# FERMENTACIÓN DE GANDUL (*CAJANUS CAJAN*): EFECTO EN LOS AZÚCARES Y AMINOÁCIDOS Y SU POSIBLE USO COMERCIAL

Por

María José Pérez González

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**En**

**CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
Recinto Universitario de Mayagüez
Facultad de Ciencias Agrícolas
2012

Aprobada por

| | |
|---|---|
| _____ | _____ |
| Edna Negrón, Ph.D<br>Presidente del comité graduado | Fecha |
| _____ | _____ |
| Fernando Pérez, Ph.D<br>Miembro del comité graduado | Fecha |
| _____ | _____ |
| María de L. Plaza, Ph.D<br>Miembro del comité graduado | Fecha |
| _____ | _____ |
| Edna Negrón, Ph.D<br>Coordinador del Departamento | Fecha |
| _____ | _____ |
| Carmen Figueroa, Ph.D<br>Representante de Estudios Graduados | Fecha |

Derechos de Autor Reservados ©
María José Pérez González
2012

# ABSTRACT

Three fermentation treatments were used in pigeon pea "Lazaro" variety in order to eliminate α-galactosides, sugars responsible of producing flatulence. The fermented pigeon pea is a high protein alternative that can be used to develop new products. There was a reduction of stachyose and raffinose in all samples after fermentation. The three treatments showed no significant difference between the final values of the sugars raffinose and stachyose. The fermentation that exhibited the greatest decrease in the shortest time was 35° C for 57.7 hours. Fermentation did not affect the amino acid profile of pigeon pea since no significant differences between treatments and control were found.

Pre-gelatinized rice was used as a stabilizing agent for a mixture of pigeon pea and rice. This mixture had a completed amino acid score for a given amount of protein.

# RESUMEN

Tres tratamientos de fermentación fueron llevados a cabo en gandul variedad "Lázaro" con el fin de eliminar α-galactósidos, azúcares responsables de producir flatulencia. El gandul fermentado es una alternativa alta en proteína que puede ser utilizada para el desarrollo productos nuevos. Se encontró una disminución de estaquiosa y rafinosa en las todas las muestras después de la fermentación. Los tres tratamientos no presentaron diferencia significativa entre los valores finales de los azúcares rafinosa y estaquiosa. La fermentación que disminuyó los azúcares en mayor cantidad en el menor tiempo posible fue a 35°C por 57.7 horas. La fermentación no afectó el perfil de aminoácidos del gandul ya que no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos y control.

Se utilizó arroz pre-gelatinizado como estabilizante para una mezcla de gandul y arroz en la cual se completó el punteo de aminoácidos para una cantidad determinada de proteína.

*A Dios por iluminarme y guiarme siempre en mi camino*

*A mis padres y mi hermano que me han brindado su apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida*

*A mi esposo, gracias por tu apoyo, ayuda y comprensión*

*A mis amigos y profesores por los consejos y colaboración*

# AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios por ser mi fuerza y mi guía a lo largo de todas las etapas de mi vida sin su ayuda y sus milagros no habría podido avanzar.

Agradezco a mis padres Carlos Pérez Montúfar y Lisbeth González Scheel por apoyarme y motivarme a ser mejor cada día; por sus consejos y sabiduría les agradezco a ambos, por creer en mí y brindarme un amor incondicional. A mi hermano José André por su apoyo y por siempre creer en mí.

Quiero agradecer a mi esposo Carlos Ortiz, sin tu apoyo, motivación y ayuda los retos que tuve que pasar hubieran sido muy difíciles de llevar.

A mi directora de tesis, la Dra. Edna Negrón, por su asesoría, amistad y consejo, así como la confianza en mí para trabajar y estudiar en el programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Al Doctor Fernando Pérez por su amistad, guía, consejo, paciencia y disponibilidad durante el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. María Plaza por su consejo, amistad y apoyo en la tesis así como en actividades de mejoramiento profesional.

Al Doctor José Dumas por su importante colaboración, guía y enseñanza para los análisis químicos envueltos en esta tesis. Gracias por permitirme entrar a su laboratorio, dejarme utilizar sus equipos y aprender un poco más acerca de la química analítica.

Al profesor Javier Huertas por darme acceso a las facilidades de su laboratorio y sus consejos.

A todo el equipo administrativo de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Gloria, Lani, Jaime, Don Rupert y Lillian quienes me ayudaron durante mi transcurso en el programa y me hicieron sentir en familia.

Al profesor Carlos Rinaldi, por permitirme utilizar las facilidades y equipo de su laboratorio.

Al personal de la Estación Experimental de Isabela, especialmente a Cuco, por su disposición y ayuda para conseguir la materia prima para esta investigación.

A mis amigos de Ciencia y Tecnología de Alimentos y de Puerto Rico, los cuales me dieron la bienvenida, creyeron en mí y me apoyaron en todo momento.

A la Estación Experimental por facilitar fondos para la realización de esta tesis.

# TABLA DE CONTENIDO


*1 INTRODUCCIÓN ..... 1*

1.1 Justificación ..... 1

1.2 Objetivos ..... 4

*2 REVISIÓN DE LITERATURA ..... 5*

2.1 El Gandul ..... 5

2.1.1 Composición del gandul ..... 6

2.1.2 Digestibilidad ..... 9

2.1.3 Factores anti-nutricionales ..... 10

2.1.4 Importancia económica del gandul en Puerto Rico ..... 12

2.2 Harina de Gandul ..... 14

2.2.1 Propiedades funcionales ..... 15

2.3 Fermentación natural ..... 17

2.3.1 Fermentación láctica ..... 17

2.3.2 Fermentación de leguminosas ..... 19

2.4 Suplementos proteicos hechos con gandul ..... 20

2.5 Requerimiento de aminoácidos y proteína en la nutrición humana ..... 24

2.5.1 El punteo de aminoácidos y requerimiento (amino acid score) ..... 25

2.6 Tendencias de alimentos para personas de tercera edad ..... 26

*3 MATERIALES Y MÉTODOS ..... 29*

3.1 Obtención de la materia prima ..... 29

3.2 Preparación de la materia prima ..... 29

3.2.1 Secado y molido del gandul ..... 29

3.2.2 Fermentación natural de la harina ..... 29

3.2.3 Determinación de pH durante la fermentación ..... 30

3.2.4 Pre-gelatinización del arroz ..... 31

3.3 Propiedades de hidratación de la harina de arroz ..... 31

3.4 Análisis de carbohidratos solubles y α-galactósidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ..... 33

3.4.1 Extracción de carbohidratos y preparación de la muestra ..... 33

3.4.2 Preparación de curva de calibración ..... 35

3.4.3 Condiciones de detección en HPLC-RI ..... 35

3.5 Análisis de aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ..... 35

3.5.1 Preparación de curva de calibración usando estándar interno ..... 36

3.5.2 Preparación de la muestra ..... 37

3.5.3 Condiciones de detección en HPLC-fluorescencia ..... 37

3.6 Análisis proximal ..... 38

3.6.1 Determinación de humedad ....38
3.6.2 Determinación de cenizas ....38
3.6.3 Determinación de proteína bruta....39
3.6.4 Determinación de grasa cruda....40
3.6.5 Determinación de carbohidratos ....41
3.6.6 Determinación de fibra cruda ....41
3.7 Análisis estadístico.... 42
***4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .... 43***
4.1 Cambio de pH durante la fermentación .... 43
4.2 Análisis de carbohidratos solubles en gandul fermentado y control .... 46
4.3 Análisis de aminoácidos totales en gandul fermentado y control .... 53
4.4 Análisis de aminoácidos totales en arroz crudo y pre-gelatinizado .... 63
4.5 Análisis proximal de gandul .... 67
4.6 Análisis de fibra cruda para gandul.... 68
4.7 Análisis proximal del arroz.... 68
4.8 Propiedades de hidratación de la harina de arroz.... 69
4.9 Desarrollo de una formulación con aminoácidos esenciales completos según requerimiento diario. .... 71
4.9.1 Proyección del contenido de aminoácidos del arroz pre-gelatinizado ....71
4.9.2 Formulación base....75
***5 CONCLUSIONES.... 81***
***6 RECOMENDACIONES .... 85***
***7 REFERENCIAS.... 86***
***8 APÉNDICES .... 92***
8.1 Obtención de condiciones de fermentación .... 92
8.2 Pruebas preliminares en arroz .... 93
8.3 Ejemplo de cálculo para concentración de estándares de aminoácidos .... 95
8.4 Resultados Estadísticos .... 96
8.5 Curvas de calibración de carbohidratos (método de HPLC).... 112
8.6 Curvas de calibración de aminoácidos- curva con valores pequeños (método de HPLC) .... 114
8.7 Curvas de calibración de aminoácidos- curva con valores grandes (método de HPLC) . .... 120

# LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Variedades de gandul cultivadas en Puerto Rico.....06
Tabla 2. Composición química de la semilla verde y madura (seca) de gandul ….....07
Tabla 3. Perfil de aminoácidos para la semilla de gandul……..….....08
Tabla 4. Factores anti-nutricionales en la semilla de gandul……..….....10
Tabla 5. Análisis de dietas de gandul : cereal……..…….…….....21
Tabla 6. Dietas de gandul : cereal que no han sido completamente exploradas……...…22
Tabla 7. Requerimiento proteico en adultos, personas de la tercera edad y mujeres……25
Tabla 8. Requerimiento de aminoácidos esenciales en adultos y personas de la tercera edad…….…….26
Tabla 9. Condiciones para la optimización de la fermentación natural de harina de gandul.…….30
Tabla 10. Valores de pH durante el tiempo de fermentación en los diferentes tratamientos…….....44
Tabla 11. Carbohidratos solubles en gandul crudo y fermentado……..48
Tabla 12. Perfil de aminoácidos totales en gandul crudo y fermentado variedad Lázaro……....54
Tabla 13. Rango de aminoácidos totales en gandul variedad Lázaro y gandul (Cajanus Cajan) reportado en la literatura……....57
Tabla 14. Perfil de aminoácidos en arroz crudo y pre-gelatinizado…….....……63
Tabla 15. Análisis proximal de gandul crudo y fermentado……..…….....67
Tabla 16. Análisis de fibra cruda en gandul crudo y fermentado…….....68
Tabla 17. Análisis proximal del arroz crudo y pre-gelatinizado…...…….69
Tabla 18. Índice de absorción de agua, solubilidad y poder de hinchamiento de arroz pre-gelatinizado……..…..……..70
Tabla 19. Datos experimentales del arroz crudo y pre-gelatinizado……..72
Tabla 20. Análisis de normalización de aminoácidos de arroz pre-gelatinizado……...…73
Tabla 21. Datos estimados para el perfil de aminoácidos de arroz pre-gelatinizado…….75
Tabla 22. Puntaje de aminoácidos para gandul Lázaro……..……76

Tabla 23. Proporción de gandul y arroz para completar requerimiento de lisina y leucina en mezcla comparada con Ensure .....……...79
Tabla 24. Proporción de gandul y arroz para completar requerimiento de lisina y leucina en 9 gramos de proteína……....80
Tabla 25. Condiciones y resultados de reducción de α-galactósidos en fermentación de lentejas…….……..……92
Tabla 26. Resultados de pruebas preliminares de hidratación para arroz……..……....94

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de rafinosa y estaquiosa, enlaces galactosídicos y enzima responsable de hidrólisis……...…...……...……11
Figura 2. Diagrama de flujo para procedimiento de pre-gelatinización de arroz……..32
Figura 3.Cromatogramas de azúcares solubles. A. Estándares de azúcares; B. Gandul crudo (muestra control) ; 1. estaquiosa; 2. rafinosa; 3. sacarosa; 4. glucosa; 5. galactosa; 6. fructosa.…….……..……...…47
Figura 4. Cromatogramas de azúcares solubles. A. Tratamiento 28°C por 65.4 horas; B.Tratamiento 35°C por 57.7 horas; C. Tratamiento 42°C por 51 horas; 1. estaquiosa; 2. rafinosa; 3. sacarosa; 4. glucosa; 5. galactosa; 6. fructosa…..…49
Figura 5. Cromatogramas de aminoácidos en gandul. A. Estándares de aminoácidos. B. Muestra control de gandul Lázaro”……..……..…59
Figura 6. Cromatograma de aminoácidos en gandul. Tratamiento 28°C por 65.4 horas……...60
Figura 7. Cromatograma de aminoácidos en gandul. Tratamiento 35°C por 57.7 horas……...61
Figura 8. Cromatograma de aminoácidos en gandul. Tratamiento 42°C por 51.0 horas……...62
Figura 9. Punteo de aminoácidos esenciales para mezcla de gandul-arroz……..…....77
Figura 10. Primera dilución de estándar de calibración de aminoácidos…..……...95
Figura 11. Segunda dilución y derivatización de los estándares de aminoácidos…..…...96

# LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Ingreso Bruto Agrícola para el gandul en los años 2005 al 2010 ……12
Gráfica 2. Ingreso Bruto Agrícola por venta de quintal de grano verde de gandul en los años 2005 al 2010…….13
Gráfica 3. Precio del quintal del gandul en grano verde en los años 2005 al 2010…...…13
Gráfica 4. Comportamiento del pH durante la fermentación de harina de gandul en los tres diferentes tratamientos ...……..45
Gráfica 5. Disminución de α-galactósidos en la fermentación de gandul en tres diferentes tratamientos……..……...51
Gráfica 6. Comportamiento de monosacáridos y disacáridos en la fermentación de gandul y control en tres diferentes tratamientos….…….53
Gráfica 7. Perfil de aminoácidos en gandul "Lázaro", control y tratamientos…… .56
Gráfica 8. Perfil de aminoácidos en arroz crudo y pre-gelatinizado…….64
Gráfica 9. Disminución logarítmica de α-galactósidos vs. Tiempo a razón de 221 g/L en lentejas……..93
Gráfica 10. Relación entre el logaritmo del tiempo y temperatura de tratamientos para eliminación de α-galactósidos a razón de 221 g/L en lentejas……..93

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Justificación

El gandul (*Cajanus Cajan*) es una leguminosa que se encuentra en forma de granos, es comestible y cultivada en varias regiones tropicales y subtropicales en el mundo incluyendo los países del Caribe y en algunos países de América Latina. En la India se consume en forma de "dhal" (cotiledones de semilla seca partida sin cubierta) y es utilizado como fuente de proteína en la dieta.

El consumo de esta leguminosa es muy variado y depende de la región o el país en donde se consuma, generalmente se consume la semilla entera o los cotiledones como en el caso de la India. Los productos secundarios de la planta tales como hojas secas, harina remanente del *dahl* o las sobras de las vainas son utilizados como alimento para animales (Singh y Diwakar, 1993). En el área del Caribe es común el consumo de la semilla entera del gandul cocida ya sea acompañada de arroz o en forma de guiso.

Los granos de gandul ya sean maduros, verdes o en forma de "dhal" se caracterizan por su alto contenido de proteína, aproximadamente 18.8%, 21.0% y 24.6%, respectivamente (Singh y Diwakar, 1993). Esta es altamente digerible, especialmente al estar cocida, (Bressani et al., 1986) y por lo tanto su contenido proteico es aprovechado de una manera adecuada por el cuerpo humano. El grano leguminoso del gandul es rico en vitamina B, caroteno, ácido ascórbico (Singh y Diwakar, 1993) y en aminoácidos esenciales tales como lisina y treonina, pero es deficiente en aminoácidos azufrados como metionina y cisteína. Estos últimos son abundantes en los cereales y es por ello que se considera que los gandules pueden contribuir como suplemento proteico para obtener una dieta balanceada o para lograr un consumo proteico completo si se consume con cereales (Singh y Diwakar, 1993; Bressani et al., 1986; Singh et al., 1984).

En América Latina se comercializan mezclas de cereales y leguminosas en polvo para crear "papillas" o cremas que tienen como fin ser un suplemento alimenticio para ayudar a disminuir la desnutrición infantil. Estas mezclas son conocidas como "Alimentos

Complementarios" y están compuestas en su mayoría por harina de soya, harina de maíz, harina de trigo y leche en polvo (Unicef, 2006). Por otra parte, en el mercado estadounidense se ha encontrado una nueva tendencia en cuanto a suplementos alimenticios. Bebidas energizantes o suplementos de un tiempo de comida (*Meal Replacements*) que son productos prácticos, portátiles y de buen sabor y que aportan beneficios a la dieta; productos sin grasa, altos en proteína y fibra, contienen calcio, vitaminas y minerales y son bajos en sodio. Estos están hechos a base de proteína de soya y están dirigidos a un mercado que tendrá un alto crecimiento en los próximos años, el mercado de personas de la tercera edad. El crecimiento de este mercado dará un impulso a la demanda de productos que se ajusten a sus necesidades tales como los suplementos mencionados anteriormente (Hollingsworth, 2003).

El alto contenido proteico del gandul permite compararlo con la proteína de la soya. Estudios comparativos de las propiedades funcionales de ambos granos demostraron que bajo ciertas condiciones el gandul absorbe agua y grasa en proporciones similares a la soya y tiene mejores propiedades emulsificantes. Se ha sugerido el reemplazo o sustitución de la harina de soya por la harina de gandul para imitaciones de carnes y salchichas (Okpala & Mamah, 2001). A pesar de esto aún no existe un alimento complementario en el mercado puertorriqueño que contenga harina de gandul unida a algún tipo de cereal en forma de "papilla" o crema.

En Puerto Rico el gandul está disponible en grano verde y maduro en las plazas de mercado del país y se puede encontrar el grano verde cocido enlatado en los supermercados de conveniencia. Cabe mencionar que dado a que esta leguminosa puede crecer en muchos ambientes se puede encontrar en varias zonas del país y es aprovechado por personas que tienen plantaciones propias. El gandul es cultivado en Puerto Rico y ocupaba el lugar 36 en orden de importancia económica según la distribución del valor de la producción agrícola durante los años 2005/06[1] y 2007/08[2] del Departamento de

[1]Departamento de Agricultura de Puerto Rico, "Ingreso Bruto Agrícola, Año fiscal 2005-2006", Oficina de Estadísticas Agrícolas. San Juan, Puerto Rico. pp.20

Agricultura de Puerto Rico, encontrándose arriba de las habichuelas en vaina y las habichuelas en grano. En el informe actualizado de los años 2008/2009[3] se encuentra ocupando el lugar 35 en orden de importancia. Se ha observado un aumento en la Tasa de Crecimiento de la Producción Agrícola para el gandul a partir del período 2006/07 al período 2007/08 de 0.0892% por cada quintal/grano[4] y este cultivo representó un ingreso bruto de $1,034,000.00 para el período 2007/08 y un ingreso de $1,072,000.00 para el período 2008/09.

En Puerto Rico hay interés en dar un impulso a la producción de gandules y la cosecha del mismo recibió un incentivo de $10,280.00 para el período 2004/05 y para el período 2005/06 tuvo un subsidio preliminar de $5,280.00[5] por parte del Estado. En vista de darle valor agregado a este cultivo se busca desarrollar nuevos productos o procesos que hagan atractivo el mismo hacia el consumidor.

Es por ello que esta investigación propone desarrollar la formulación de un producto que contenga harina de gandul y cuya mezcla de ingredientes pueda proporcionar un suplemento proteico completo, esto con el fin de darle un valor agregado a esta leguminosa e impulsar el consumo de la misma. Con el desarrollo de nuevos productos que contengan gandul se diversificará el mercado impulsando la demanda. A la vez, se está ofreciendo otra alternativa de suplemento alimenticio para satisfacer las necesidades proteicas de la dieta diaria.

---

[2] Departamento de Agricultura de Puerto Rico, "Distribución del Valor de la Producción Agrícola 2007/2008 en Orden de Importancia Económica", Oficina de Estadísticas Agrícolas. San Juan, Puerto Rico.
[3]Departamento de Agricultura de Puerto Rico, , "Ingreso Bruto Agrícola, Año fiscal 2008-2009" Oficina de Estadísticas Agrícolas. San Juan, Puerto Rico. pp.16.
[4] Departamento de Agricultura de Puerto Rico, "Tasa de Crecimiento De la Producción Agrícola y la Tasa de Precio Agregado, período 2007/08 Vs 2006/07", Oficina de Estadísticas Agrícolas. San Juan, Puerto Rico.
[5] Departamento de Agricultura de Puerto Rico, "Subsidios e Incentivos (En Orden de Aportación para el año Fiscal 2006". Ingreso Bruto Agrícola, Año Fiscal 2005-2006. San Juan, Puerto Rico. pp 12.

## 1.2 Objetivos

El objetivo principal de este estudio es determinar los efectos de la fermentación del gandul en los aminoácidos y azúcares y poder proveer una opción de producto con valor nutritivo hecho a base de gandul fermentado.

Objetivos específicos:

1. Determinar la temperatura y tiempo adecuado para la fermentación de gandul que elimine la mayor cantidad oligosacáridos.

2. Determinar la cantidad de galactósidos y carbohidratos por HPLC.

3. Determinar el perfil de aminoácidos para verificar si la fermentación tuvo algún efecto sobre alguno de los tratamientos.

4. Llevar a cabo un análisis proximal a los tratamientos y el control para determinar diferencia.

5. Hacer un balance de aminoácidos para encontrar un producto base adecuado que cumpla con un punteo de aminoácidos alto y una proteína completa.

# 2 REVISIÓN DE LITERATURA

## 2.1 El Gandul

El gandul es una leguminosa de grano tropical de ciclo de vida perenne o anual, dependiendo de la variedad. Este es considerado como una de las ocho leguminosas más cultivadas en el mundo. Es capaz de crecer bajo condiciones climáticas drásticas como suelos secos y climas variantes. Esto lo convierte en una opción de cosecha perfecta para aéreas semiáridas como ciertas regiones de África y la India (Achieng, 2007). Las condiciones que favorecen la alta productividad son luminosidad de aproximadamente 12 horas al día, temperaturas medias frescas entre (18°C - 30°C) y alta humedad ambiental (80% – 90%), condiciones favorables que se encuentran entre la variedad de ecosistemas presentes en el Caribe (Cedano, 2006).

Estudios demuestran que la maduración del 50% de las flores de la planta de gandul tarda entre 97 a 260 días y de cada racimo de flores maduran entre 1 a 5 vainas. Las semillas maduran aproximadamente 40 días después de la polinización. Las vainas pueden encontrarse en color verde, marrón o violeta oscuro; miden aproximadamente 8 cm de largo, 1.4 cm de ancho, con forma oblonga y tienen de 2 a 9 semillas (Alemañy, 2001).

La forma de consumo del gandul es muy variada. En el área del Caribe se pueden encontrar en semilla verde y semilla madura, Sin embargo, en la India se consume también en forma de *dhal* que es la semilla descascarillada y partida la cual es consumida como puré. En Puerto Rico es consumida mayormente como semilla seca y enlatada, este proceso ha sido desarrollado en este país desde 1928. Para esta técnica se utilizan semillas verdes las cuales son escaldadas al vapor por 90 segundos para inactivar las peroxidasas, después éstas son descascaradas mecánicamente, procesadas y enlatadas en agua con sal. Las semillas maduras y secas son enlatadas después del pre-remojo. (Morton et al., 1982).

