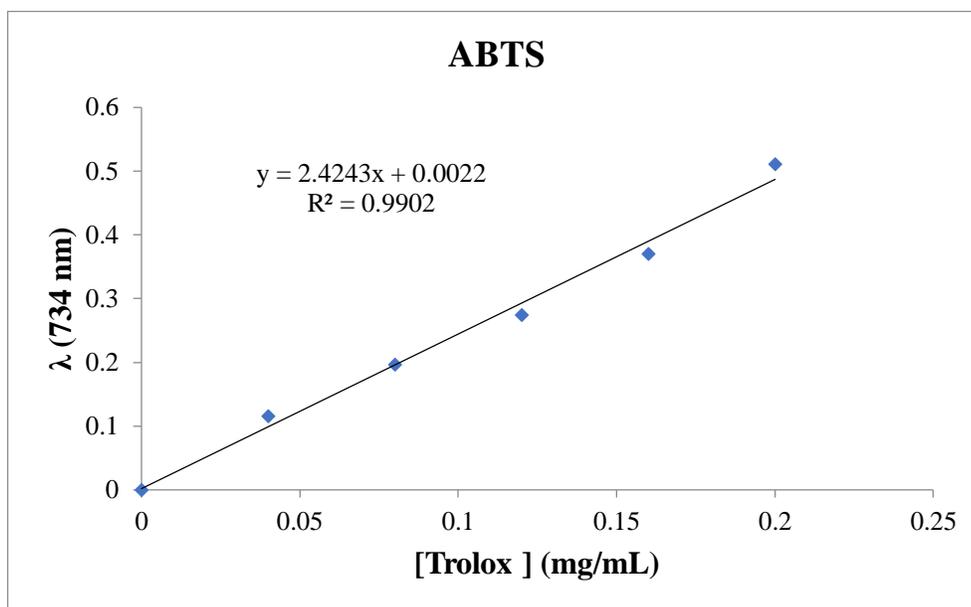
Anexo 1. Curva de calibración para ensayo fenoles hidrolizados.



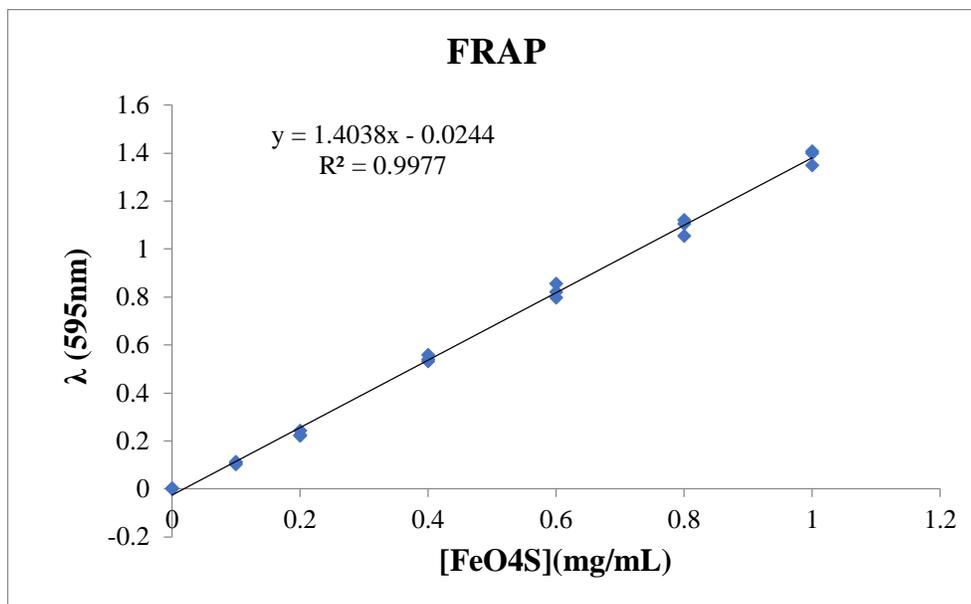
Anexo 2. Curva de calibración para ensayo fenoles condensados.



Anexo 3. Curva de calibración para ensayo DPPH.



Anexo 4. Curva de calibración para ensayo ABTS.



Anexo 5. Curva de calibración para ensayo FRAP.