Durante los meses de diciembre a marzo los gandules frescos abundan en Puerto Rico. Investigadores coinciden que ésta presentación del producto es la preferida por los consumidores de este país por sus atributos de color y sabor (Alemañy, 2001 y Bressani, 1986). Un estudio realizado por Alemañy (2001) en Puerto Rico encontró que el gandul fresco desgranado a mano tiene una vida útil de aproximadamente 10-12 días bajo refrigeración.

Los gandules son leguminosas cuyo crecimiento es muy sensible a la cantidad de luz que reciben durante el mismo. Es por ello que son plantas fotosensibles. Los gandules que reciben poco tiempo de luz solar se dividen en dos genotipos, los determinados y no determinados. Los determinados se caracterizan por el crecimiento de las vainas en el extremo de la rama hasta que alcanzan una altura determinada. En cambio aquellas plantas cuyas vainas crecen a lo largo de la misma son conocidas como genotipos no determinantes. Entre las variedades que se cultivan en Puerto Rico se encuentran las sensitivas (poco tiempo de luz) y las no sensitivas. La siguiente tabla resume las variedades cultivadas en Puerto Rico (Deza, 2006).

**Tabla 1.** Variedades de gandul cultivadas en Puerto Rico (Deza, 2006)

| **Sensitivas** | | **No Sensitivas** |
|---|---|---|
| **Determinantes** | **No Determinantes** | **Determinantes** |
| Cortada | 16-1 | I-8-3-1 (Lázaro) |
| PR- 147 | Pinto | I-8-2 |
| 2-B-bushy | Kaki | II-5-6 |
| Line 84 | Blanco de Yauco | I-13 |
| | Guerrero | I-58-3 |

### 2.1.1 Composición del gandul

Varios autores han realizado estudios sobre la composición química de la semilla de gandul, los porcentajes pueden presentar una pequeña variación, sin embargo se encuentran muy cercanos uno del otro. A continuación se presenta la composición de la semilla de gandul:

**Tabla 2.** Composición química de la semilla verde y madura (seca) de gandul (USDA, 2011)

| | USDA | |
|---|---|---|
| Composición | Semilla de Gandul verde B.H. | Semilla de Gandul Madura B.H. (seca) |
| Humedad | 65.88% | 10.59% |
| Proteína cruda | 7.20% | 21.70% |
| Grasa | 1.64% | 1.49% |
| Cenizas | 1.40% | 3.44% |
| Carbohidratos | 23.88% | 62.78% |
| Fibra cruda | 5.1% | 15.0% |

B.H.=base húmeda

Entre las razones más importantes para el cultivo del gandul está su alto contenido proteico. Sin embargo se debe hacer hincapié que la cantidad de proteína presente depende del estado de maduración y la variedad de gandul. En un estudio realizado para determinar la calidad nutricional de la proteína del gandul verde y maduro se encontraron varias diferencias importantes concernientes a la cantidad de aminoácidos azufrados presentes. Se tomó como referencia el patrón de aminoácidos de la FAO/OMS para comparar contra el perfil de aminoácidos calculado experimentalmente. Se encontró que el gandul es deficiente en aminoácidos azufrados como Metionina, encontrándose en una concentración de 0.092 g/g N para el estado verde y 0.055 g/g N para el grano maduro (Bressani, 1986). Las semillas verdes contienen mayor proporción de aminoácidos tales como metionina, cisteína, triptófano, treonina, leucina e isoleucina (Singh et al.,1984). Sin embargo, en el mismo estudio se pudo constatar que el gandul cuenta con un contenido alto de lisina (Bressani, 1986). Es por ello que al ser suplementado el gandul con cereal tradicional se puede aportar una dieta proteica balanceada. (Achieng, 2007)

A continuación se presenta una tabla resumen con las proporciones de perfil de aminoácido esenciales encontrado por algunos investigadores. Cabe mencionar que se adiciona la histidina pues se considera como esencial en la etapa de infancia, se ha demostrado que dietas bajas en este aminoácido demuestran una baja en la hemoglobina (WHO/FAO/ONU, 2002). Los requerimientos de metionina pueden ser sustituidos por cisteína en su mayor parte y los de fenilalanina por tirosina y viceversa. (Martínez, 2006).

**Tabla 3.** Perfil de aminoácidos para la semilla de gandul

| **Aminoácido** | **Autores (g/100g proteína)** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Bressani et *al*. 1986 | | Singh et *al*. 1984 | | USDA, 2011 | Martínez Villaluenga, 2010 |
| | semilla verde | semilla madura | semilla verde ICPL-128 | semilla verde ICP 6997 | Semilla madura | Semilla Cruda |
| Serina | 2.85 | 3.84 | 4.97 | 4.53 | 4.74 | 5.45 |
| Glicina | 3.1 | 3.02 | 3.89 | 4.04 | 3.70 | 4.19 |
| Histidina | 3.04 | 3.36 | 4.22 | 5.31 | 3.57 | 3.14 |
| Arginina | 4.61 | 5.01 | 6.71 | 7.73 | 5.99 | 5.76 |
| Treonina | 3.1 | 3.3 | 3.94 | 4.01 | 3.53 | 5.41 |
| Alanina | 3.94 | 3.58 | 5.46 | 5.20 | 4.48 | 4.38 |
| Prolina | 4.16 | 6.00 | 4.13 | 5.06 | 4.40 | 5.82 |
| Cisteína | --- | --- | 0.99 | 1.12 | 1.15 | 0.99 |
| Tirosina | 2.05 | 2.34 | 2.48 | 3.62 | 2.48 | 2.4 |
| Valina | 4.93 | 3.92 | 4.65 | 5.62 | 4.32 | 3.90 |
| Metionina | 1.47 | 0.88 | 1.42 | 1.65 | 1.12 | 1.19 |
| Lisina | 4.7 | 5.44 | 6.37 | 6.53 | 7.01 | 7.2 |
| Isoleucina | 5.26 | 5.2 | 4.24 | 5.32 | 3.62 | 3.24 |
| Leucina | 6.46 | 5.95 | 7.48 | 9.15 | 7.14 | 6.20 |
| Fenilalanina | 5.98 | 6.51 | 5.64 | 7.11 | 8.56 | 6.69 |

En otro estudio que compara la composición nutricional de la semilla de gandul verde contra la composición de la semilla madura se demuestra que ésta última presenta un porcentaje de cáscara menor, la fibra dietética se disminuyó con la maduración, aumentó el contenido de almidón y se redujo la digestibilidad de almidón. Sin embargo aumentaron los inhibidores de amilasa. La madurez fisiológica es el estado en donde se

presenta la mayor acumulación de materia seca durante el desarrollo de la semilla. La semilla madura presenta valores de materia seca entre 117.0 a 190.8 mg/semilla. Para la semilla verde se presentan valores menores, entre 75.3 a 120.6mg/semilla (Singh et al.,1984).

El gandul aporta minerales como calcio, zinc, magnesio, azufre y potasio, así como vitaminas A y C (Mueses, 1993ª, Torres et al., 2006).

### 2.1.2 Digestibilidad

Otros factores determinantes de la calidad de la proteína, a parte del contenido de aminoácidos esenciales, son su "digestibilidad" y la capacidad que tiene toda la proteína de impulsar el peso corporal de un animal de experimentación (Coeficiente de Eficacia Proteíca, PER, por sus siglas en inglés) y, por consiguiente, el ser humano (Martínez, 2006)

El cociente de digestibilidad medido por diferencia de peso en las eses de animales, para la proteína cruda del gandul seco a 100°C es 71.5% a 88% (Morton et al., 1982). Otra investigación informa una digestibilidad de la semilla cruda de gandul como 69.40%, mientras que para el gandul tostado aumentó a 80.64% (Nwokolo, 1987). Lo que demuestra que es necesario un tratamiento térmico al gandul para aumentar la digestibilidad de la proteína. Sin embargo éste debe estar bajo control para evitar la desnaturalización de la misma. Este efecto fue observado por Braham y colaboradores (1965) al realizar pruebas del efecto del tiempo de cocción sobre el valor nutricional de la harina de gandul. El aumento de peso fue aumentando hasta el tratamiento térmico por 30 minutos, sin embargo el índice de utilización proteica comenzó a disminuir en este tiempo de cocción. El valor más alto de índice de utilización proteica, PER, fue a los 20 minutos de cocción.

### 2.1.3 Factores anti-nutricionales

La tripsina es una enzima peptidasa, producida en el páncreas y secretada en el intestino, específicamente en el duodeno. Esta enzima es esencial para la digestión pues rompe los enlaces de las proteínas mediante hidrólisis y así puede formar aminoácidos de menor tamaño. Las leguminosas como el gandul tienen inhibidores de enzimas digestivas como la tripsina y esto provoca un menor aprovechamiento de los aminoácidos y una disminución en el valor nutricional de las semillas que no han sido procesadas o expuestas a un tratamiento térmico (Dávila et al., 2003). Las semillas de gandul contienen inhibidores de tripsina, quimotripsina y amilasas, además de contener taninos, los cuales son conocidos como un problema común en la mayoría de las legumbres. Son menos problemáticos en el gandul que en la semilla de soya, alverjas y frijoles (Achieng, 2007).

La actividad de inhibición de tripsina para las semillas maduras es significativamente más alta que para la semilla verde, lo cual puede deberse a la acumulación de inhibidores de tripsina. A continuación se presenta una tabla resumen del estudio realizado sobre los factores anti-nutricionales presentes en la semilla de gandul (Singh et al.,1984).

**Tabla 4.** Factores anti-nutricionales en la semilla de gandul (Singh et al.,1984).

| Constituyente | Etapa de Madurez | Promedio |
|---|---|---|
| Inhibidor de Tripsina (UTI/mg semilla) | Verde | 2.80 |
| | Maduro | 9.88 |
| Inhibidor de Quimotripsina (UTI/mg semilla) | Verde | 2.55 |
| | Maduro | 2.96 |
| Polifenoles (mg/g) | Verde | 8.62 |
| | Maduro | 10.6 |

**Oligosacáridos, α-galactósidos**

Entre los factores antinutricionales presentes en las leguminosas se mencionan los α-galactósidos. Estos son oligosacáridos presentes en las semillas de leguminosa como el gandul, los cuales producen flatulencia al ser consumidos. Esto se deriva de la ausencia

de la enzima α-galactosidasa la cual es necesaria para la hidrólisis del enlace α-1,6 galactósidico durante su paso por el intestino. Lo último provoca que las bacterias presentes en el intestino lleven a cabo una fermentación anaeróbica la cual tiene como resultado la producción de dióxido de carbono, hidrógeno y cantidades pequeñas de metano los cuales son percibidos como flatulencia (Oboh et al., 2000). Estos factores evitan el aprovechamiento o disminuyen el consumo de este tipo de alimentos los cuales son de bajo costo y alto nivel proteico.

En la Figura 1 se presenta la estructura química de oligosacáridos como rafinosa y estaquiosa, el enlace α-1,6 galactósidico y la enzima responsable de la hidrólisis (LeBlanc et al., 2004).

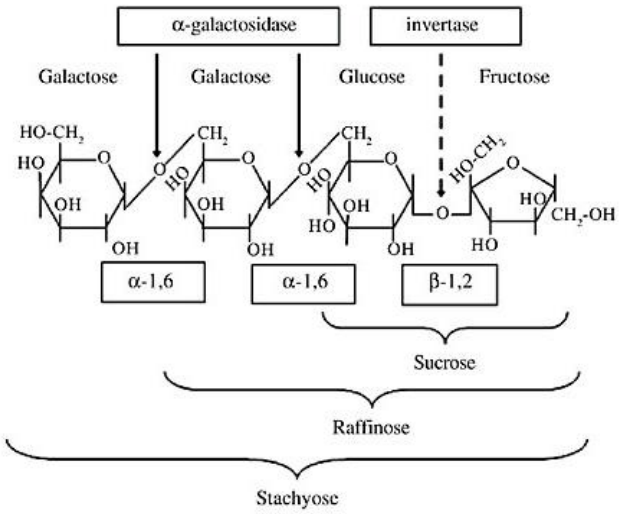


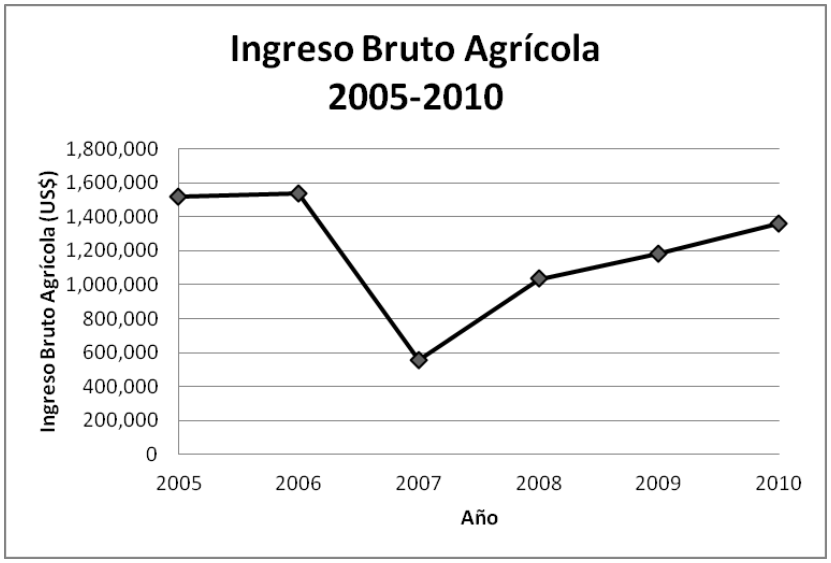

**Figura 1.** Estructura de rafinosa y estaquiosa, enlaces galactosídicos y enzima responsable de hidrólisis. (LeBlanc *et al*. 2004)

Se reporta que la rafinosa y estaquiosa se encuentran presentes en pequeñas cantidades en las semillas verdes de gandul mientras que se encuentran en grandes cantidades en las semillas maduras. Otro oligosacarido, verbascosa, no fue detectado en la semilla verde pero fue predominante en la semilla madura. Rafinosa se encuentra entre 0.30% a 1.80% en semillas verdes y mientras que estaquiosa se encuentra en un rango de 0.27% a 2.35% en semillas verdes y entre 12.29% y 19.40% en las semillas maduras (Singh et al.,1984).

La técnica de germinación puede ayudar a disminuir la cantidad de oligosacáridos presentes. Así lo reporta Torres (2007), en donde obtuvo una disminución del 79, 81 y 87% en los niveles de los oligosacáridos rafinosa, estaquiosa y verbacosa, respectivamente, al realizar la germinación a las semillas de gandul. Otras técnicas utilizadas son el remojo de la semilla, cocimiento y descascarado de la misma (Oboh et al., 2000).

### 2.1.4 Importancia económica del gandul en Puerto Rico

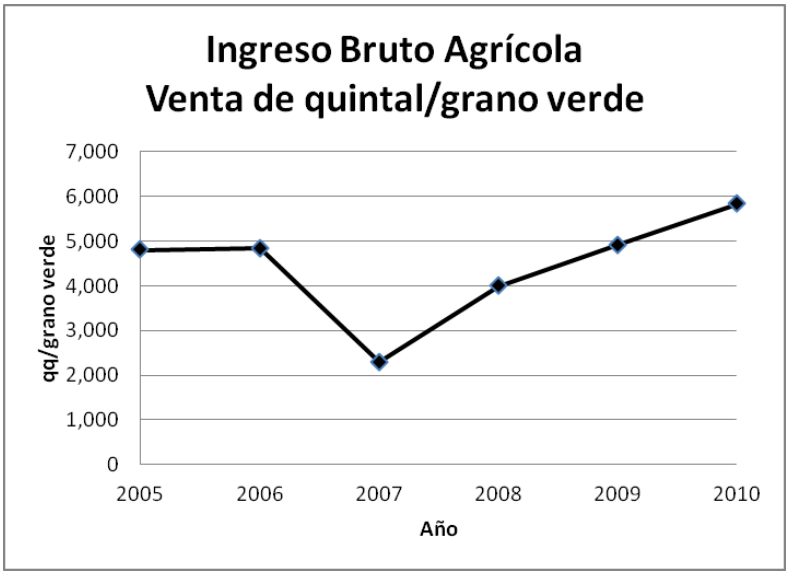
El gandul es una leguminosa de gran valor en Puerto Rico, por su alto consumo y el lugar que ocupa en orden de importancia económica según El Departamento de Agricultura de Puerto Rico. El gandul ha aumentado su valor económico desde el año 2006 donde se encontraba en el puesto #36, hasta alcanzar el puesto #32 en año 2010. Este cultivo es producido mayormente por agricultores pequeños, localizados en Isabela, Coamo, Villalba, Santa Isabel y Yauco (Olave, 1981).




**Gráfica 1.** Ingreso Bruto Agrícola para el gandul en los años 2005 al 2010

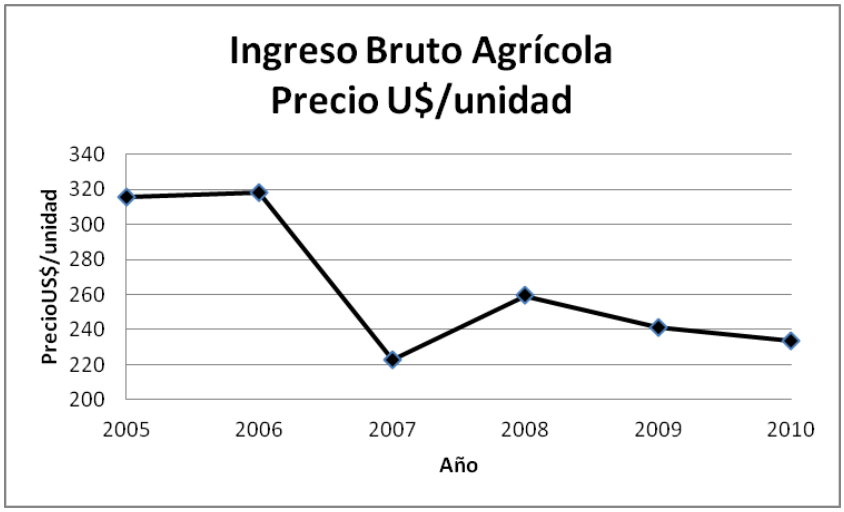
Como se observa en el Gráfica 1, el gandul ha sufrido fluctuaciones en el ingreso bruto agrícola, sin embargo desde el año 2007 ha tenido un comportamiento de aumento en el ingreso, lo que demuestra que es un cultivo que puede recuperarse económicamente

si encuentra apoyo del gobierno. En el 2010 el gandul se vendió a $233.73 el quintal y se reportó una venta total de 5,825 quintales, lo que trajo un ingreso de $1,361,000.00. La venta de quintales también ha ido en aumento desde el año 2007 (Gráfica 2).




**Gráfica 2.** Ingreso Bruto Agrícola por venta de quintal de grano verde de gandul en los años 2005 al 2010

En la Gráfica 2 se observa que la venta de quintal de grano verde de gandul ha ido en aumento desde el año 2007 y ha sobrepasado la venta de los años 2005 y 2006. La razón por la cual el ingreso bruto agrícola no ha aumentado al punto de alcanzar los valores reportados en dichos años, es porque el precio por quintal ha disminuido con el paso de los años también (Gráfica 3).




**Gráfica 3.** Precio del quintal del gandul en grano verde en los años 2005 al 2010

A pesar de la baja en los precios, la demanda sigue aumentando. Este detalle debe ser tomado en cuenta para poder darle un impulso a este cultivo mediante incentivos de gobierno al pequeño agricultor. Según Saladín (1989) la importancia del gandul radica en que contribuye a aminorar el déficit de habichuela roja, es fuente de empleo en el área rural, es un cultivo desarrollista y fortalecedor del subsector agroindustrial. Actualmente, parte del gandul que se consume en Puerto Rico proviene de mercados internacionales como Republica Dominicana y Ecuador.

## 2.2 Harina de Gandul

Una forma de aprovechamiento del gandul es transformándolo en harina para que pueda ser utilizado en combinación con otros productos y así complementar su proteína. El suplemento de cereales con proteína de legumbres es considerada como una de las mejores soluciones para la desnutrición proteico-calórica en el mundo en desarrollo. La harina de gandul ha sido analizada y ha demostrado ser conveniente como fuente de proteína para suplementar productos horneados como pan y galletas debido a su alto nivel de proteína y hierro. Es por ello que ha sido recomendada en programas de alimentación de escuelas en Africa y para secciones vulnerables de la población de naciones en desarrollo (Achieng, 2007).

La harina de gandul ha sido recomendada como un componente excelente para la industria del “snack” y ha sido recomendada como ingrediente para aumentar el valor nutricional de la pasta sin afectar sus propiedades sensoriales (Torres, 2007; Achieng 2007)

A través del tiempo varios autores ha realizado estudios sobre la composición de la harina de gandul. La composición de la harina de gandul difiere de la semilla entera en la proporción de humedad lo que hace que los carbohidratos ocupen la mayor proporción en total. Esta diferencia se debe al tratamiento al cual fue sometido el gandul y es por ello que se encuentran proporciones desde 4.36% a 13.10% de humedad. Esto se debe tomar en cuenta para la realización de productos secos pues la humedad no puede ser muy alta. Se ha encontrado que el contenido proteico sigue estando entre 18.92% a 22.30%, la

grasa o extracto etéreo se encontró entre 1.50% a 2.60% y el porcentaje de cenizas varió entre 3.20% a 5.50% (Braham, 1965; Bressani et al., 1986; Mueses et al.,,1993a; Okpala, 2001)

### 2.2.1 Propiedades funcionales

Las propiedades funcionales son aspectos químicos, físicos y sensoriales del alimento que definen el comportamiento del alimento durante el procesamiento. Entre las propiedades funcionales importantes para la reconstitución de una harina se encuentran:

- Absorción de agua
- Índice de solubilidad en agua
- Absorción de grasas
- Emulsificación de aceites

La absorción de agua de la harina depende del tratamiento al cual se someta previamente el gandul para ser secado. Okpala (2001) llevó a cabo dos tratamientos: el primero fue sumergir la semilla previo a ser secada por 6 horas, el segundo fue sumergirla por las mismas 6 horas y después escaldarla. Se obtuvo una absorción de 130% en aquellas que fueron sumergidas en agua solamente mientras que las que fueron escaldadas tuvieron un rango de 215%, este valor fue mayor que el obtenido para la semilla de soya. Los tratamientos de calor durante el escaldado mejoraron la capacidad de absorción de agua y la absorción de grasa para la harina de gandul.

Previamente a este estudio, Singh y Kulshrestha (1987) siguieron el mismo fundamento de sumergir las semillas de 6 a 9 horas pero en este caso en un rango de temperatura de 35°C a 80°C para determinar la cinética de absorción de agua. Se encontró que mientras más tiempo la semilla es sumergida más aumentaba la pérdida de sólidos solubles. Se determinó que la cinética de absorción de agua se ve afectada por la temperatura.

Onweluzo y Nwabugwu (2009) llevaron a cabo un estudio en el cual se compararon diferentes dietas de gandul con mijo y cuyos resultados fueron comparados contra un suplemento proteínico comercial llamado "Cerelac" y contra un control de caseína. Se obtuvo que no importando que tratamiento se le diera a las harinas de la mezcla gandul: mijo, ésta tendría mayor absorción de agua que la muestra comercial antes mencionado, por lo tanto, una viscosidad menor.

En otro estudio se aplicaron tres tratamientos de secado y se estudió como estos afectaban el índice de absorción de agua y el índice de solubilidad en agua. Se encontró que la harina de gandul descascarada y cruda tuvo un índice de absorción de agua de 1.43 (ml abs/g materia seca), teniendo esto en cuenta se encontró que el tratamiento de secado por rodos tuvo el mayor índice de absorción de agua, 4.84 ml abs/g materia seca (Mueses et al., 1993a).

El índice de solubilidad de agua para la harina de gandul cruda fue de 27.89%. El tratamiento que presentó el mayor porcentaje de solubilidad en agua fue el de cocción-extrusión en donde los valores se distribuyen de 32.54% a 36.57% dependiendo de la temperatura y la humedad al que fue sometido. El menor porcentaje de solubilidad fue obtenido en el tratamiento de cocción a presión en donde se presentan valores entre 16.09% a 16.94% dependiendo del tiempo de cocción (Mueses et al., 1993ª).

Los índices de absorción de grasa son de 125% y 40.5%, respectivamente, para la harina de gandul cruda y la harina de gandul sumergida en agua. La absorción de grasa en la harina se ve favorecida al sumergir el gandul previamente en agua por 6 horas. Las propiedades de emulsión de la harina de gandul que se encontraron para dos tratamientos en donde se sumergía el gandul en agua estaban entre 39% y 41.5%. Estas propiedades juegan un papel importante en muchos sistemas alimenticios donde las proteínas tienen la habilidad de enlazar grasa; como en productos cárnicos, salsas para ensaladas y masas para pan. Todas las harinas de gandul mostraron mejores propiedades de emulsión que las harinas de soya (Okpala, 2001).

## 2.3 Fermentación natural

La fermentación se puede definir como la modificación bioquímica de macromoléculas presentes en los alimentos traída por la acción de microorganismos y sus enzimas. La fermentación ha sido utilizada como medio para preparar y preservar la comida, especialmente en ambientes en donde no se cuenta con acceso a almacenamiento frío (Motarjemi y Nout, 1996). Existen varios tipos de fermentaciones, entre ellas la fermentación natural, la cual puede llevarse por fermentación ácido láctica. Este tipo de fermentación se da con la ayuda de la flora microbiana natural del alimento, la cual se encuentra allí por asociación ecológica o por el ambiente que rodea el alimento cuando se encuentra en el campo. Si un alimento se deja fermentar sin previo calentamiento, la mayoría de estos microorganismos puede multiplicarse. En este caso, la mayoría puede ser de origen láctico. Sin embargo, las oportunidades que tienen serán restringidas por su habilidad de crecer y competir en el alimento y por las condiciones externas. Los inconvenientes de la fermentación natural son que esto toma un largo tiempo para completarse y que el resultado puede ser una sorpresa si no se controlan factores envueltos en la inocuidad de alimentos (Adams et al., 2001).

### 2.3.1 Fermentación láctica

La fermentación ácido láctica es un proceso natural llevado a cabo por bacterias ácido lácticas (LAB en sus siglas en inglés) que se encuentran naturalmente presente en los alimentos. Un ejemplo de esta fermentación es cuando se sumergen semillas de leguminosas en agua durante un período prolongado de tiempo dando paso al crecimiento de microorganismos naturales en la semilla, los cuales en su mayoría son LAB (Motarjemi y Nout, 1996).

Las bacterias ácido lácticas (LAB) son un grupo de bacterias gram positivo, no formadoras de esporas, anaeróbicos fermentativos que son usualmente intolerantes al oxígeno. Ellas producen la mayoría de su energía celular como resultado de la fermentación de azúcares, ya sea homo-fermentativo o hetero-fermentativo. Una variedad de factores antimicrobianos producidos por bacterias ácido lácticas han sido definidos,

entre los cuales se encuentra la utilización de vías fermentativas para generar energía celular y el hecho que esto lleva a una producción inevitable de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico. Con esto se da una disminución en el pH. Los niveles de acidez en algunas fermentaciones pueden exceder 100mM, reduciendo el pH a menos de 4.0 (Adams et al., 2001). Se ha demostrado que la fermentación ácido láctica inhibe la supervivencia y multiplicación de bacterias patógenas. Una fermentación ácido láctica exitosa dará un pH final de 4.0 o menos (Motarjemi y Nout, 1996). Los principales componentes responsables en la inhibición de microorganismos resultado de las condiciones ácidas producidas durante la fermentación son el pH, el grado de disociación del ácido y la toxicidad inherente del anión del ácido en la membrana celular de los microorganismos (Adams et al., 2001).

Estudios recientes sugieren que el grupo de bacterias ácido lácticas (LAB) incluyen las siguientes: *Streptococcus sensu stricto*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus* and *Weissella,* entre otros (Stiles and Holzapfel, 1997) .

En el caso del gandul se ha encontrado que la flora microbiana que protagoniza la fermentación natural son LAB (Nout et al., 1989). Un estudio realizado demostró que durante la fermentación natural del gandul por 24 horas a 30°C se pudo separar un inóculo de bacterias lácticas, las cuales fueron inoculadas en una mezcla de gandul y sorgo junto con bacterias patogénicas como *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*. Se demostró que al cabo de 24 horas a pH menores de 4.0 la presencia de S. *typhimurium* era imperceptible y *S. aureus* se encontraba en cantidades menores a 2.4 log. La reducción de pH trajo consigo un efecto antimicrobiano debido a la presencia de ácido láctico y ácido acético (Nout et al., 1989).

### 2.3.2 Fermentación de leguminosas

La fermentación natural de la semilla previa al secado es un método investigado para eliminar factores anti-nutricionales, remover α-galactósidos y mejorar la digestibilidad de la proteína. Onweluzo y Nwabugwu (2009) observaron que la fermentación de la semilla puede traer consigo una disminución en el contenido de proteína cruda comparada con un control de caseína. Sin embargo, se observó que la fermentación ayuda a disminuir el contenido de grasa cruda. Torres et al., (2006) realizó un estudio similar en donde demostró que la fermentación de la semilla induce una reducción drástica en las α-galactósidos: rafinosa (89%), estaquiosa (88%) y verbascosa (72%); azúcares responsables de provocar flatulencia en el ser humano. Esta fermentación también trajo una reducción en el ácido fítico entre 48% y 75%. Esto mejora la biodisponibilidad de minerales. Una de las desventajas es que provoca una reducción en minerales como calcio, potasio, magnesio y zinc además de una reducción de la fibra dietética. Después de la fermentación se pudo observar un aumento del 19% en la vitamina B1 y un disminución del 12% en la vitamina E. La fermentación también puede modificar aroma, apariencia y, especialmente, el sabor a leguminosa. A parte de la reducción de α-galactósidos, se ha demostrado que la fermentación natural mejora las propiedades funcionales de la leguminosa, disminuye el contenido de taninos e incrementa la digestibilidad de la proteína (Granito et al., 2002).

Otros autores también han demostrado reducción de α-galactósidos por medio de la técnica de fermentación natural de semilla, en este caso de lentejas (Frías et. al, 1996). Durante este experimento se demuestra que además de la reducción de los polisacáridos también se encuentra una disminución en el pH lo que es caracterizado por la presencia de microorganismos ácido-lácticos. Frías et al., (1996) encontraron que utilizando la suspensión de 79g/L por un tiempo de 48 horas a 42°C se remueve la presencia de α-galactósidos totalmente, sin embargo a 221g/L la reducción fue del 96%.

## 2.4 Suplementos proteicos hechos con gandul

El contenido de aminoácidos en el gandul indica que esta leguminosa sola no puede llenar los requerimientos de aminoácidos que necesita los humanos o los animales monogástricos (Nwokolo, 1987). Sin embargo, cuenta con un alto contenido de lisina, aminoácido deficiente en cereales. Se ha planteado el mejoramiento nutricional de la proteína de los cereales mediante la sustitución de un porcentaje de éstos por harina de gandul. Esto ayuda a cubrir la deficiencia en lisina y a su vez el cereal complementa la falta de aminoácidos azufrados del gandul. Entre los cereales más comunes que se han utilizado para suplementar la harina de gandul están el arroz, maíz, trigo y el sorgo.

El potencial de la harina de gandul en sistemas alimenticios en donde la soya ha sido utilizada tradicionalmente ha sido estudiado. Okpala (2011) sugiere su utilización como un sustituto cárnico en salchichas y embutidos donde la formación de emulsión y estabilización es necesaria. Este tipo de harinas pueden ser utilizadas en sistemas donde la absorción de grasa es promovida y controlada.

En la Tabla 5 se presenta un resumen detallado acerca de las investigaciones que se han llevado a cabo en torno a diferentes dietas en donde se han mezclado un cereal y gandul para determinar si la adición de la harina de gandul provoca un mejoramiento en la calidad nutricional del cereal en estudio. Se detalla la proporción "gandul: cereal" en la que está distribuida la proteína, los resultados para la RPN, Razón Proteica Neta, que asume que la ingestión de nitrógeno está disponible únicamente para el crecimiento, los resultados de los análisis sensoriales y los detalles de la composición de las dietas para tener un factor de referencia.

En la Tabla 6 se presentan dietas que se han llevado a cabo para analizar si el gandul puede funcionar como sustituto en alimentos comerciales tales como un licuado de frutas o una galleta. Estas dietas no tuvieron mayor análisis pues el interés era comprobar la aceptabilidad del producto (Mueses et al., 1993b y Eneche,1999).

**Tabla 5.** Análisis de dietas de gandul : cereal.

| **Mezcla** | **Proporción** | **RPN*** | **Digestibilidad %** | **Análisis Sensorial** | **Observaciones** | **Autor** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Gandul verde (dieta) | N/A | 2.78 | 84.20% | N/A | 46% gandul cocido, 4% minerales, 5% de aceite vegetal, 1% aceite de hígado de bacalao, 44% de almidón de maíz. | Bressani et *al*. 1986 |
| Gandul maduro (dieta) | N/A | 2.20 | 87.50% | N/A | 56% gandul, 4.0% minerales, 5.0% aceite vegetal, 1.0% aceite de hígado de bacalao, 34% almidón de maíz | Bressani et *al*. 1986 |
| Gandul: arroz | 30%:70% | 3.26 | N/A | N/A | Gandul maduro | Bressani et *al*. 1986 |
| Gandul:arroz 7.8% w/w proteína | 20:80 | 3.49 | 75.67% | N/A | 6.24% arroz y 1.56% de harina de gandul, 4.0% de mezclas minerales, 5.0% de aceite de semilla de algodón, 1.0% de aceite de hígado de bacalao, y almidón de maíz para completar a 100% | Mueses et *al*. 1993b |
| Gandul: arroz (leche) | 20:80 | 2.41 | 79.44% | Gusta Extremadamente 33%, Gusta mucho: 23%, Gusta Moderadamente: 33% | 80g de arroz, 13.5g de harina de gandul, 200g de leche y una rodaja de canela prepara un litro de atole. Harina preparada por extrusión-cocción | Mueses et *al*. 1993b |

**Continuación Tabla 5.**

| Mezcla | Proporción | RPN* | Digestibilidad % | Análisis Sensorial | Observaciones | Autor |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Gandul: semolina (pasta) | 10:90 | N/A | 95.1% | La aceptabilidad general fue similar al control de semolina, 9.87 puntos de 15 con medida extremadamente aceptable | Gandul germinado. Se llevó a una humedad de 31.5% y se paso a través de una extrusora. | Torres et *al*., 2007 |
| Gandul: semolina (pasta) | 10:90 | N/A | 89.62% | La aceptabilidad general fue de 7.15 puntos, siendo 15 la medida extremadamente aceptable | Gandul germinado. Se llevó a una humedad de 31.5% y se paso a través de una extrusora. | Torres et *al*., 2006 |

**Tabla 6.** Dietas de gandul : cereal que no han sido completamente exploradas.

| Mezcla | Proporción | Análisis Sensorial | Observaciones | Autor |
|---|---|---|---|---|
| Gandul:arroz (frutas) | 10:80 | Gusta Extremadamente: 10%, Gusta mucho: 33%, Gusta Moderadamente: 30% | 32 g de arroz, 4.0g de harina de gandul, 5.4g de leche, 940g de papaya, 94.0 g de piña, 77.0g de azúcar, 250 ml de agua (400 ml de licuado). | Mueses et *al*. 1993b |
| Gandul: trigo (Galleta) | 25:75 | Esta mezcla tuvo aspecto más atractivo, se recomienda realizar panel sensorial de aceptación | 250g de mezcla con proporción 75:25 (trigo, harina de gandul), 100g de grasa vegetal, 150g de azúcar, 2.59g de sal, 2 ml de vainilla, 1ml de yema de huevo. | Mueses et *al*. 1993b |
| Gandul: mijo | 50:50 | 70% de los panelistas respondiendo que tenía buen sabor. | 4.3 partes de mezcla de harinas de gandul mijo 50:50, 30 partes de azúcar, 38 partes de margarina, 0.5 partes de polvo de hornear, 1 parte de vainilla, 1 parte de sal, 0.2 partes de color naranja y 25 partes de agua.(Bizcocho) | Eneche, 1999 |

*RPN: Razón Proteica Neta

El mijo es un cereal que aporta energía cuyo potencial no ha sido explotado totalmente. Eneche (1999) y Onweluzco y Nwabugwu (2009) estudiaron la suplementación de la harina de mijo con harina de gandul. Se llevaron a cabo dos tratamientos a cada semilla, lo que trajo cuatro diferentes dietas y un control sin tratamiento. Los tratamientos llevados a cabo fueron la fermentación natural y la germinación o brote de ambas semillas. Se encontró que las dietas que contenían gandul fermentado presentaron un menor contenido de grasa cruda. Las dietas de gandul fermentado con mijo brotado y la de gandul brotado con mijo fermentado promovieron el crecimiento más que otras formulaciones. Se concluyó que la combinación de fermentación y brote de la semilla en conjunto es mejor que utilizar los tratamientos individuales.

Se ha suplementado parte de la semolina de trigo en pasta por harina de gandul germinada (Torres et al., 2007). Se observó que al suplementar con harina de gandul disminuyó el tiempo de cocción con respecto al tiempo de cocción del control de semolina, además se encontró que la absorción de agua aumentó notablemente. También se realizó un análisis sensorial para determinar la aceptabilidad del producto comparado con el producto original, encontrándose que el puntaje general de aceptabilidad fue relativamente el mismo al control. El suplemento de harina de gandul puede traer consigo también la fortificación del producto pues contiene una fuerte cantidad de minerales como calcio, sodio, potasio, magnesio y hierro.

Torres et al., (2006) realizó incluso un estudio para suplementar la semolina de trigo con harina de gandul fermentado. Esta mezcla produjo un aumento en el tiempo de cocimiento de la pasta y un aumento en la absorción de agua. La aceptabilidad del producto en el panel sensorial no fue satisfactoria cuando el grado de sustitución del gandul aumentó a 12%. La mezcla demostró un aumento en la proteína cruda, grasa, azúcares totales y minerales al ser comparadas con el control.

Al igual que la creación de dietas, se han llevado a cabo estudios en donde se suplementa la harina de gandul adicionándole metionina y triptófano, cada uno por

aparte. Los resultados revelaron que al suplementar los aminoácidos por separado no produjeron ningún efecto sobre el crecimiento de los animales. En cambio al suplementar simultáneamente estos aminoácidos a la harina de gandul ésta produjo un crecimiento en los animales comparable a un estudio con caseína, lo que sugiere que la proteína del gandul, una vez suplementada con los aminoácidos necesarios, es de valor nutricional similar al de la caseína (Braham, 1965).

## 2.5 Requerimiento de aminoácidos y proteína en la nutrición humana

La Organización para Alimentación y Agricultura (Food and Agriculture Organization-FAO) y la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization-WHO) han llevado a cabo estudios para determinar los requerimientos de proteína y aminoácidos en la nutrición humana. El último informe fue entregado en el 2002. En este se discute la importancia de determinar el requerimiento para todo tipo de grupos y no enfocarse únicamente en niños de edad pre-escolar. También se resalta la digestibilidad de las proteínas como un factor que afecta el requerimiento de las mismas y que ésta debe ser ajustada con la pérdida de nitrógeno en desechos fecales. La dificultad de definir un requerimiento nutricional para proteína y aminoácidos se encuentra en identificar un nivel mínimo y máximo de consumo.

La FAO/WHO define el requerimiento de proteína como: “El nivel más bajo de consumo de proteína dietaria que balanceará las pérdidas de nitrógeno del cuerpo y así mantener la masa de proteína en personas con un balance de energía a niveles modestos y que llevan a cabo actividad física, además de niños o mujeres embarazadas o que se encuentren lactando. Las necesidades se asocian con la deposición de tejidos o secreción de leche en tasas consistentes con buena salud”. El requerimiento de proteína dietaria consiste de dos componentes, el nitrógeno total y los aminoácidos nutricionalmente indispensables (esenciales) los cuales no pueden ser producidos por el ser humano y deben ser consumidos a través de los alimentos (Young y Borgonha, 2000).

El requerimiento de proteína en valor promedio para adultos saludables se encuentra en 105mg de nitrógeno/kg de peso de adulto por día o 0.66g de proteína/kg de peso por día. Este valor fue cuestionado posteriormente, sin embargo dado a que no se encuentra información suficiente, el informe sugiere que se mantengan los mismos valores. En la Tabla 7 se presentan los valores requeridos de proteína por kilogramos de masa corporal al día para hombres, mujeres y personas de la tercera edad.

**Tabla 7.** Requisito proteico en adultos, personas de la tercera edad y mujeres (WHO/FAO/ONU, 2002; Young y Borgonha, 2000)

| Individuo | Requerimiento |
|---|---|
| Hombre joven | 0.66 g/ kg de peso al día |
| Mujer joven | 0.66 g/ kg de peso al día |
| Personas de la tercera edad | No menos de 0.75 g/ kg de peso al día |
| Mujeres embarazadas | 925g proteína con incremento de 1.2, 6.1 y 10.7g adicionales durante el 1er, 2do, 3er trimestre. |

### 2.5.1 El punteo de aminoácidos y requerimiento (amino acid score)

Este punteo determina la efectividad con la que el nitrógeno dietario absorbido puede alcanzar los requerimientos de aminoácidos a un nivel sano de consumo de proteína. Este último se obtiene comparando el contenido del aminoácido limitante en la proteína o la dieta con el contenido del mismo aminoácido con el patrón de requerimiento de la siguiente manera:

$$Punteo\ de\ aminoácido\text{:}\ \frac{mg\ de\ aminácido\ en\ 1g\ de\ proteína\ evaluada}{mg\ de\ aminoácido\ en\ un\ patrón\ de\ requerimiento}$$

Los aminoácidos esenciales son leucina, isoleucina, valina, lisina, treonina, triptófano, metionina, fenilalanina e histidina. Este último es considerado esencial debido a sus efectos en la concentración de la hemoglobina cuando no es consumido. El informe de la FAO/WHO/ONU (2002) se basa en el requerimiento estimado de proteína de 0.66g/kg de peso por día para determinar el consumo de 0.18g/kg por día para aminoácidos esenciales y 0.48g/kg por día para los demás aminoácidos y así mantener la

homeostasis del nitrógeno en un adulto saludable. En la Tabla 8 se presenta un resumen del requerimiento de aminoácidos esenciales para adultos.

**Tabla 8.** Requerimiento de aminoácidos esenciales en adultos y personas de la tercera edad (WHO/FAO/ONU, 2002)

| **Aminoácido** | **mg/kg por día** | **mg/g de proteína** **(0.66g proteína/kg de peso al día)** | **g/100 g de proteína** **(0.66g proteína/kg de peso al día)** |
|---|---|---|---|
| Histidina | 10 | 15 | 1.5 |
| Isoleucina | 20 | 30 | 3.0 |
| Leucina | 39 | 59 | 5.9 |
| Lisina | 30 | 45 | 4.5 |
| Metionina + Cisteína | **15** | **22** | **2.2** |
| Metionina | *10* | *16* | *1.6* |
| Cisteína | *4* | *6* | *0.6* |
| Fenilalalina + Tirosina | 25 | 38 | 3.8 |
| Treonina | 15 | 23 | 2.3 |
| Triptófano | 4 | 6 | 0.6 |
| Valina | 26 | 39 | 3.9 |
| **Total Aminoácidos Esenciales** | **184** | **277** | **27.7** |

## 2.6 Tendencias de alimentos para personas de tercera edad

En los últimos años se ha reconocido una fuerte capacidad de compra asociada a consumidores que han nacido entre los años 1946 y 1964. Se espera que para el año 2020 el 25% de la población estadounidense tendrá más de 60 años de edad (Popper y Kroll, 2003). Estas personas estarán entrando al grupo reconocido como "tercera edad" y tienen preferencias de compra de comida especiales. Los productos alimenticios dirigidos a este mercado deben tener la peculiaridad de no presentarse como productos geriátricos pues este sector del mercado los verá como productos para sus padres. Es por ello que las

grandes empresas de alimentos comienzan a formular nuevos productos dirigidos a toda la población con atributos de interés para las personas mayores de cincuenta años (Hollingsworth, 2003).

En el desarrollo de productos alimenticios para personas de la tercera edad se debe tomar en cuenta que este mercado no solo tiene gustos diferentes sino que los efectos de la edad interfieren con percepciones sensoriales, preferencias e incluso el nivel de consumo. Se ha demostrado que conforme el paso del tiempo las personas tienen más dificultad en reconocer la presencia de sabores tales como dulce, agrio, salado, amargo e incluso el quinto sabor: el umami. Este efecto puede estar alineado a la pérdida del sentido del olfato que se ha detectado en personas de la tercera edad. Esto impide el reconocimiento de sabores mientras comen (Popper y Kroll, 2003).

Entre otros factores que se han observado se encuentra la disminución en el reconocimiento de la intensidad de los sabores. Se ha sugerido la compensación de la pérdida del sentido olfativo con estimulación visual. Los adultos mayores enfocan su atención en la apariencia y la textura de los alimentos más que en los sabores en sí. Es por ello, que los alimentos que estén dirigidos para personas de la tercera edad deben tener empaques prácticos tomando en cuenta la conveniencia de los usuarios y disminuyendo el tiempo de preparación pues aunque estas personas tengan más tiempo, el minimizar el esfuerzo de preparación siempre hará el producto más atractivo. (Popper y Kroll, 2003)

Entre las tendencias que se observan se encuentran las batidas nutricionales y "smoothies", una bebida licuada, fría y algunas veces dulce, hecha en base a fruta fresca o vegetales. En otras palabras, bebidas portátiles que vengan en empaques sencillos con una gran variedad de suplementos. En el mercado se encuentra la marca "*Snapple-A-Day"*® que ha logrado lanzar al mercado una bebida constituida por soya con sabor a frutas que busca atacar el mercado femenino con un alto contenido en proteína, ácido fólico y calcio, pero estos atributos son también aprovechados por el mercado de

personas de tercera edad. Es por ello que pueden existir productos que pueden ser adaptados a las necesidades de los adultos mayores. (Hollingsworth, 2003)

Los puntos clave que buscan los consumidores de tercera edad y que deben estar presentes en los alimentos son los siguientes (Hollingsworth, 2003):

- Movilidad y salud ósea; calcio y vitamina D
- Sistema nervioso y mental, enfermedades coronarias; vitaminas B-6, B-12 y ácido fólico.
- Antioxidantes, prevención de cataratas y degeneración macular; vitamina E, beta caroteno y ácido ascórbico.
- Evitar infecciones y enfermedades crónicas; vitaminas E y B-6 así como el mineral zinc.
- Cáncer de colon y sistema digestivo; fibra.
- Diabetes y mantener un peso ideal; reducción en grasa saturada y azúcar.

Al consumir gandul se agrega a la dieta vitaminas tales como B1, B2 y vitamina E, también se obtienen minerales tales como calcio (200mg/100g de materia seca), magnesio (110 mg/100g de materia seca) y zinc (7.85mg/ 100g de materia seca). Es fuente de fibra dietaria, siendo esta aproximadamente 13g/100g de materia seca (Torres et al., 2006).

# 3 MATERIALES Y MÉTODOS

## 3.1 Obtención de la materia prima

El gandul utilizado en este estudio fue de la variedad, I-8-3-1 "Lázaro" cosechado por productores independientes y los cuales obtuvieron la semilla madre de la Estación Experimental Agrícola de Isabela de la Universidad de Puerto Rico. El gandul se obtuvo verde y en vaina. El proceso de desvaine fue manual, descartando los gandules que estuviesen dañados o presentaran deterioro. Posteriormente, se procedió a congelar el grano verde en bolsas de 200 gramos para su uso posterior.

## 3.2 Preparación de la materia prima

### 3.2.1 Secado y molido del gandul

Los gandules se descongelaron y limpiaron a mano para retirar materia extraña como pedazos de hojas, vainas o fibra. Los gandules se deshidrataron en un desecador casero de bandejas (Nesco, American Harvest Gardenmaster, FD-1010PC, USA) a 145°F por 5 horas. Al cabo de este tiempo se retiraron los gandules de las bandejas, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se refrigeraron a 4°C por un día. Después los gandules secos fueron pasados por una moledora de discos (Glenmills Inc, Tipo C 11-1, Maywood NJ, USA) que fue ajustada hasta el último nivel de fineza para obtener un tamaño de partícula cercano a 0.15mm, después se procedió a pasar la harina por un cernidor industrial. Se utilizaron los tamices 45, 60, 80, y 100. La harina recogida, con un tamaño de partícula de 0.15mm o menos (tamiz 100), se utilizó posteriormente para la fermentación.

### 3.2.2 Fermentación natural de la harina

Se llevó a cabo la fermentación de la harina de gandul para poder transformar los factores anti-nutricionales, α-galactósidos (oligosacáridos) en azúcares simples. Para ello se utilizó un fermentador (BioFlo®/CelliGen® 115, New Brunswick Scientific NJ, USA), equipado con un baño de agua el cual se mantuvo a un grado menos de la

temperatura de proceso (Isotemp 3028P, Fisher Scientific, USA). Éste posee un sistema para medir pH mediante un electrodo, un calentador y un sensor para controlar la temperatura. Para la fermentación se siguió el procedimiento utilizado por Frías et al. (1996), con la siguiente modificación: 221 gramos de harina de gandul fueron suspendidos de manera aséptica en 1 litro de agua destilada. Utilizando esta proporción, se llevó a cabo la fermentación para un volumen de 2 litros de mezcla. La misma se colocó en el aparato y se llevó a cabo la fermentación utilizando las condiciones señaladas en la Tabla 9, para encontrar la temperatura y el tiempo óptimo de fermentación. Cada prueba se realizó en triplicado.

**Tabla 9.** Condiciones para la optimización de la fermentación natural de harina de gandul

| Prueba | Temperatura (°C) | Tiempo (horas) |
|---|---|---|
| 1 | 28 | 65.4 |
| 2 | 35 | 57.7 |
| 3 | 42 | 51.0 |

Estas condiciones fueron determinadas basándose en la disminución o eliminación de α-galactósidos en lentejas. La relación de tiempo y temperatura a masa constante de 221g/L fue analizada por Frías et al., (1996). La descripción de la obtención de estos valores se encuentra en detalle en el Apéndice 1.

### 3.2.3 Determinación de pH durante la fermentación

Se tomó el pH durante la fermentación cada 24 horas y en el tiempo final. Esta medida se tomó utilizando el electrodo para medir pH (Mettler Toledo, 225mm, Columbus, Ohio) que acompaña al fermentador. Se calibró el sistema con los buffer 4 y 7 (Fischer Scientific, USA), siguiendo las instrucciones del manual. Con esta información se hizo una gráfica de pH vs. tiempo para demostrar el comportamiento del pH durante la fermentación.

### 3.2.4 Pre-gelatinización del arroz

Se utilizó un método patentado (Taniguchi et al., 1988), con modificaciones. El diagrama de flujo para este proceso se presenta en la Figura 2. Este método fue seleccionado a partir de pruebas preliminares. Estas se encuentran en el Apéndice 2.

## 3.3 Propiedades de hidratación de la harina de arroz

El índice de absorción de agua (WAI, por sus siglas en inglés), la solubilidad en agua (WS %) y el capacidad de hinchamiento (SP) fueron medidos a la harina de arroz para demostrar que el tratamiento de pre-gelatinización tuvo efecto. El siguiente proceso fue llevado a cabo: Se pesaron 2.5g de arroz en una balanza analítica (AG204 Mettler Toledo Int. Inc.) y se le añadieron 30mL de agua destilada en un tubo plástico de centrifuga con tapa previamente pesado. Esta mezcla fue agitada y colocada en un baño de agua (Fisher Versa Bath, Fisher Scientific Allied 139) a 30°C por 30 minutos. Después fue centrifugado a 2500 rpm por 15 minutos (IEC-HN-SII, Damon/IEC Division, USA). Se pesó el residuo en el tubo de centrifuga. El sobrenadante fue secado en cápsulas de evaporación a 105°C en un horno (255G Fisher Isotemp 200, Fisher Scientific). Se utilizaron las siguientes fórmulas para calcular las propiedades de hidratación (Lai, 2001):

$$Índice\ de\ Absorción\ de\ Agua\ (WAI)\ = \frac{peso\ del\ residuo}{peso\ de\ la\ muestra\ seca}$$

$$Solubilidad\ en\ Agua\ (WS(\%)) = \frac{peso\ seco\ del\ sobrenadante}{peso\ de\ la\ muestra\ seca} * 100\%$$

$$Capacidad\ de\ hinchamiento\ (SP) = \frac{Peso\ del\ residuo}{Peso\ de\ la\ muestra\ seca} * \left(\frac{1 - (WS\ \%/100)}{100}\right)$$

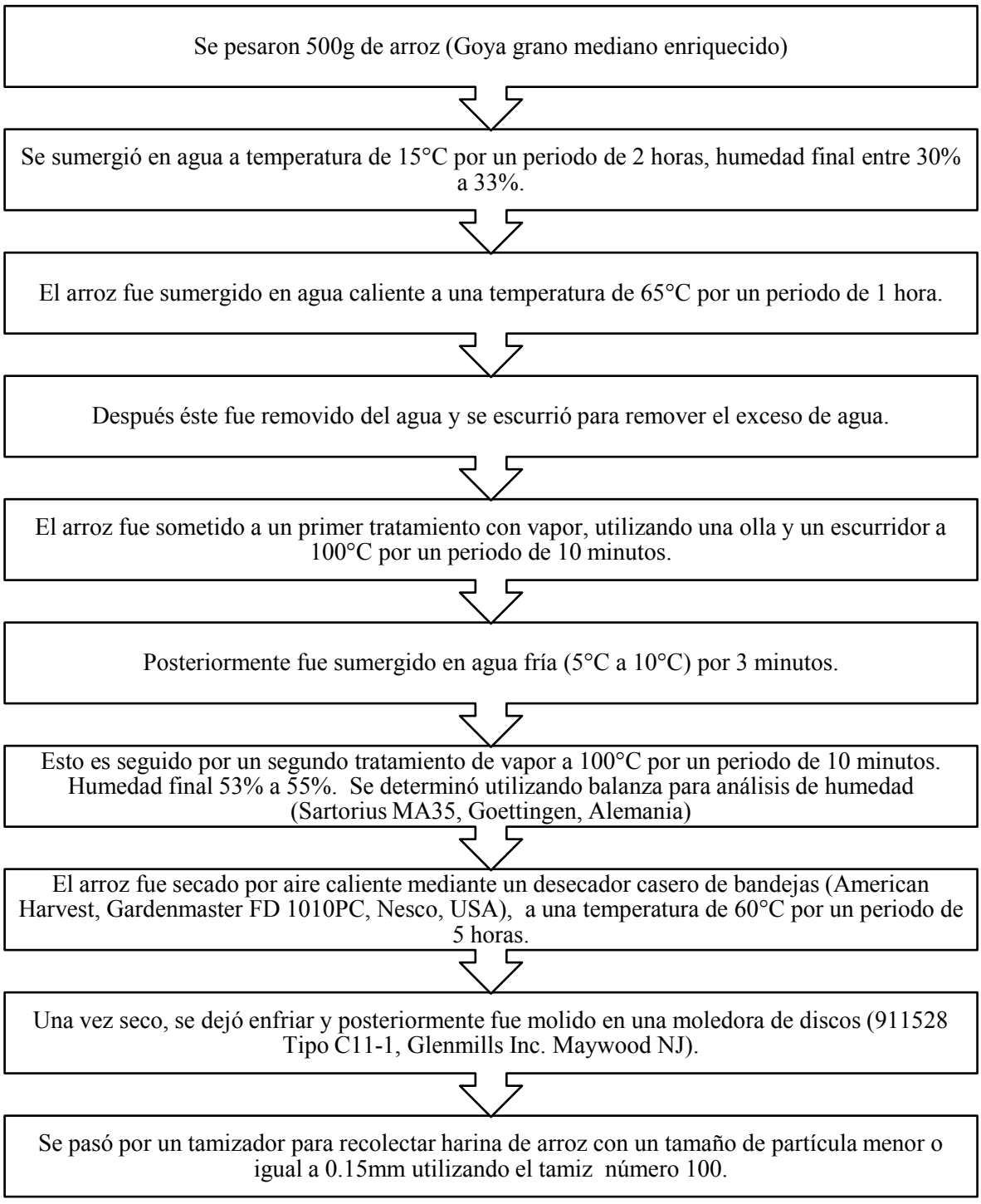



**Figura 2**. Diagrama de flujo para pre-gelatinización de arroz.

## 3.4 Análisis de carbohidratos solubles y α-galactósidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El método utilizado fue el de Granito et al., (2002) con modificaciones. El HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución) que se utilizó para la cuantificación de los carbohidratos en las muestras fermentadas y muestra control fue marca Waters MA, USA equipado con un "autosampler" modelo Waters 717, una bomba binaria modelo Waters 1525, un modulador de temperatura de columna y un detector de índice de refracción modelo Waters 410.

### 3.4.1 Extracción de carbohidratos y preparación de la muestra

Se utilizó el método de Granito et al. (2002) con modificaciones. Para la preparación de la muestra cruda, se suspendió la harina de gandul cruda en agua en la misma proporción en la que se hizo la fermentación, 221g/L. Esto se hizo en triplicado. Se procedió a disminuir el pH de la muestra con HCl 3M hasta alcanzar un pH de 4.2. Con estas condiciones se igualó el escenario inicial de las muestras procesadas al final de la fermentación. Para poder analizar las muestras, éstas debían estar secas. Se utilizó la técnica de liofilización para evitar que los carbohidratos y proteínas se desnaturalizaran. Para esto, se tomaron 300ml de cada mezcla fermentada y la mezcla cruda y se congelaron en una bandeja para obtener una muestra congelada de grosor delgado. Ésta se colocó en un ultrafreezer (Isotemp Basic U86-13A35, Revco Technology) a -81°C por 24 horas. Después, la muestra congelada se rompió en trozos pequeños y fue colocada en un liofilizador (MicroModulyo 115, Thermo Savant, Holbrook NY) por 48 horas.

Para la extracción de azúcares y α-galactósidos se utilizó el método de Granito et al., (2002), modificado como sigue: 3 gramos de harina de gandul liofilizada fueron suspendidos en 50mL de etanol 80%. La muestra fue llevada a reflujo por 15 minutos con la ayuda de un balón de cristal conectado a un condensador y utilizando una manta con manejo de temperatura. Después fue enfriada y filtrada al vacío en un embudo Büchner con ayuda de un filtro Whatman #4. El residuo fue extraído dos veces más y fue lavado

con agua destilada hasta que no hubo detección de carbohidratos utilizando el método de Molisch.

El método de Molisch se hizo de la siguiente manera: se tomaron 2ml de la solución de muestra en un tubo de ensayo. Se agregaron dos gotas de agente Molisch (solución de α-napthol en 95% de etanol). Esta solución fue lentamente pasada a un tubo conteniendo 2mL de ácido sulfúrico concentrado. Se formaron dos capas. La formación de una capa purpura en medio de las dos fases daba una respuesta positiva a la presencia de carbohidratos. Si esto sucedía se limpiaba el residuo en el filtro con agua hasta que no hubiese presencia de carbohidratos.

Los supernatantes de las filtraciones se combinaron, se concentraron en un rota-evaporator (Buchi RE 121/Buchi 011, Switzerland) equipado con un baño de agua (Buchi 461, Switzerland) y una bomba de autolimpieza (self cleaning dry vacum system 2025 Welch) por una hora a 50°C (Sosulski et al., 1982) o hasta obtener un volumen menor o igual a 25mL. El producto concentrado fue llevado a 25 mL con 50% de etanol. Se tomaron 10 mL de esta solución y se concentró nuevamente hasta llevar a sequedad, esta última se disolvió en 10mL de agua y se llevó a cabo una extracción con éter etílico. La solución acuosa fue pasada a través de una jeringa desechable conteniendo 0.5 mL de la resina de intercambio iónico Dowex 50WX8 (50 -100mesh Acros Organics, New Jersey, USA) resina en forma $H^+$ y subsecuentemente fue pasada a través de una jeringa desechable conteniendo 0.5mL de la resina de intercambio iónico Dowex 1X8 (50-100mesh, Acros Organics, New Jersey, USA) resina en forma de $AcO^-$. Esta solución fue diluida con 20ml de agua y fue evaporada a sequedad en el rotaevaporador para después ser redisuelta en 5ml de agua para HPLC (Water HPLC grade, Fisher Scientific, New Jersey, USA). Esta fue pasada a través de un cartucho sep-pak $C_{18}$ (Waters Associates). Esta solución fue pasada por HPLC-RI.

### 3.4.2 Preparación de curva de calibración

Para la realización de la curva de calibración se utilizaron los siguientes estándares: Fructosa (Fluka Biochemika, microselect>99% HPLC grade), Glucosa (Fisher Chemical, Fisher Scientific, New Jersey USA), Sacarosa (Fluka Biochemika microselect >99.5% HPLC grade), Galactosa (Sigma grade, Sigma, Louis MO), Rafinosa (Acros Organics, New Jersey, USA) y Estaquiosa (Acros organics, New Jersey, USA). Se pesaron 0.1000g de cada estándar en una balanza analítica (AG204 Mettler Toledo Inc.) y se disolvieron en agua para HPLC en volumétricas de 10mL para obtener una concentración inicial de 10,000ppm. Ésta fue la solución primaria para hacer las diluciones de la curva de calibración para cada estándar. Se hicieron las siguientes diluciones: 8000ppm, 6000ppm, 4000ppm, 2000ppm, 1000 ppm, 500ppm, 250ppm y 125ppm en volumétricas de 10mL. Se procedió a pasar la solución por filtros de 0.45µm y se colocaron en frascos de vidrio para HPLC.

### 3.4.3 Condiciones de detección en HPLC-RI

Las condiciones utilizadas fueron las siguientes:

a) Columna Sugar Pak_SP 0810, Waters, MA, USA, a una temperatura de 90°C.
b) Elución isocrática con una fase móvil de agua desionizada y EDTA (50mg EDTA/L).
c) Se utilizó un flujo de 0.5 ml/min. El volumen de inyección fue de 5µL.
d) Temperatura del detector de índice de refracción fue 40°C.
e) El tiempo de análisis fue de 20 minutos.

## 3.5 Análisis de aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El método utilizado para llevar a cabo este análisis fue basado en el método AccQ.Tag (Waters Co., 2008). El HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución) que se utilizó para el análisis de aminoácidos en las muestras fermentadas y muestra control fue marca Waters, MA, USA, equipado con un "autosampler" modelo Waters 717, un

sistema de control Waters 600E, una bomba cuaternaria modelo Waters U6K y un detector de fluorescencia modelo Waters 470 (Scanning Fluorescence Deterctor).

### 3.5.1 Preparación de curva de calibración usando estándar interno

El estándar para calibración contiene 100pmol/µL de cada aminoácido (excepto cisteína que se encuentra a 50pmol/µL) y se preparó mezclando 40 µL de solución patrón de 2.5mM de ácido alfa-aminobutírico en 0.1M HCl en un frasco de 2 mL. Seguido, se añadió 40 µL de Water Amino Acid Hydrolysate Standard Mixture y se añadieron 920 µL de agua desionizada. Esto se hizo para obtener una concentración inicial de 25pmol/µL, se hicieron diferentes diluciones de la mezcla de estándares manteniendo la cantidad de 40µL del estándar interno para todas las concentraciones. Se hicieron dos curvas estándar, la primera comprendía las siguientes concentraciones: 5, 10, 15, 20 y 25 pmol/µL para todos los aminoácidos y 2.5, 5, 7.5, 10 y 15pmol/µL para cisteína. La siguiente curva comprendía los valores de 100, 125, 150, 175 y 200 pmol/µL para todos los aminoácidos y 50, 62.5, 75, 87.5 y 100 para cisteína. Los estándares de calibración fueron derivatizados tomando una alícuota de 10 µL de los mismos preparados anteriormente en un tubo muestra. Se añadieron 70 µL de AccQ-Fluor buffer de borato a pH 8.8 y se mezcló en un vortex por varios segundos. Se procedió a añadir 20 µL de reactivo AccQ.Fluor y se volvió a mezclar en vortex por varios segundos. La solución se deja reposar 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente, se utilizó una pipeta Pasteur de 9 pulgadas para transferir el contenido a un vial de HPLC con un liner cap de silicón y se calentó por 10 minutos a 55°C.

Una inyección de 5µL del estándar derivatizado contenía 50pmol de cada aminoácido derivatizado excepto cisteína la cual estuvo a 25pmol. Esta solución duraba una semana después de preparado. Un ejemplo de cálculo para la preparación del estándar se encuentra en el Apéndice 3.

### 3.5.2 Preparación de la muestra

Se utilizó el método sugerido por el profesor José Dumas de la Estación Experimental de Río Piedras. Esta muestra puede durar una semana a temperatura ambiente después de preparada. Para hacer la hidrólisis de la muestra se pesaron 200mg de harina de gandul en una balanza analítica (AB104, Mettler Toledo, Switzerland) y se colocaron en un tubo de ensayo de 15 mL y se tapó el envase. Se procede a añadir 10mL de HCl 6N y se dispersó en un baño de ultrasonido (2510 Branson) por 15 min. Se colocaron los tubos de ensayo en un horno a 105°C y se dejaron allí por 24 horas. Esta solución se filtró utilizando un GF de 0.45 μm. Después se tomó una alícuota de 1 mL y se evaporó a 100°C por aproximadamente 30 minutos en un horno de convección (Presicion, Thermo Scientific, USA).

La muestra se reconstituyó con 1 mL de 0.1N HCl y se tomó una alícuota de 10 μL del filtrado (muestra) para agregarlo a un tubo de ensayo de 2 mL. Se precalentó un bloque a 55°C y se agregaron 10 μL de solución de estándar interno preparada en paso anterior. Posteriormente, se añadieron 60 uL de amortiguardor de borato a pH 8.8. y 20 μl de una de reactivo de AccQ.Fluor (3 mg/ml de 6-amino-quinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamato, Waters, USA). Se calentó la mezcla por 10 min a 55°C.

### 3.5.3 Condiciones de detección en HPLC-fluorescencia

Se analizó por HPLC con detección por fluorescencia usando las condiciones siguientes:

a) Columna:AccQ.Tag Amino Acid Analysis Column (150×3.9 mm, 4 μm, RP18; Waters, Milford, USA) a 39 $^{0}$C;
b) Eluyentes: Eluyente A= 100 mL del concentrado A de AccQ.Tag y se mezcla con 1000 mL de agua desionizada o grado HPLC.
c) El eluyente B= 100 mL del concentrado B de AccQ.Tag y se mezcla con 1000mL de agua desionizada o grado HPLC.
d) Eluyente C, Acetonitrilo
e) Eluyente D, agua

f) Volumen de inyección: 5 µL

g) Detector: Fluorescencia ajustado a λex 250 nm y λem 395 nm, gain = 12

h) Gradiente lineal: El flujo fue ajustado a 1 mL/min, 0 min: 90% A, 10% B; 0.5 min: 89% A, 10% B, 1% C; isocrático hasta 17 min; 20 min: 88% A, 10% B, 2% C; 30 min: 86% A, 9% B, 5% C; 36 min: 63% A, 25%B, 12% C, 36.5 min: 0% A, 87.5% B, 12.5%C; 36.8 min: 22% A, 65.5% B, 12.5% C (flujo fue ajustado a 1.3 ml/min); 40 min: 22% A, 65% B, 13% C; 50 min: 22% A, 63% B, 15% C; luego la columna fue acondicionada por 7 minutos con solución A y reacondicionada por 9 min con 60% C, 40% D.

## 3.6 Análisis proximal

### 3.6.1 Determinación de humedad

Los crisoles, previamente marcados, se secaron a una temperatura de 100˚C a 105°C en un horno por 24 horas, se enfriaron en un desecador y se tomó su peso. Este paso se repitió pero solo por una hora. Si la diferencia entre el primer peso y el segundo no era mayor de 20 mg se procedió a tomar el último peso. El crisol fue tarado en una balanza (AG204, Mettler Toledo) y se le añadieron 5.0 gramos de muestra. Se colocó el crisol con la muestra en el horno (Isotemp Oven 200 Series, Fisher Scientific, USA) nuevamente a una temperatura entre 100˚C a 105°C por 24 horas. Al cabo de este tiempo se sacó el crisol del horno y se dejó enfriar por 10 minutos en un desecador y se procedió a registrar el peso. El crisol fue colocado nuevamente en el horno y se esperó 1 hora más. Se retiró el crisol del horno y se procedió a pesar nuevamente, este proceso se repitió hasta que la diferencia en peso no fuese mayor a 20mg. Esto se realizó en triplicado para cada repetición de los tratamientos. La razón entre el agua extraída y el peso de la muestra húmeda es el porcentaje de humedad.

### 3.6.2 Determinación de cenizas

El método utilizado fue el AOAC 923.03 (Association of Official Analytical Chemists, 1990). Se pesaron crisoles con sus tapas y se aseguró que éstos estaban

limpios y secos. Seguidamente se agregaron entre 0.5g a 1.0g de muestra seca a cada crisol y se cubrió inmediatamente. Las muestras que se obtuvieron del análisis de humedad se utilizaron para este fin. Se colocó el crisol con la muestra en una mufla (Muffle Furnance, Isotemp, Fisher Scientific, USA) y se calentó paulatinamente hasta que alcanzó los 600 ºC. La temperatura se mantuvo a 600 ºC por espacio de seis horas, la mufla se apagó y se permitió que la muestras se enfriaran. Los crisoles fueron colocados en un desecador y posteriormente pesados con sus tapas. Este paso se realizó en triplicado para cada repetición. La razón de peso de muestra remanente en el crisol entre el peso de la muestra seca es el porcentaje de ceniza en base seca.

### 3.6.3 Determinación de proteína bruta

El método utilizado fue el de Micro-Kjeldahl, AOAC 960.52 (AOAC, 1994). Se pesó la muestra seca entre 0.135g ± 0.015g. Esto fue transferido a un tubo de digestión de 100mL junto a 0.6 g (aproximadamente) de la mezcla catalizadora de sulfato de potasio ($K_2SO_4$) y sulfato de cobre ($Cu_2SO_4$) en cada tubo. En una campana de extracción se adicionaron 7 ml de ácido sulfúrico concentrado a cada tubo y se colocaron en un bloque de digestión (Digestion System 6, Tecator, Sweeden). La temperatura se aumentó paulatinamente hasta alcanzar el nivel 10. Las muestras se mantuvieron en el proceso de digestión por 3 horas. Al cabo de este tiempo se sacaron los tubos y se dejaron enfriar dentro de la campana de extracción.

A los tubos de digestión grandes (250 mL) se le adicionó 20 ml de agua destilada, con mucho cuidado, se vertió la muestra fría digerida en ácido (en tubos de 100mL) y se lavó el tubo de 100mL para disolver cristales formados con una porción de 20mL de agua destilada. Esto se vertió en el tubo de 250mL. El destilador (Rapidstill II, Labconco, USA) fue encendido y se le colocó un matraz conteniendo 25 ml de solución de ácido bórico 4% (Kjendahl determination, Fisher Scientific, USA) en el tubo de salida del destilador. Cuando el agua en el destilador alcanzó la ebullición se procedió a añadir 50mL de NaOH al tubo de 250mL preparado anteriormente. Rápidamente se colocó en el destilador y el medidor de tiempo se colocó en 9 minutos. La solución indicadora de

ácido bórico se tornó verde. La muestra se tituló con HCL 0.10N y un color gris-lila mostró el punto de equivalencia. Esto se realizó en triplicado para cada repetición. Las fórmulas para obtener la cantidad de nitrógeno y el porcentaje de proteína en base seca son las siguientes:

$$\%N = \frac{\text{Volumen HCl utilizado en titulación (mL)} * \text{Normalidad HCl} * 14.01}{1000 * \text{peso muestra seca (g)}} * 100\%$$

$$\%PRO = \% \text{ de N} * \text{Factor de conversión (6.25 para leguminosas)}$$

### 3.6.4 Determinación de grasa cruda

Se utilizó el método AOCS Am 5-04 (American Oil Chemists's Society. 2005). Se identificaron las bolsas XT4 (Ankom Technology, USA) con un marcador indeleble resistente a solventes. Se pesó la bolsa y anotó el peso. Después se colocó la bolsa en un sostenedor especial para poder verter en ella 1.00 gramo de muestra húmeda. La bolsa se cerró con la ayuda de un sellador (1915, Ankom Technology). Posteriormente, éstas fueron colocadas en un horno a 105°C por 24 horas.

Se sacaron las muestras del horno y las mismas fueron enfriadas dentro de un desecador. Después de esto, las muestras se colocaron en el espiral del equipo, el cual a su vez se colocó en la canasta del extractor. Se adicionaron 200mL de éter de petróleo (Fisher Scientific, USA) en el receptor y 150mL en la canasta con las bolsas. Luego la canasta con las muestras fue colocada en el extractor de grasa (XT10, Ankom Technology, USA). Se seleccionaron las siguientes condiciones: 70°C de extracción por 50 minutos. Después de la extracción se colocaron las muestras en el horno por 24 horas, se colocaron en el desecador y se pesaron nuevamente. El porcentaje de grasa cruda en base húmeda es la razón de la grasa extraída (obtenida por diferencia de peso), entre la masa de la muestra húmeda. Este proceso se repitió tres veces por cada replica o repetición.

### 3.6.5 Determinación de carbohidratos

Se determinaron por diferencia de porcentajes. Se restaron la suma de los valores de los porcentajes proteína, grasa, humedad y ceniza a 100% para obtener el porcentaje de carbohidratos.

### 3.6.6 Determinación de fibra cruda

Se utilizó el método aprobado por la AOCS,Ba 6a-05 de Ankom Technologies. Se pesaron las bolsas de filtro **($W_1$)** Ankom F57. Se pesó aproximadamente 1.0 g (+/- 0.05 g) de muestra seca **($W_2$)**, previamente triturada en una balanza analítica. Se pesó un blanco y se incluyó en la digestión **($C_1$).** Las bolsas fueron selladas a un cm. de distancia de la abertura utilizando un sellador caliente. La muestra se esparció uniformemente en el interior de la bolsa. Se extrajo la grasa de las muestras colocando las bolsas con la muestra en un vaso con éter de petróleo. Se dejaron allí por 5 minutos y luego se repitió este paso con éter de petróleo nuevo. Se dejaron secar al aire. Posteriormente se colocaron en el suspensor y se añadieron 2000 ml de ácido sulfúrico 0.255N a temperatura ambiente en el envase de digestión y se llevó a 95$^{o}$C. Cuando alcanzó la temperatura, se sumergió el sostenedor en el ANKOM 200, (Ankom technology group, USA) con las bolsas durante 30 minutos y se llevó a 100$^{o}$C.

Después de pasados los 30 minutos se apagó la agitación y el calor y se abrió la válvula exhaustiva para liberar la solución caliente. Se limpió el sistema con tres lavados de 2000 ml de agua caliente agitando las bolsas en el agua por 3 a 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 2000 ml de NaOH 0.313N a temperatura ambiente se repitió el mismo proceso que se realizó con el ácido. El lavado con agua se llevó a cabo 3 veces. Se removieron las bolsas del sostenedor y se presionaron suavemente para eliminar el exceso de agua. Estas fueron colocadas en alcohol etílico por 3 minutos y posteriormente se colocaron en un horno a 105$^{o}$C por 2 horas. Después se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se pesaron nuevamente ($W_3$). Las bolsas fueron incineradas en un crisol (previamente pesado) durante 2 horas a 550$^{o}$C. Se enfriaron en un desecador y se pesaron para calcular la materia orgánica ($W_4$). Las fórmulas utilizadas fueron:

$$\% \text{ fibra cruda} = \frac{[W_3 - (W_1 \times C_1)]}{W_2} \times 100$$

$$\% \text{ fibra cruda} = \frac{[W_4 - (W_1 \times C_2)]}{W_2 \times DM} \times 100$$

Donde:

$W_1$ = Peso de la bolsa sola
$W_2$ = Peso de la muestra
$W_3$ = Peso luego del proceso de extracción
$W_4$ = Peso materia orgánica (pérdida de peso durante la ignición de la bolsa y la muestra)
$C_1$ = Corrección de la muestra (peso original de la bolsa blanco)
$C_2$ = Corrección de cenizas

## 3.7 Análisis estadístico

Se utilizarán valores de media $\overline{X}$ y sus desviaciones estándar ($S$) para determinar la exactitud de las medidas. Se llevaron a cabo análisis de varianza ANOVA para determinar la diferencia entre tratamientos según corresponda el caso con un 95% de confianza ($\alpha = 0.05$). Se tenían dos hipótesis:

Hipótesis Nula: Todos los tratamientos son iguales.
Hipótesis alterna: al menos un tratamiento es diferente.

El estadístico utilizado fue el valor p (p-value) obtenido del análisis ANOVA. Si este es menor que "alfa" ($p < 0.05$) la Hipótesis nula (Ho) se rechaza, es decir al menos uno de los tratamientos es diferente. De encontrarse diferencia en los tratamientos se procedió a realizar la prueba de Tukey para determinar el tratamiento diferente. Se utilizó el programa de InfoStat (Grupo Infostat, 2009) para el análisis de los datos.

# 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La fermentación del gandul fue llevada a cabo con el fin de convertir los oligosacáridos estaquiosa y rafinosa en azúcares simples. Al eliminar estos factores anti-nutricionales se busca hacer el producto atractivo al consumidor pues se han removido factores causantes de flatulencia. Al fermentar también se reducen los inhibidores de tripsina y se mejoran cualidades organolépticas (Torres et al., 2006).

Las condiciones de fermentación mencionadas en la sección de métodos fueron determinadas basándose en la disminución o eliminación de α-galactósidos en un estudio en lentejas (Frías et al., 1996). Se utilizaron las tres temperaturas propuestas por Frías et al. (1996) y se buscó el tiempo mínimo necesario para reducir en un 90% los α-galactósidos para cada temperatura.

A continuación se presenta el efecto de la fermentación en el pH, en los azúcares solubles y aminoácidos del gandul variedad "Lázaro".

## 4.1 Cambio de pH durante la fermentación

Se observó una disminución en el pH de las fermentaciones conforme iba pasando el tiempo. En la Tabla 10 se presenta el cambio de pH a través del tiempo. Tal como se esperaba al inicio de las fermentaciones, no se encontró diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en el pH de la mezclas, independientemente del tratamiento, dando un pH promedio de 6.35. Durante las primeras 24 horas de fermentación se encontró que la disminución de pH para el tratamiento de 35°C y 42°C fue mayor que la de 28°C de manera significativa. Esto se puede deber a que se le están proporcionando mejores condiciones de temperatura a la mezcla, lo que hace que la flora microbiana natural pueda crecer de mejor manera. Al aumentar su población, estarán produciendo más ácidos orgánicos, lo que producirá una mayor disminución del pH. De hecho, desde las 24 horas de fermentación los tratamientos de 35°C y 42°C alcanzaron valores que son significativamente similares a los valores de pH a las 48 horas y tiempo final del tratamiento a 28°C. Un estudio de

fermentación de lentejas (Frías et al., 1996), menciona una disminución inicial a pH 4.6 para las primeras 24 horas de tratamiento lo que concuerda con el pH promedio de las tres fermentaciones para las 24 horas en este estudio, el cual fue de 4.53.

A las 48 horas, no se encontró diferencia significativa entre los pH de los tratamientos. Sin embargo el tratamiento a 35°C demuestra una tendencia de disminución mayor que los otros tratamientos. El pH del tratamiento de 42°C no cambió significativamente después de las 24 horas de fermentación. Una de las razones por la cual el tratamiento no continuó disminuyendo puede deberse a que esta temperatura las bacterias crecieron más rápido, lo que ocasionó que éstas llegaran más rápido a su fase estacionaria y muerte, además que el pH bajó, lo que les proporcionó otra barrera de crecimiento.

Para los tiempos finales se encontró que le tratamiento de 35°C fue significativamente diferente a los tratamientos a 28°C y 42°C pero al igual que los otros tratamientos no hubo cambio estadístico en el pH desde las 48 horas de fermentación.

**Tabla 10.** Valores de pH durante el tiempo de fermentación en los diferentes tratamientos.

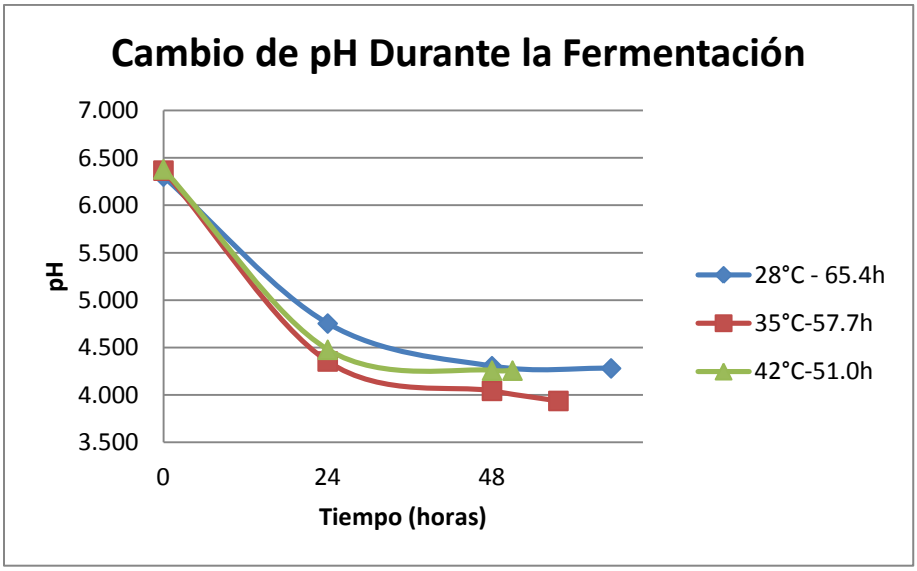
| | | **Tratamientos** | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Tiempo (horas)** | **28°C** | **35°C** | **42°C** |
| pH | 0 | $6.30 \pm 0.04^{a}$ | $6.37 \pm 0.08^{a}$ | $6.38 \pm 0.10^{a}$ |
| | 24 | $4.75 \pm 0.24^{b}$ | $4.35 \pm 0.06^{c}$ | $4.48 \pm 0.07^{c}$ |
| | 48 | $4.29 \pm 0.02^{cd}$ | $4.04 \pm 0.05^{ed}$ | $4.26 \pm 0.04^{cd}$ |
| | *Tiempo final | $4.28 \pm 0.02^{cd}$ | $3.94 \pm 0.09^{e}$ | $4.26 \pm 0.04^{cd}$ |

Medias seguidas por la misma letra en las filas y las columnas no son significativamente diferentes ($p<0.05$). *Tiempo final de la fermentación: 28°C por 65.4 horas, 35°C por 57.7 horas y 42°C por 51 horas.

En el Gráfica 4 se presenta el comportamiento de disminución de pH a través del tiempo de fermentación para los tres tratamientos evaluados. Estos resultados concuerdan con la literatura (Hugo et al., 2003, Granito et al., 2002) en los cuales se obtuvo una disminución de pH desde aproximadamente 6.8 hasta alcanzar valores entre 3.94 a 4.28.

En estos estudios también se observó que el comportamiento del tratamiento a 35°C resultó en una disminución de pH más acelerada que los otros dos tratamientos.

El pH menor o igual a 4.28 permite asegurar la inocuidad del producto al no presentar condiciones para el crecimiento de bacterias patogénicas en él. Estudios realizados por Nout et al. (1989) en donde inocularon bacterias patogénicas como *Salmonella spp*., *Staphylococcus aureus*, *Shigella spp*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter cloacae y Citrobacter* en una fermentación natural de una mezcla de mijo, sorgo y gandul, encontraron que al final de la fermentación las bacterias fueron eliminadas. Esta disminución de pH es atribuida a la formación de ácido láctico y ácido acético durante la fermentación y se comprobó que este factor fue el determinante en la eliminación de las bacterias. (Nout et al., 1989). Otro factor importante en la disminución de pH es que esto ayuda a controlar la solubilidad y el poder de hinchamiento de los pentosanos e inactiva parcialmente las amilasas (Hugo et al., 2003).




**Gráfica 4.** Comportamiento del pH durante la fermentación de harina de gandul en los tres diferentes tratamientos.

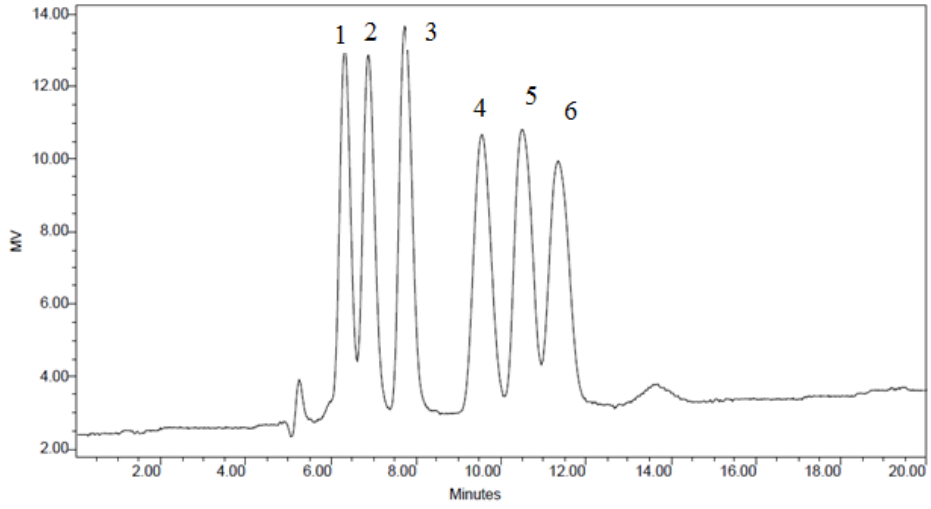
## 4.2 Análisis de carbohidratos solubles en gandul fermentado y control

El análisis de carbohidratos se llevó a cabo con el fin de determinar que tratamiento logró disminuir más los oligosacáridos llamados α-galactósidos presentes en el gandul. Un oligosacárido es un polímero de azúcares simples, los cuales se encuentran unidos por enlaces O-glicosídicos y que pueden tener más de 2 moléculas unidas. En el caso de los α-galactósidos como la estaquiosa y la rafinosa, se encuentra una unión entre una molécula de sacarosa (glucosa y fructosa unidas por un enlcace β-1,2) y una o dos moléculas de galactosa, respectivamente, por medio de un enlace α-1,6 galactosídico (ver Figura 1). Al ser este último imposible de digerir por el humano, pues éste no cuenta con la enzima digestiva apropiada (α-galactosidasa), los oligosacáridos terminan en el intestino siendo metabolizados por la microflora presente. Esto promueve entre muchos productos, el dióxido de carbono y en menores cantidades el gas metano (Apata, 2008). Esto trae como resultado la producción de flatulencia, lo que causa molestia y inconformidad.

Varios estudios han demostrado que la fermentación natural puede traer a parte de un mejoramiento en las propiedades organolépticas y nutricionales de los alimentos (Onweluzo y Nwabugwu, 2009; Torres et al., 2006; Granito et al., 2002; Frías et al., 1996; Nout et al., 1989), la disminución o eliminación de α-galactósidos. Esto se basa en la primicia que los microorganismos predominantes en las legumbres crudas son en su mayoría los de la familia LAB (lactic acid bacteria, por sus siglas en inglés) (Nout et al., 1989) y en los cuales *Lactobacillus* sp., al igual que otros microorganismos que utilizan carbohidratos para su respiración, están presentes.

En la muestra del gandul crudo variedad *Lázaro* sin fermentar, los azúcares solubles detectados fueron fructosa, glucosa, galactosa, sacarosa, rafinosa y estaquiosa (ver Figura 3). Galactosa se encontró en muy bajas cantidades.

A.




B.

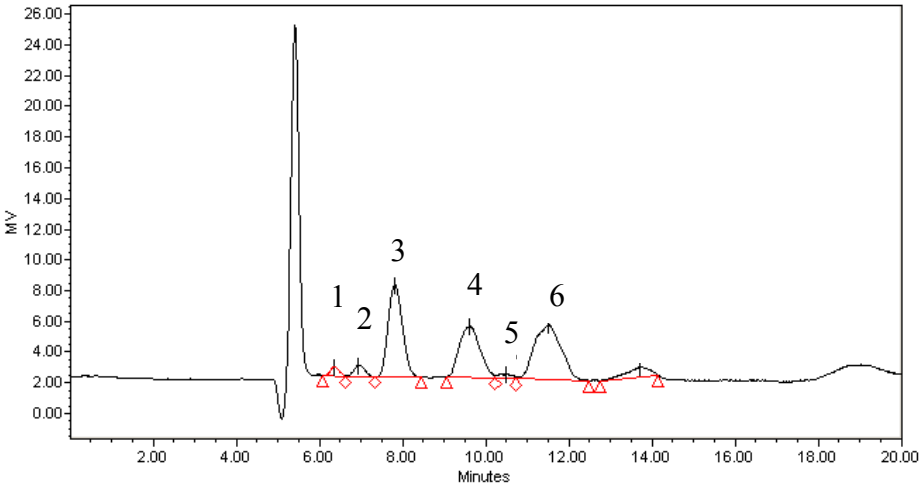



**Figura 3.** Cromatogramas de azúcares solubles. A. Estándares de azúcares; B. Gandul crudo (muestra control) ; 1. estaquiosa; 2. rafinosa; 3. sacarosa; 4. glucosa; 5. galactosa; 6. fructosa.

Al final de la fermentación se encontró una disminución en la presencia de estaquiosa y rafinosa en las muestras fermentadas y un aumento de galactosa, como se esperaba, debido al rompimiento del enlace entre la molécula de sacarosa y galactosa de la rafinosa y la estaquiosa. (ver Figura 4).

La presencia de galactosa y la disminución de estaquiosa y rafinosa en las muestras fermentadas se justifican por el rompimiento de los enlaces α-galactosídicos entre sacarosa y galactosa para la molécula de rafinosa así como también entre galactosa

y galactosa para la molécula de estaquiosa. Un estudio realizado por Premi et al. (1972) en trece sepas de *Lactobacillus* sp. demostró que la enzima predominante era galactosidasa, mientras que en otro estudio se logró aislar la enzima α-galactosidasa producida por *Lactobacillus acidofilus* (Fazardi et al., 2011).

En la Tabla 11 se presentan en detalle los valores de los azúcares solubles en gramos por cada 100 gramos de muestra seca de gandul fermentado en cada tratamiento y el control.

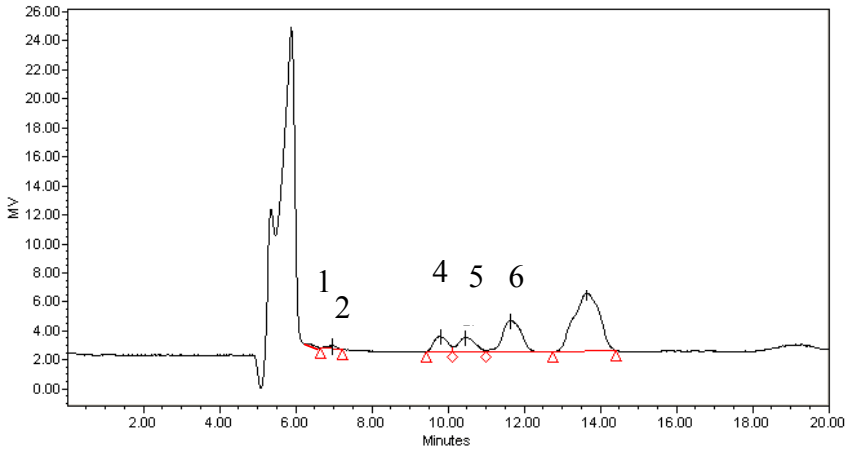
**Tabla 11.** Carbohidratos solubles en gandul crudo y fermentado.

| | **g/ 100g de materia seca** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Tratamiento** | **Estaquiosa** | **Rafinosa** | **Sacarosa** | **Glucosa** | **Galactosa** | **Fructosa** |
| Control | $0.155^{a}$ | $0.213^{a}$ | $1.440^{a}$ | $1.305^{a}$ | $0.095^{a}$ | $1.753^{a}$ |
| 28°C - 65.4h | $0.017^{b}$ | $0.058^{b}$ | $0.004^{b}$ | $0.279^{b}$ | $0.342^{b}$ | $0.682^{b}$ |
| 35°C - 57.7h | $0.001^{b}$ | $0.033^{b}$ | $0.050^{b}$ | $0.321^{b}$ | $0.211^{b}$ | $0.796^{bc}$ |
| 42°C - 51h | $0.013^{b}$ | $0.053^{b}$ | $0.150^{c}$ | $2.755^{c}$ | $0.554^{c}$ | $0.989^{c}$ |

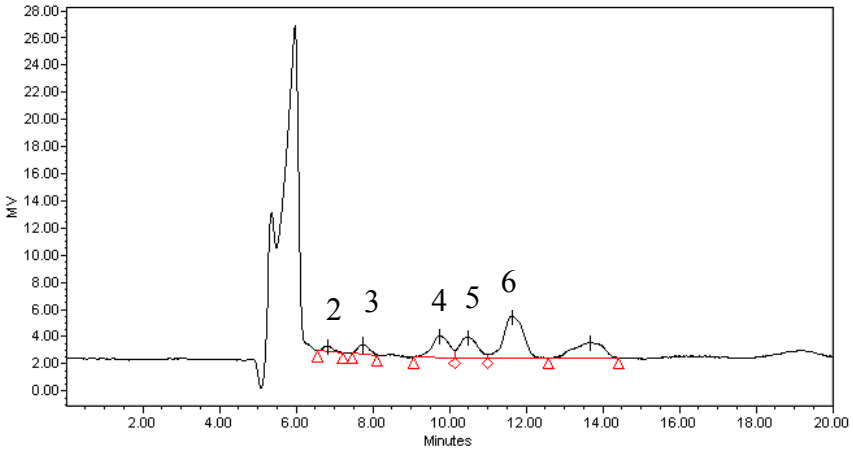
Medias seguidas por la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes ($p<0.05$)

En la muestra control se encontró estaquiosa con un 0.155% B.S. (Base Seca). En la literatura se presentan diversos valores de estaquiosa en gandul, desde 0.27% B.S. hasta 2.35% B.S. (Cazetta et al., 1991; Torres et al., 2006). Esto es debido a que la cantidad de galactósidos presente en las semillas verdes tiende a ser menor que en las semillas maduras (Bressani et al., 1986; Singh et al., 1984) y que la cantidad de estaquiosa y rafinosa presentes también dependen de la variedad de la semilla (Cazetta et al., 1991, Oboh et al., 2000). En este caso la variedad analizada fue " I-8-3-1, Lázaro" de la Estación Experimental de la Universidad de Puerto Rico en Isabela, la cual no cuenta con estudios previos sobre la cuantificación de la cantidad de α-galactósidos presentes. Existen variedades de gandul que presentan cantidades bajas de estaquiosa en su etapa de inmadurez, tales como la variedad "Kaki" con 0.27% B.S. y la variedad "Paraiba" con 0.47% B.S. (Cazetta et al., 1991).

A.




B.




C.

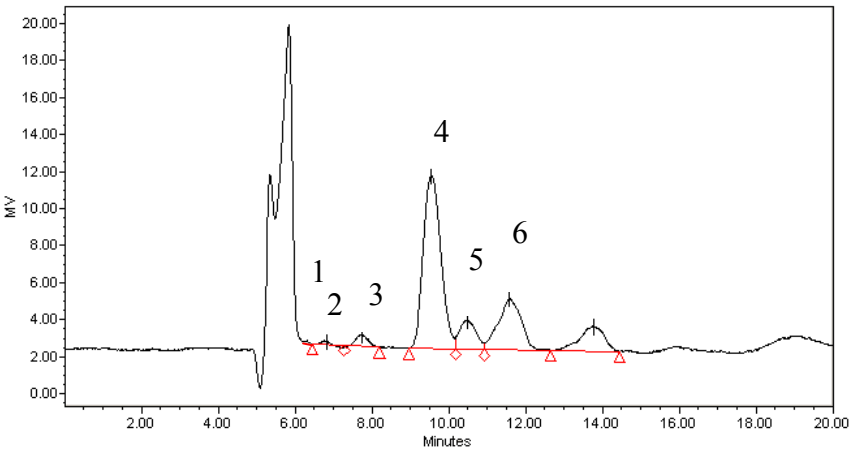



**Figura 4.** Cromatogramas de azúcares solubles. A. Tratamiento 28°C por 65.4 horas; B. Tratamiento 35°C por 57.7 horas; C. Tratamiento 42°C por 51 horas; 1. estaquiosa; 2. rafinosa; 3. sacarosa; 4. glucosa; 5. galactosa; 6. fructosa.

En el caso de la rafinosa, ésta se encontró en un 0.213% B.S. En general, la literatura reporta valores de rafinosa en gandul verde entre 0.3% B.S. a 1.8% B.S (Cazetta et al., 1991; Rao y Belavadi, 1978). Al igual que la estaquiosa, la variedad "Kaki" presenta valores pequeños de rafinosa con un 0.30% B.S. y la variedad "Paraiba" con 0.33% B.S. (Cazetta et al., 1991), la variedad PM-1 también presentó un valor de 0.30% B.S. (Rao y Belavady, 1978). En la mayoría de los estudios realizados se ha encontrado que en gandul existe más estaquiosa que rafinosa (Torres et al., 2006; Apata, 2008; Oboh et al., 2000). Sin embargo tanto la variedad "Lázaro" como la variedad "Kaki", presentan un comportamiento contrario, siendo rafinosa mayor que estaquiosa.

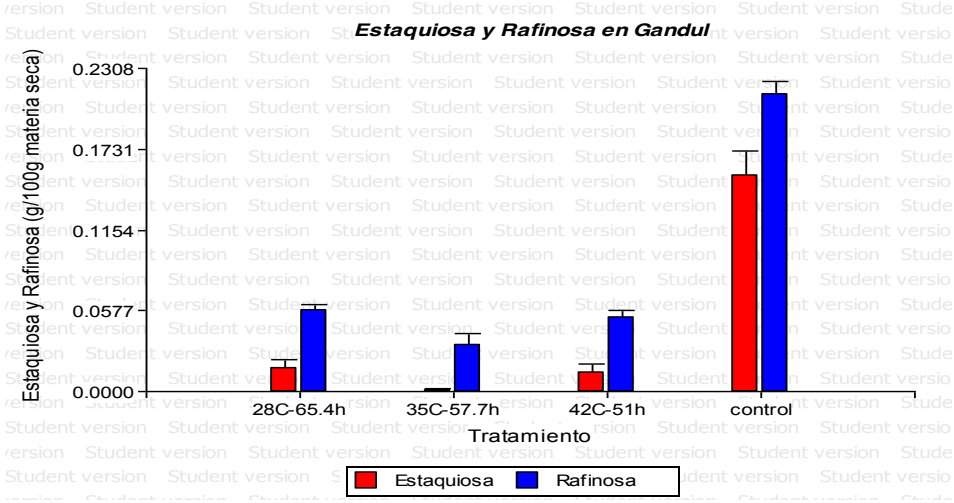
Después de la fermentación se encontraron cambios significativos en los valores finales de estaquiosa y rafinosa al comparar los tratamientos con el control. En la Tabla 11 se observa que no hay diferencia significativa entre los tratamientos, pero los tres tienen una disminución considerable de estaquiosa y rafinosa, y todos son diferentes al control. En el Gráfica 5 se demuestra que el tratamiento que tuvo más influencia en la eliminación de galactósidos fue el de 35°C por 57.7 horas en donde se observa que la estaquiosa se encuentra casi imperceptible y rafinosa disminuyó más que en los otros tratamientos aunque no fue significativo.

En el caso de estaquiosa, el tratamiento de 28°C por 65.4 horas tuvo una reducción del 89.4%, mientras que el tratamiento de 35°C por 57.7 horas tuvo una disminución de 99.3% y, finalmente, el tratamiento de 42°C por 51 horas tuvo una reducción del 91.6%. En la literatura se encuentra referencia de fermentación de gandul para la elaboración de pasta suplementada, se utilizó el tratamiento de 42°C por 48 horas en gandul variedad "aroíto" y se encontró una reducción de estaquiosa en un 88.1% (Torres et al., 2006). Este valor se encuentra muy cercano al obtenido en la presente investigación bajo condiciones similares.

En cuanto al cambio en rafinosa, el tratamiento de 28°C por 65.4 horas tuvo una reducción del 72.8%, mientras que el tratamiento de 35°C por 57.7 horas tuvo una disminución de 84.5% y, finalmente, el tratamiento de 42°C por 51 horas tuvo una

reducción del 75.11%. Al comparar este último valor con los publicados por Torres et al. (2006), en el tratamiento a 42°C por 48 horas se encuentra una disminución mayor de 89.4%. Se debe tomar en cuenta que la flora microbiana naturalmente presente en el gandul puede encontrarse en concentraciones diferentes y la variedad de microorganismos pueden variar.

La presente investigación basó sus tiempos y temperaturas de fermentación en una curva propuesta por una investigación con lentejas. En ésta, un tratamiento similar de 28°C por 65 horas tuvo una disminución de 77% de estaquiosa y una disminución de 95.5% para rafinosa, mientras que el tratamiento de 42°C por 51 horas tuvo una disminución de 90.5% para estaquiosa y una disminución del 100% para rafinosa, pues después de las 48 horas de tratamiento ésta no fue detectada (Frias et al., 1996). Se observa que hay una mayor reducción de rafinosa que estaquiosa en ambos tratamientos, para la presente investigación es el caso contrario, se encuentra una mayor reducción de estaquiosa que rafinosa.




**Gráfica 5.** Disminución de α-galactósidos en la fermentación de gandul en tres diferentes tratamientos.

En cuanto a los monosacáridos (glucosa, fructosa y galactosa) y sacarosa sufrieron cambios durante la fermentación también. Los microorganismos de la familia LAB utilizan carbohidratos como sustrato, especialmente glucosa, fructosa y sacarosa, y los convierte en energía celular y el subproducto lactato, el que a su vez en una

fermentación anaeróbica se convertirá en ácido láctico. Esto trae un consumo de glucosa, fructosa y sacarosa debido a que los microorganismos los utilizan para su crecimiento. En la Tabla 11 se observan los cambios de estos azúcares durante la fermentación.

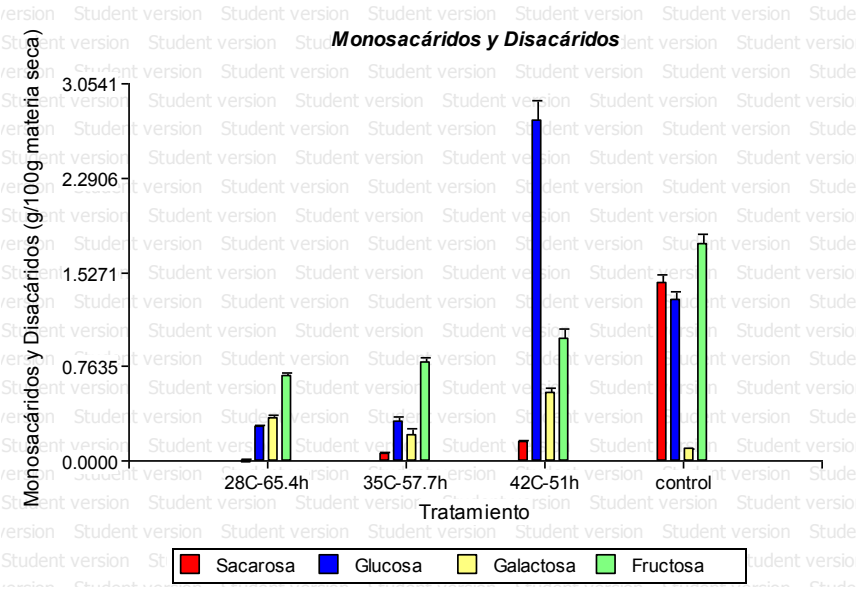
Para sacarosa, se encontró una reducción en todos los tratamientos y todos fueron diferentes al control. No se encontró diferencia significativa entre los tratamientos de 28°C y 35°C. Ambos tuvieron reducciones del 99.7% y del 96.5%, respectivamente. El tratamiento a 42°C tuvo la menor reducción con 89.6%. Torres et al. (2006), reportan una disminución en sacarosa de 91.5% para el tratamiento de 42°C por 48 horas, valor similar al reportado en esta investigación. La fermentación en lentejas también trajo consigo disminuciones similares: 95% en el tratamiento a 28°C y 96.8% para el tratamiento de 42°C (Frías et al., 1996).

En el caso de glucosa y fructosa no se observa una tendencia entre tratamientos (Ver Gráfica 6), pero todos los tratamientos fueron diferentes al control. Se obtuvieron valores finales de glucosa y fructosa sin diferencia significativa en los tratamientos de 28°C y 35°C, ambos menores al control. En el caso del tratamiento de 42°C se obtuvo un valor de glucosa mayor al control, esto se puede deber a que este tratamiento por tener una buena temperatura para el crecimiento, provoca que haya más producción de ácido láctico, lo que provoca una disminución del pH más rápida.

Al encontrarse con valores de pH cercanos a 4 en 24 horas de fermentación provoca que la densidad de la población comience a disminuir (Witzes et al., 1995), haciendo que el consumo de sacarosa se pare y, por lo tanto, la glucosa y fructosa obtenidas de la ruptura de sacarosa también cesarán de ser consumidas. En el caso de la fructosa en el tratamiento de 42°C, no fue mayor al control pero se encuentra que no hay diferencia significativa con el tratamiento de 35°C.

Finalmente galactosa, un azúcar que no se encontró en grandes cantidades en la semilla cruda (0.095%), pues se espera que se encuentre enlazado a la sacarosa de

rafinosa y estaquiosa, se encontró en el gandul fermentado, como se tenía contemplado. No se detectó diferencia significativa en los valores para el tratamiento de 28°C y 35°C. La mayor cantidad de galactosa detectada fue en el tratamiento a 42°C con un 0.554%.




**Gráfica 6.** Comportamiento de monosacáridos y disacáridos en la fermentación de gandul y control en tres diferentes tratamientos.

Todos los azúcares tuvieron algo en común, y fue que se obtuvo el mismo efecto en las cantidades finales de glucosa, fructosa, galactosa y sacarosa para las temperaturas de 28°C y 35°C. Las cantidades para cada uno fueron significativamente similares para cada azúcar, incluyendo rafinosa y estaquiosa. Otra razón por la cual los tratamientos de 28°C y 35°C pudieron tener los mismos resultados se puede deber a que la actividad de la enzima α-galactosidasa se encontraba en un pH óptimo de 5.5. Sin embargo entre un pH de 4.0 y 6.0, a temperatura de 37°C, puede mantenerse estable (Fazardi et al., 2011).

## 4.3 Análisis de aminoácidos totales en gandul fermentado y control

El análisis de aminoácidos se llevó a cabo con el objetivo de determinar el contenido de éstos en el gandul variedad "Lázaro" y determinar si existía algún efecto de la fermentación en ellos. En la Tabla 12 se presentan los promedios de los aminoácidos obtenidos del gandul control y el gandul fermentado. No se encontró diferencia

significativa entre los tratamientos, ni tampoco con el control. Lo que significa que la fermentación no tuvo efecto sobre los aminoácidos del gandul. Este factor es importante, debido a que los aminoácidos esenciales siguen presentes. Una investigación similar en la cual se fermentó gandul a 42°C por 48 horas presenta el perfil de aminoácidos para la muestra cruda y la muestra fermentada. Se encontró diferencia significativa en los valores de glicina, treonina, alanina, valina, lisina y leucina, con un leve aumento no mayor de 0.3g/ 100g de proteína (Martínez-Villaluenga et al., 2010).

**Tabla 12.** Perfil de aminoácidos totales en gandul crudo y fermentado variedad *Lázaro*.

| | **Tratamiento (g/100g proteína base seca)** | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Aminoácido** | **Control** | **28°C-65.4h** | **35°C-57.7h** | **42°C-51.0h** |
| Ácido Aspártico | 4.12 | 4.03 | 3.78 | 5.24 |
| Serina | 2.33 | 2.92 | 3.29 | 2.28 |
| Ácido Glutámico | 5.57 | 5.22 | 4.88 | 6.19 |
| Glicina | 1.70 | 2.13 | 2.61 | 2.23 |
| Histidina* | 4.70 | 4.42 | 4.39 | 4.22 |
| NH3 | 2.13 | 1.53 | 1.52 | 1.04 |
| Arginina | 5.53 | 5.90 | 5.91 | 5.37 |
| Treonina* | 3.29 | 3.40 | 3.78 | 3.41 |
| Alanina | 3.81 | 3.54 | 3.63 | 3.61 |
| Prolina | 4.42 | 4.44 | 5.04 | 5.00 |
| Cisteína* | 1.78 | 2.21 | 2.60 | 2.76 |
| Tirosina* | 4.12 | 4.05 | 4.16 | 4.22 |
| Valina* | 4.51 | 4.54 | 4.96 | 4.98 |
| Metionina* | 2.85 | 2.67 | 2.95 | 3.02 |
| Lisina* | 3.46 | 3.78 | 4.03 | 4.15 |
| Isoleucina* | 4.35 | 4.40 | 4.70 | 4.88 |
| Leucina* | 4.95 | 5.53 | 5.98 | 5.89 |
| Fenilalanina* | 4.90 | 5.63 | 5.97 | 5.96 |

Valores obtenidos basándose en la proteína encontrada para cada tratamiento (ver análisis proximal).
*Aminoácido esencial

Aunque los valores presentados en la presente investigación no presentaron diferencia, se puede observar una tendencia de aumento para los aminoácidos prolina, cisteína, valina, lisina, leucina, isoleucina y fenilalanina (ver Gráfica 7). El incremento

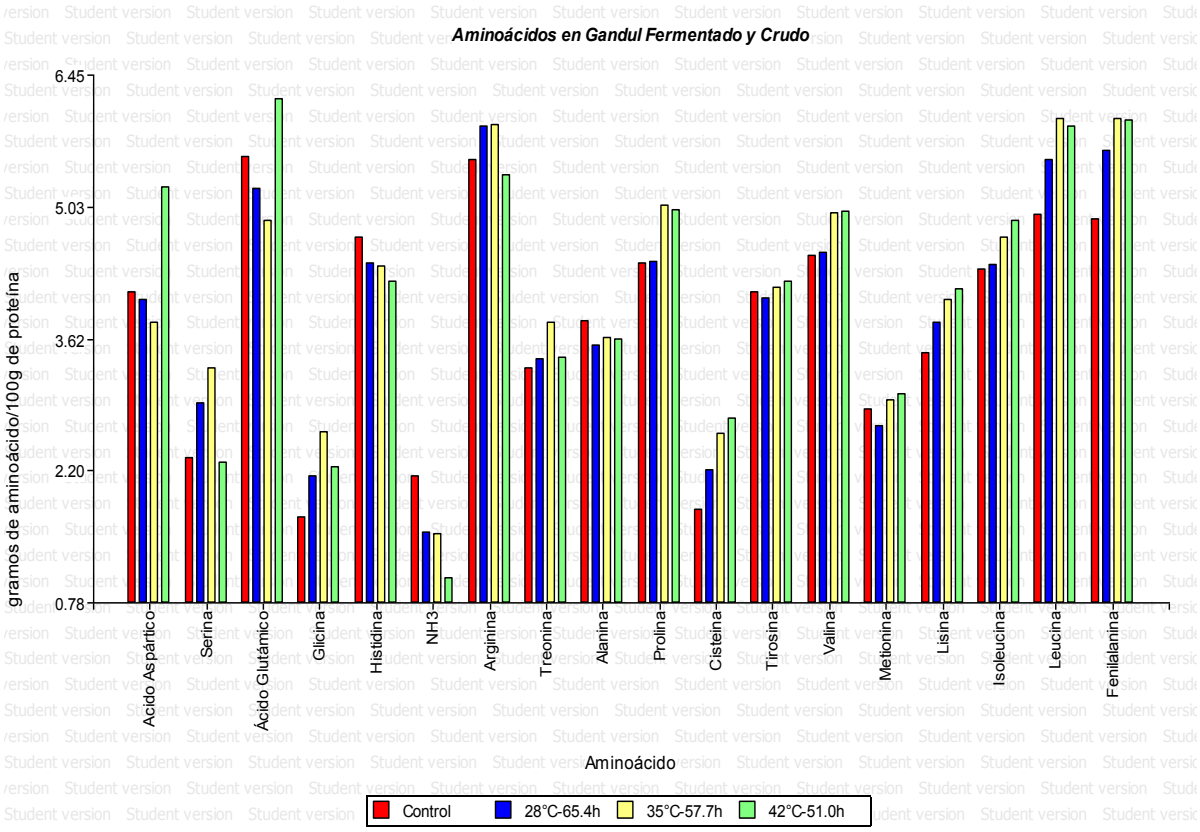
en aminoácidos puede atribuirse al aumento significativo en el nitrógeno proteico y no proteico que toma lugar en las fermentaciones de leguminosas debido al crecimiento y actividad proteolítica de microorganismos responsables del proceso de fermentación (Martínez-Villaluenga et al., 2010).

Varios autores han investigado sobre el contenido de aminoácidos en el gandul (Martínez-Villaluenga et al., 2010; Oshodi et al., 1993; Bressani et al., 1986; Singh et al., 1984), y reportan que los valores varían dependiendo la variedad. Al no encontrarse diferencia significativa entre ningún valor, se puede obtener un rango para cada aminoácido en la proteína de gandul variedad "Lázaro". En la Tabla 13, se presentan en detalle los rangos de aminoácidos obtenidos en esta investigación comparados con los rangos reportados en la literatura. Triptófano no es reportado debido a que el método AccQ.Tag® no lo contempla en sus estándares pues este tiene muchos problemas para ser hidrolizado. (Martínez Villaluenga et al., 2010; Bressani et al., 1986).

En la tabla 13 se puede observar que hay ciertas variaciones entre los rangos de algunos aminoácidos. Los aminoácidos serina, histidina, argninina, treonina, prolina, valina, isoleucina, leucina y fenilalanina se encontraron entre los rangos reportados por la literatura. En el caso del ácido glutámico, los valores encontrados se encuentran en un grado mucho menor que los reportados por la literatura. Se puede sospechar que parte del ácido glutámico pudo haber sido transformado a glutamina por medio de acción enzimática o también pudo haber sido transformado a prolina por medio de la reducción de un grupo γ-carboxilo, el cual es reducido a aldehído y este a su vez reacciona con el grupo amino eliminando agua y formando una base de Schiff, la cual en una segunda reducción se transforma en prolina. El ácido aspártico presenta un comportamiento similar al ácido glutámico. Éste también es precursor de otros aminoácidos y también puede ser transformado en asparagina en una reacción de competencia en la misma planta (Azevedo et al., 2006). Glutamina y asparagina no se encuentran contemplados en el método de detección de aminoácidos, AccQ-Tag.

En cuanto a cisteína y metionina, todos los autores reportan valores muy pequeños y algunos reportan no detección (Bressani et al., 1986). Esto lo atribuyen a la destrucción

de los aminoácidos durante la hidrólisis con HCl 6N por oxidación. En la literatura se recomienda utilizar otros métodos para hidrolizar la muestra, modificando la muestra o adicionando un agente reductor (Smith, 1997). Puede ser que el método de derivatización también influya en la detección de cisteína y metionina. Según el método utilizado y patentado por Waters Corporation, en el cual se utiliza el pre-derivatizante AQC (*AQC-6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl, NHS-N-hydroxysuccinimidyl, AMQ-6-aminoquinoline)* de alta resolución, cisteína y metionina pueden ser detectados sin problema, esto pudo ser observado en las muestras de gandul "Lázaro", encontrándose valores más altos a los reportados por la literatura, entre 1.78g/100g de proteína hasta 2.76g/100g de proteína. En las Figuras 5 a la 8 se presentan los cromatogramas para los estándares y los aminoácidos totales en el gandul crudo. En estos se observa que cisteína y metionina fueron detectados y no se perdieron durante la hidrólisis.




**Gráfica 7.** Perfil de aminoácidos en gandul "Lázaro", control y tratamientos.

**Tabla 13.** Rango de aminoácidos totales en gandul variedad *Lázaro* y gandul (Cajanus Cajan) reportado en la literatura.

| | **Aminoácidos en Gandul "Lázaro" ( g/ 100g de proteína)** | ***Aminoácidos en Gandul revisión de literatura (g/100g de proteína)** |
|---|---|---|
| Ácido Aspártico | 3.78 - 5.24 | 7.4 - 7.73 |
| Serina | 2.28 - 3.29 | 2.85 - 5.45 |
| Ácido Glutámico | 4.88 - 6.19 | 16.29 - 17.77 |
| Glicina | 1.7 - 2.61 | 3.02 - 4.19 |
| Histidina | 4.22 - 4.7 | 3.04 - 5.31 |
| Arginina | 5.37 - 5.91 | 4.61 - 7.73 |
| Treonina | 3.29 - 3.78 | 3.1 - 5.41 |
| Alanina | 3.54 - 3.81 | 3.58 - 5.46 |
| Prolina | 4.42 - 5.04 | 4.13 - 6.0 |
| Cisteína | 1.78 - 2.76 | 0.99 - 1.15 |
| Tirosina | 4.05 - 4.22 | 2.05 - 3.62 |
| Valina | 4.51 - 4.98 | 3.9 - 5.62 |
| Metionina | 2.67 - 3.02 | 0.88 - 1.65 |
| Lisina | 3.46 - 4.15 | 4.7 - 7.2 |
| Isoleucina | 4.35 - 4.88 | 3.24 - 5.32 |
| Leucina | 4.95 - 5.98 | 5.95 - 9.15 |
| Fenilalanina | 4.9 - 5.97 | 5.64 - 8.56 |

*(Martínez-Villaluenga et al., 2010; Oshodi et al., 1993; Bressani et al. 1986; Singh et al. 1984)

Tirosina también presentó valores más altos a los reportados por la literatura. Los valores bajos presentados en la literatura son adjudicados a la hidrólisis con HCl 6N, en la cual el grupo fenólico de la tirosina es modificado por trazas de radicales de hipoclorito presentes en el ácido (Smith, 1997). Al igual que en el caso de metionina y cisteína, se puede pensar que el derivatizante y el detector de fluorescencia tienen más resolución lo que pudo traer resultados más altos o que la hidrólisis no tuvo efectos negativos en estos aminoácidos.

En el caso de lisina y glicina, se encontraron valores menores al rango reportado en la literatura. No se reportan problemas con la hidrólisis que puedan provocar una baja en estos aminoácidos, lo que sugiere que estos valores pueden encontrarse en una menor cantidad en el gandul de la variedad "Lázaro". Lisina es el aminoácido esencial con

mayor atención e importancia no solo por ser un factor importante en la reacciones de Maillard, en donde se desnaturaliza en presencia de azúcares reductores y una temperatura apropiada, sino también por ser un aminoácido limitante en los cereales, especialmente el trigo (WHO/FAO/ONU, 2002). Es reconocido como el primer aminoácido limitante y la mayoría de punteos de calidad de proteína son basados en él. A parte de la reacción de Maillard, lisina también forma parte de reacciones como la β-eliminación por sus grupos nucleofílicos ($NH_2$) que pueden reaccionar con dehidroalanina, formando subproductos como lisonalanina, quitándole la bio-disponibilidad a este aminoácido esencial (Wong, 1989).

La proteína de gandul tendría un puntaje de aminoácidos basado en su aminoácido esencial limitante, que en este caso es lisina. La Organización Mundial de la Salud (2002), propone buscar el punteo del aminoácido limitante de las proteínas y corregirlo por la digestibilidad *in vivo* de las mismas y así determinar el PDCAAS (*Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score*, por sus siglas en inglés), punteo el cual determina la calidad de la proteína. Si el valor resulta ser mayor o igual a 1, se considera como una proteína completa. En esta investigación solo se pudo determinar el puntaje de la proteína sin la corrección por la digestibilidad, debido a que esta prueba se realiza en un laboratorio con exámenes en ratas y el recinto universitario de Mayagüez no cuenta con esas instalaciones. La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\text{Punteo de aminoácido: } \frac{\text{mg de aminácido en 1g de proteína evaluada}}{\text{mg de aminoácido limitante en un patrón de requerimiento}}$$

En la presente investigación se encontraron valores de lisina desde 31.5mg de lisina/g de proteína hasta 41.5mg de lisina/g de proteína, lo que da un punteo entre 0.70 a 0.92, en promedio 0.86. Se realizó el cálculo para todos los aminoácidos esenciales en el gandul y se encontró que todos los aminoácidos alcanzaron un puntaje mayor a uno a excepción de lisina y leucina. El aminoácido con menor puntaje fue lisina, lo que lo convierte en el limitante.

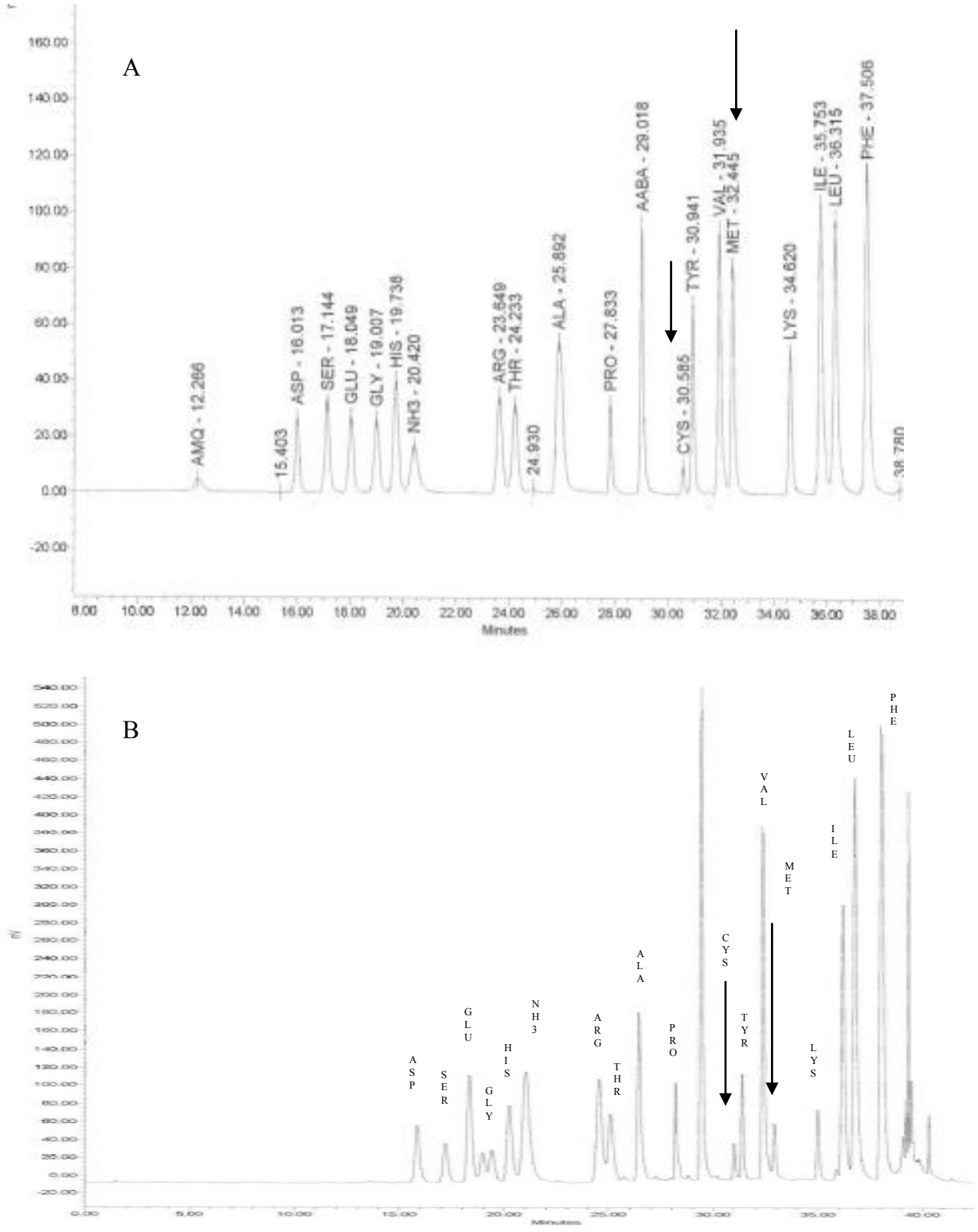



**Figura 5.** Cromatogramas de aminoácidos en gandul. A. Estándares de aminoácidos. B. Muestra control de gandul "Lázaro".

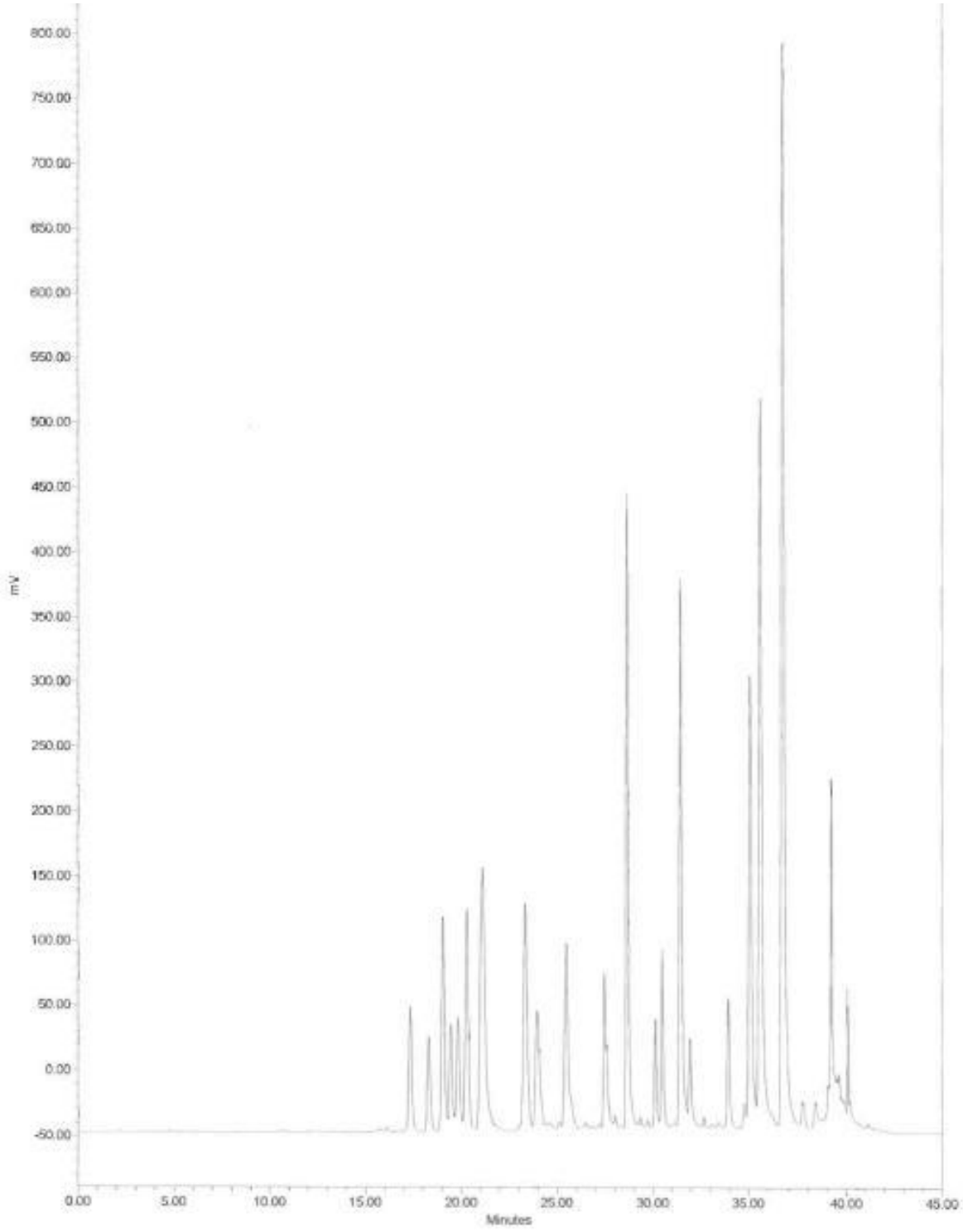



**Figura 6.** Cromatograma de aminoácidos en gandul. Tratamiento 28°C por 65.4 horas;

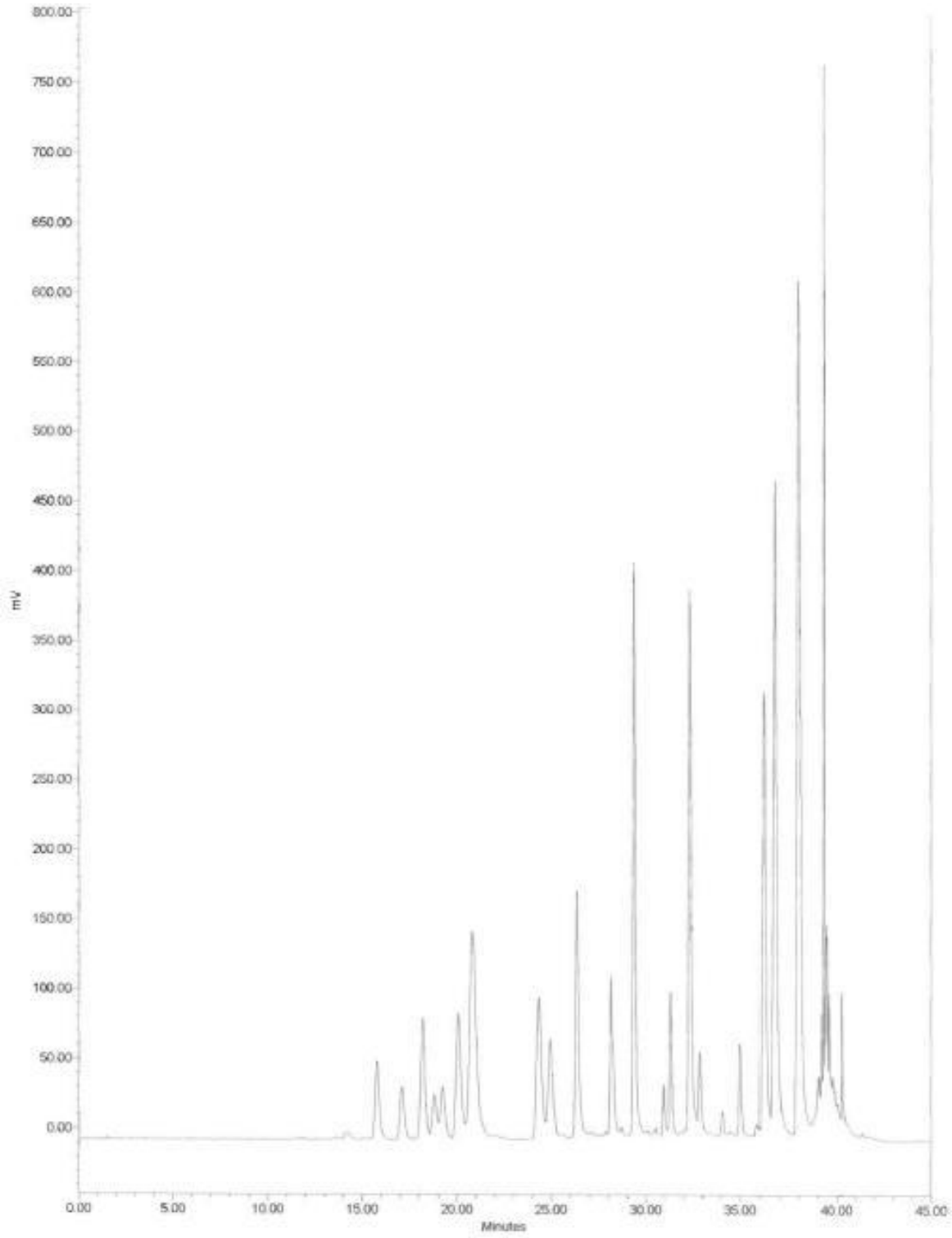



**Figura 7.** Cromatograma de aminoácidos en gandul. Tratamiento 35°C por 57.7 horas.

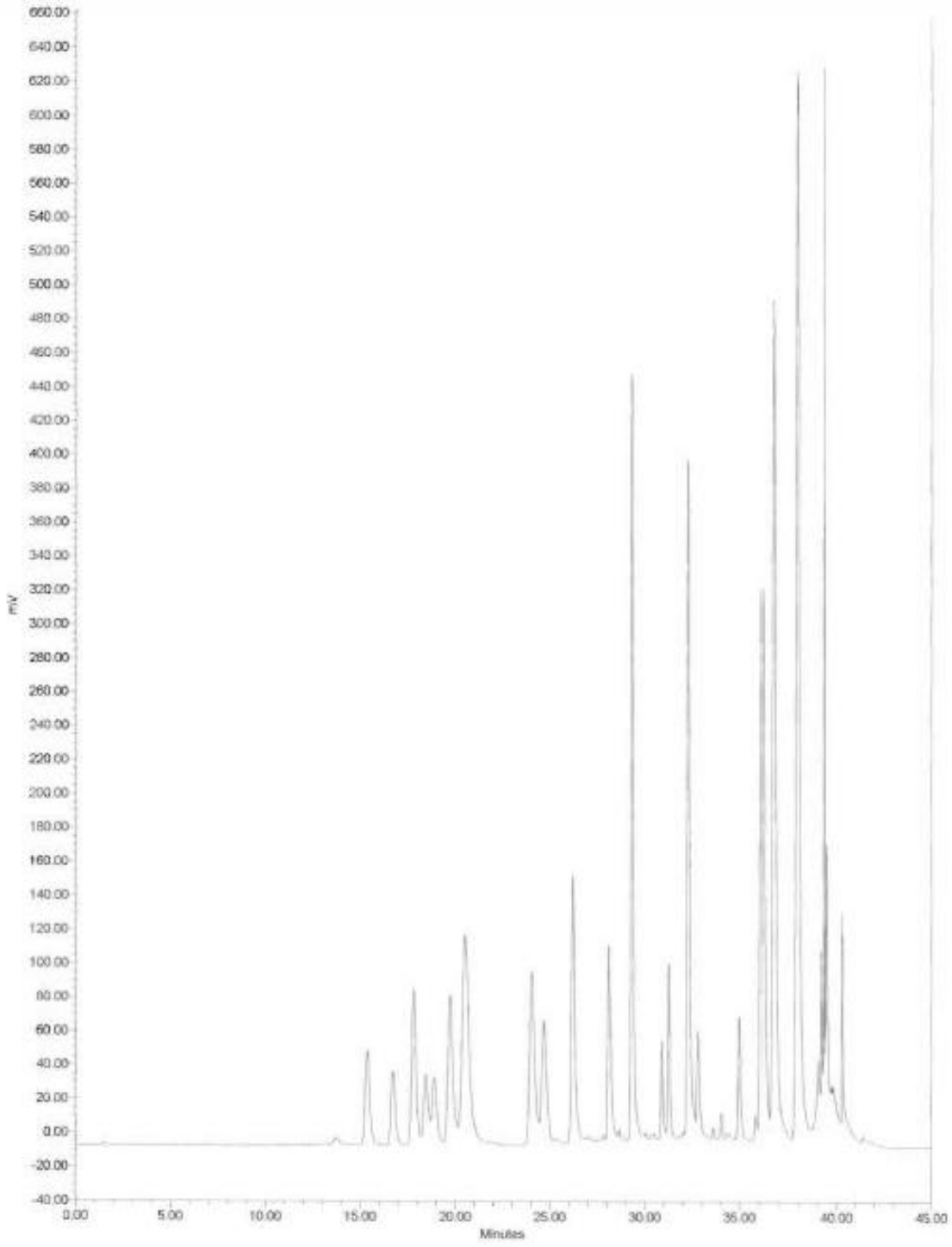



**Figura 8.** Cromatograma de aminoácidos en gandul. Tratamiento 42°C por 51 horas.

## 4.4 Análisis de aminoácidos totales en arroz crudo y pre-gelatinizado

Se realizó el análisis de aminoácidos al arroz crudo (control) y pre-gelatinizado para determinar si este tratamiento podría traer algún cambio en el perfil de aminoácidos y también para conocer con exactitud la cantidad de aminoácidos que tendría el arroz que se utilizaría como medio de absorción de agua y estabilizante para el producto que se desea preparar a base de gandul. Los resultados se presentan en la Tabla 14 junto a datos obtenidos de la literatura.

**Tabla 14.** Perfil de aminoácidos en arroz crudo y pre-gelatinizado.

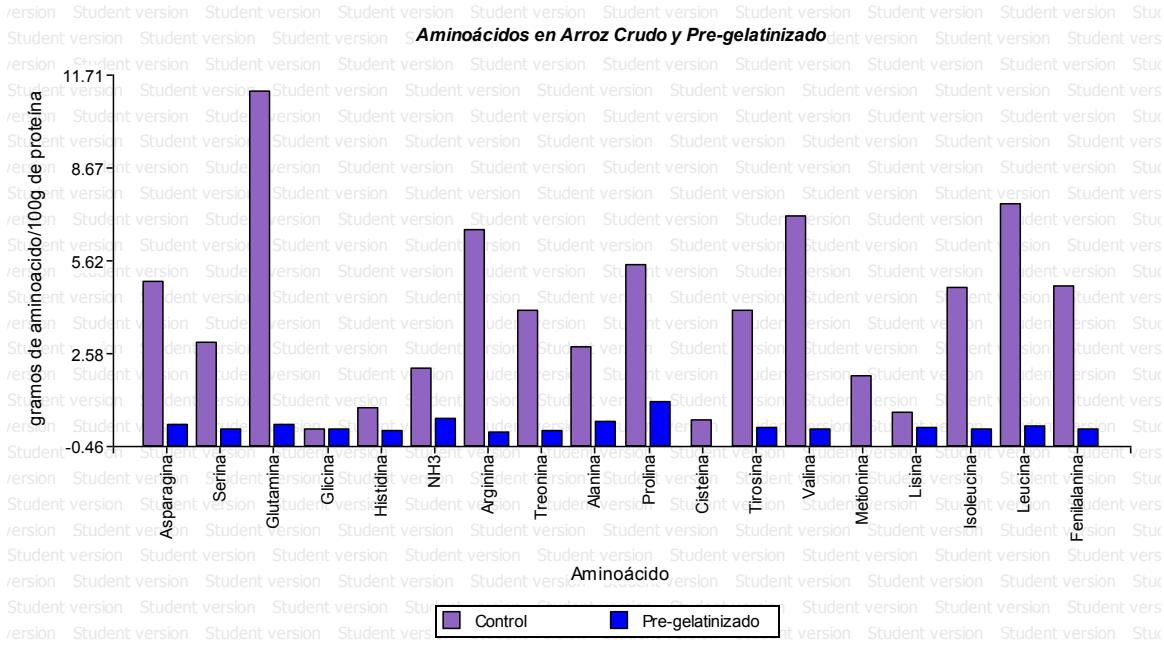
| | **Tratamiento (g/100g proteína)** | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Aminoácido** | **Control-Arroz crudo** | **Pre-gelatinizado** | **Houston et al., 1969** | **USDA, 2011** |
| Ácido Aspártico | 4.91[a] | 0.22[b] | 9.10 | 9.22 |
| Serina | 2.91[a] | 0.10[b] | 5.02 | 5.23 |
| Ácido Glutámico | 11.16[a] | 0.24[b] | 17.61 | 18.44 |
| Glicina | 0.09[a] | 0.07[a] | 4.53 | 4.55 |
| Histidina | 0.77[a] | 0.04[a] | 2.45 | 2.34 |
| NH3 | 2.09[a] | 0.43[b] | 2.76 | N/A |
| Arginina | 6.64[a] | 0.01[b] | 8.50 | 8.33 |
| Treonina | 3.97[a] | 0.05[b] | 3.48 | 3.57 |
| Alanina | 2.80[a] | 0.34[b] | 5.48 | 5.79 |
| Prolina | 5.48[a] | 0.97[b] | 4.18 | 4.70 |
| Cisteína | 0.40 | ND | 2.44 | 2.04 |
| Tirosina | 3.98[a] | 0.15[b] | 4.57 | 3.34 |
| Valina | 7.06[a] | 0.09[b] | 5.92 | 6.10 |
| Metionina | 1.81 | ND | 2.61 | 2.34 |
| Lisina | 0.61[a] | 0.14[b] | 3.80 | 3.61 |
| Isoleucina | 4.75[a] | 0.07[b] | 4.46 | 4.31 |
| Leucina | 7.46[a] | 0.19[b] | 7.58 | 8.26 |
| Fenilalanina | 4.77[a] | 0.10[b] | 5.00 | 5.34 |

Medias seguidas por la misma letra en la misma línea no son significativamente diferentes ($p<0.05$)

La muestra de arroz crudo presenta un perfil de aminoácidos cuyos valores se comparan con los reportados en la literatura incluidos en la Tabla 14. Al igual que en las

muestras de gandul, el ácido glutámico y el ácido aspártico reportaron valores menores que los esperados. Esto pudo deberse a la posible transaminación de estos ácidos que se pudieron haber convertido en glutamina y asparagina, así como prolina (Azevedo et al., 2006). Puede ser que debido a esta razón, se encuentre más prolina que la reportada en la literatura.

Los aminoácidos glicina, histidina, alanina, cisteína, metionina, lisina y fenilalanina también se obtuvieron en valores menores a los esperados. En el caso de cisteína y metionina, se espera que durante la hidrólisis haya una posible oxidación de los compuestos azufrados lo que ocasiona la descomposición de estos aminoácidos (Smith, 1997). En el caso del gandul no se observaron valores bajos, sin embargo, se debe tomar en cuenta que la matriz del arroz no es la misma que el gandul, pues es rica en carbohidratos estando en base seca, lo que promueve una hidrólisis diferente y pudo haber favorecido la oxidación de estos aminoácidos. Los valores encontrados en el gandul crudo para treonina, tirosina, valina, isoleucina y leucina, se encuentran entre los rangos reportados por Houston (1969) y USDA (2011).




**Gráfica 8.** Perfil de aminoácidos en arroz crudo y pre-gelatinizado.

Se observa que existe diferencia significativa y considerable entre los valores del arroz crudo y el arroz pre-gelatinizado (ver Gráfica 8) encontrándose una disminución de hasta 99% de los aminoácidos detectados. Esto al igual que la baja detección de aminoácidos en la muestra cruda puede deberse a varios factores que tienen que ver con la preparación de la muestra de arroz para la determinación de aminoácidos.

La naturaleza de la muestra del arroz pre-gelatinizado y el proceso de hidrólisis y secado posterior durante la preparación para ser analizada por HPLC, pueden ser las principales causas de la baja detección de aminoácidos. El arroz crudo pasó por un proceso de modificación del almidón para hacerlo más soluble y que pudiera absorber más agua. El procedimiento para llevar a cabo esto requirió el remojo del arroz en agua fría a 15°C por 3 horas y posteriormente a 65°C por 1 hora más, para después hacer dos tratamientos de 10 minutos con vapor de agua. Un proceso de pre-gelatinización puede traer consigo la liberación de monosacáridos como glucosa. Esto puede variar según la variedad del arroz. La presencia de glucosa puede afectar a los aminoácidos al ser propensos a llevar a cabo la reacción de Maillard durante los procesos de calentamiento e hidrólisis de la muestra. En un estudio en el cual se analizó el agua de remojo de arroz, se reportaron desde 0.09g de glucosa/litro hasta 0.62g por litro (Nakamura et al., 2011), lo que sugiere que actividad enzimática puede estar ocurriendo para la liberación de monosacáridos. En el caso del arroz pre-gelatinizado de esta investigación, el agua fue descartada sin embargo la muestra pudo quedarse con monosácaridos como glucosa libres.

La reacción de Maillard comprende muchas sub-reacciones importantes, entre ellas la formación de glicosilamina por medio de una base de Schiff, en donde el grupo carbonilo de la glucosa o un azúcar reductor reacciona con el grupo amino del aminoácido. Esta reacción es favorecida en condiciones de poco agua y es catalizada por ácido. Estas condiciones fueron proporcionadas durante la hidrólisis de la muestra para la detección de aminoácidos. Seguidamente, se da la formación del compuesto de Amadori en el cual la glicosilamina es transformada a ketamina. Esta reacción se da entre aldosas y grupos aminos libres de los aminoácidos, péptidos y proteínas. Los compuestos de

Amadori sufren cambios posteriores debido a la interacción con grupos amino cargados positivamente. Esta degradación se debe a la presencia de condiciones ácidas. (Wong, 1989) .

La investigación realizada por Wellner y demás investigadores (2011), sustenta la teoría de que los aminoácidos en el arroz pre-gelatinizado pudieron haberse perdido por reacción de Maillard durante el proceso de hidrólisis y posterior secado por horno para la preparación de la muestra para el análisis de aminoácidos por HPLC. Ellos buscaron la identificación de compuestos de Amadori y N-(2-furoylmethyl) aminoácidos (FMAAS por sus siglas en inglés), compuestos provenientes del compuesto de Amadori que se forman por hidrólisis ácida. Para ellos poder contar con estándares de estos compuestos, colocaron aminoácidos (alanina, lisina, leucina, isoleucina, valina y glicina) y glucosa en un sistema de reflujo a 90°C por 8 horas. Con este proceso se obtuvieron aminoácidos en forma de N-(1-Desoxy-D-fructosyl) los cuales son llamados Compuestos de Amadori y que posteriormente fueron convertidos a FMAAS con la ayuda de hidrólisis con HCL 12M a 110°C por 23 horas. En el proceso llevado a cabo en la presente investigación, se cree que el arroz pre-gelatinizado cuenta con más glucosa disponible la cual al encontrarse bajo condiciones ácidas a temperaturas altas pudo haber reaccionado con los aminoácidos presentes que se iban liberando por la hidrólisis. Además que el proceso de secado del ácido posterior a la hidrólisis por 24 horas para la preparación de la muestra para HPLC, no se realizó al vacío como muchos autores sugieren (Smith, 1997; Wellner, 2011; Cooper et al., 2011), se hizo en un horno a 100°C, lo que pudo también promover la reacción de Maillard.

Durante la pre-gelatinización del arroz también se pudieron haber perdido aminoácidos libres por disolución en el agua. En una investigación donde se remojó el arroz por 4 horas trajo un aumento en la cantidad de aminoácidos libres (Saikusa et al., 1994), mientras que en otra investigación en la cual el arroz fue sumergido en agua y pasado por un tratamiento de calor obtuvieron una liberación de aminoácidos hasta de 0.53g/100g de proteína. Estos aminoácidos son solubles en agua, por lo que se puede

sospechar que se tuvo una pérdida mínima de aminoácidos en el agua de remojo del arroz pre-gelatinizado en esta investigación.

## 4.5 Análisis proximal de gandul

Se llevó a cabo un análisis proximal del gandul y el arroz para determinar su composición a nivel macro y se llevó a cabo un análisis de la fibra cruda del gandul, para poder tener una idea los carbohidratos insolubles presentes. Todos los valores son reportados en base seca. No se encontró diferencia significativa entre la composición proximal del gandul crudo y los tratamientos, así como no se encontró diferencia entre tratamientos (ver Tabla 15). Se puede observar que la proteína presenta un valor mayor en el gandul fermentado, pero aun así este valor no es significativamente diferente. Estos valores concuerdan con los valores reportados en la literatura. Torres et al. (2006) presenta un porcentaje de grasa de 2.36% para el gandul crudo y 2.89% para el gandul fermentado, así también presenta un porcentaje de ceniza de 3.99% para el gandul crudo y 2.37% para el fermentado. En otro estudio se presentan valores de grasa de 2.4%, proteína en 21.4%, cenizas en 4.6% y carbohidratos en 55.4% (Bressani et al., 1986). Se debe tomar en cuenta que estos valores pueden variar dependiendo de la variedad del gandul estudiado. Lo importante de esto es recalcar el hecho de que el gandul en base seca proporciona un alto contenido de proteína a la dieta, además, por su alto contenido de cenizas, se puede inferir que es también fuente de minerales.

**Tabla 15.** Análisis proximal de gandul crudo y fermentado

| **Tratamiento** | **%Grasa B.S.** | **% Ceniza B.S.** | ***%Proteína B.S.** | **%Carbohidratos B.S.** |
|---|---|---|---|---|
| Control Gandul | 2.27 | 3.92 | 21.95 | 71.85 |
| 28°C-65.4h | 2.67 | 3.63 | 23.42 | 70.28 |
| 35°C-57.7h | 2.56 | 3.48 | 23.19 | 70.76 |
| 42°C-51.0h | 2.64 | 3.45 | 23.10 | 70.80 |

* Proteína= %Nitrógeno * 6.25

## 4.6 Análisis de fibra cruda para gandul

Se realizó un análisis de fibra cruda para determinar la cantidad de carbohidratos no solubles y si la fermentación tuvo algún efecto sobre ellos. No se encontró diferencia significativa en la cantidad de fibra cruda entre tratamientos y el control. Se encontró un valor inicial de 11.84% en el gandul sin tratamiento, mientras que la literatura reporta valores de 0.2% (Bressani et al. 1986). La Asociación Dietética Americana recomienda el consumo de 20 a 35 gramos de fibra diaria. El gandul puede aportar más del 10% de fibra por cada 100 que se consuma de éste, al adicionarlo a la dieta, se obtiene una cantidad apreciable de la misma. Los datos se encuentran en la Tabla 16.

**Tabla 16.** Análisis de fibra cruda en gandul crudo y fermentado

| **Tratamiento** | **%Fibra Cruda B.S** |
|---|---|
| Control Gandul | 11.84 |
| 28°C-65.4h | 13.40 |
| 35°C-57.7h | 10.31 |
| 42°C-51.0h | 9.40 |

Medias no son significativamente diferentes ($p<0.05$).

## 4.7 Análisis proximal del arroz

El análisis proximal del arroz fue realizado para determinar si existía algún efecto de la pre-gelatinización en la composición final del mismo. En la Tabla 17 se presentan los resultados. Se encontraron diferencias significativas para los valores de ceniza, proteína y carbohidratos. No se encontró efecto significativo en la grasa del arroz debido al tratamiento de pre-gelatinización. Según valores reportados por USDA (2011), la harina de arroz debería presentar porcentajes de grasa en base seca del 0.67%, proteína base seca en 7.59%, y carbohidratos base seca en 91.08%. Otros autores reportan valores más altos de proteína, de 7.31% hasta 8.50%, y demuestran que la variedad del arroz tiene efecto sobre la composición final (Houston et al., 1969).

**Tabla 17.** Análisis proximal del arroz crudo y pre-gelatinizado

| Tratamiento | %Grasa B.S. | % Ceniza B.S. | * %Proteína B.S. | %Carbohidratos B.S. |
|---|---|---|---|---|
| Arroz Control | 1.11[a] | 0.30[a] | 8.50[a] | 90.09[a] |
| Arroz Pre-gelatinizado | 0.42[a] | 0.14[b] | 7.88[b] | 91.56[b] |

Medias seguidas por la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes ($p<0.05$)
*Proteína= %Nitrógeno * 5.95

En general se encontraron valores menores de ceniza y proteína para el arroz pre-gelatinizado y un aumento en los carbohidratos del mismo. La explicación para la disminución de proteína, se debe al rompimiento y pérdida de aminoácidos libres durante el proceso de pre-gelatinización. Dado a que el arroz se encontró en remojo por tres horas a 15°C y una hora más a 65°C, los aminoácidos libres pudieron haberse disuelto en el agua, la cual fue posteriormente descartada. Esto pudo traer una disminución en la proteína. Al encontrarse un valor menor en la proteína los carbohidratos aumentarían debido a que éstos son calculados por diferencia.

## 4.8 Propiedades de hidratación de la harina de arroz

Se ha demostrado que la unión de cereales y leguminosas puede dar como resultado la creación de una proteína con un perfil de aminoácidos completos. Esto se debe a que los aminoácidos deficientes en la leguminosa se complementan con los del cereal y viceversa. El arroz es uno de los cereales más consumidos en el mundo y en Puerto Rico. Un estudio demostró que la adición de gandul a un cereal de arroz trajo un aumento de peso en ratas de hasta un 57% comparado con alimentarlas únicamente con arroz (Bressani et al., 1986). Para fines de esta investigación el arroz fue utilizado no solo como complemento de la proteína de gandul sino también como base o matriz para el producto que se quiere obtener con la mezcla de ambos. Se buscó cambiar las propiedades de la harina de arroz crudo para que el almidón de éste pudiera actuar como un estabilizante y una goma, para así agregarle viscosidad y espesor al producto final.

Con este fin, se llevó a cabo una pre-gelatinización de arroz crudo, para obtener un producto con mayor absorción de agua y solubilidad, así como mayor poder espesante o

de hinchamiento. A continuación, en la Tabla 18, se presentan los resultados para el índice de absorción de agua del arroz (WAI, por sus siglas en inglés), el porcentaje de solubilidad en agua (WS%, por sus siglas en inglés) y porcentaje de poder espesante o de hinchamiento (SP%, por sus siglas en inglés) para el arroz pre-gelatinizado y el control.

**Tabla 18.** Índice de absorción de agua, solubilidad y poder de hinchamiento de arroz pre-gelatinizado.

| **Arroz** | **WAI** | **WS%** | **SP%** |
|---|---|---|---|
| Control Crudo | $2.13^{b}$ | $0.86^{b}$ | $2.11^{b}$ |
| Pre-gelatinizado | $3.17^{a}$ | $4.61^{a}$ | $3.02^{a}$ |

Medias seguidas por la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes ($p<0.05$).
WAI, índice de absorción de agua, WS% solubilidad en agua, SP% poder de hinchamiento

Todas las medidas fueron significativamente diferentes al control. El índice de absorción de agua (WAI) aumentó en un 48.8%, lo que convirtió al mismo en un excelente medio de absorción para el agua del gandul fermentado; evitando así perder aminoácidos libres y nutrientes que pudieron haberse disuelto durante la fermentación. La literatura reporta valores de WAI entre 3.09 y 3.22 para tratamientos similares (Lai, 2001).

El porcentaje de solubilidad en agua también tuvo un aumento considerable del 436%. Al tener una harina de arroz más soluble, la mezcla gandul/arroz puede convertirse en una sola haciendo más homogénea la mezcla. El incremento de solubilidad puede deberse al aumento de pequeños fragmentos de amilopectina o amilosa que salen fuera de los gránulos de almidón abiertos, cuyas estructuras se han cambiado durante el tratamiento (Lai, 2001). Los valores de solubilidad que reporta la literatura, entre 5.98 a 6.05, varían dependiendo del tratamiento al que fue sometido el arroz para ser pre-gelatinizado. Los valores de solubilidad también dependen de la variedad del arroz y la cantidad de amilosa y amilopectina que tienen.

Finalmente, el poder de hinchamiento tuvo un aumento de 43%, ésta es la capacidad de los gránulos de almidón de hincharse al absorber el agua. El porcentaje de

poder hinchamiento (3.02%), se encuentra cercano a los rangos reportados en la literatura, entre 3.12% y 3.30% (Lai, 2001). Durante la pre-gelatinización del arroz las moléculas de almidón son afectadas sin llegar al punto del cocimiento. Estas aumentan su poder hinchamiento pues pierden la cristanilidad al desorganizarse y esto ocasiona una ruptura de la estructura granular del almidón. Esto se logra cuando es expuesto a vapor con elevada temperatura y contenido de humedad (Lai, 2001).

## 4.9 Desarrollo de una formulación con aminoácidos esenciales completos según requerimiento diario.

Para poder obtener una formulación base fue necesario corregir el perfil de aminoácidos del arroz pre-gelatinizado haciendo una proyección del mismo basándose en los datos experimentales obtenidos y la proteína encontrada. Como se explicó anteriormente, se entiende que el proceso de hidrólisis de las proteínas afectó en contenido de aminoácidos a consecuencia de reacciones de Maillard. Puesto que se pudo identificar una cantidad neta de cada amino ácido, excepto cisteína y metionina, es posible hacer una corrección numérica para estimar el contenido real de aminoácidos del arroz pre-gelatinizado. A continuación se presenta la proyección estimada.

### 4.9.1 Proyección del contenido de aminoácidos del arroz pre-gelatinizado

En la Tabla 19 se presentan los datos experimentales en los cuales se basa el análisis de estimación. Estos valores fueron presentados anteriormente en la sección 4.4. El proceso de estimación considera dos componentes:

1. El contenido de proteína de 100 gramos de materia seca del arroz pre-gelatinizado es de 7.88g (ó 7.88%) mientras que el del arroz crudo es de 8.50g (ó 8.50%).
2. El proceso de hidrólisis afecta a todos los aminoácidos, pero no de igual forma.

Puesto que el contenido de proteína es distinto entre las muestras bajo consideración, sólo es posible hacer comparaciones del contenido de aminoácidos si se normalizan los datos. Para ello, se divide el contenido de cada aminoácido entre la suma total de las fracciones. Los datos normalizados aparecen en la Tabla 20. Se incluye una

columna adicional donde se calcula la pérdida o ganancia de cada aminoácido determinada como la diferencia entre la fracción en el arroz control menos la fracción en el arroz pre-gelatinizado.

**Tabla 19**. Datos experimentales del arroz crudo y pre-gelatinizado.

| **Unidades** | **Datos Experimentales** | | |
|---|---|---|---|
| | | **Control Arroz** | **Arroz Pre-gelatinizado** |
| g PRO/100g sólidos | *** %Proteína B.S.** | 8.5 | 7.88 |
| g AA/100g PRO | **Ac. Aspartico** | 4.91 | 0.21 |
| | **Serina** | 2.91 | 0.09 |
| | **Ac. Glutamico** | 11.16 | 0.23 |
| | **Glicina** | 0.09 | 0.07 |
| | **Histidina** | 0.77 | 0.04 |
| | **NH3** | 2.09 | 0.40 |
| | **Arginina** | 6.64 | 0.01 |
| | **Treonina** | 3.97 | 0.05 |
| | **Alanina** | 2.8 | 0.32 |
| | **Prolina** | 5.48 | 0.97 |
| | **Cisteína** | 0.4 | 0 |
| | **Tirosina** | 3.98 | 0.14 |
| | **Valina** | 7.06 | 0.09 |
| | **Metionina** | 1.81 | 0 |
| | **Lisina** | 0.61 | 0.13 |
| | **Isoleucina** | 4.75 | 0.07 |
| | **Leucina** | 7.46 | 0.18 |
| | **Fenilalanina** | 4.77 | 0.1 |
| | **Total de los AA** | 71.66 | 3.1 |

**Tabla 20**. Análisis de normalización de aminoácidos de arroz pre-gelatinizado.

| Unidades | | % del AA en el Perfil | | Análisis Normalizado |
|---|---|---|---|---|
| | | arroz control | arroz pre-gelatinizado | perdida o ganancia |
| g AA/100g PRO | **Ac. Aspártico** | 0.0685 | 0.0677 | 0.0008 |
| | **Serina** | 0.0406 | 0.0290 | 0.0116 |
| | **Ac. Glutámico** | 0.1557 | 0.0742 | 0.0815 |
| | **Glicina** | 0.0013 | 0.0226 | -0.0213 |
| | **Histidina** | 0.0107 | 0.0129 | -0.0022 |
| | **NH3** | 0.0292 | 0.1290 | -0.0999 |
| | **Arginina** | 0.0927 | 0.0032 | 0.0894 |
| | **Treonina** | 0.0554 | 0.0161 | 0.0393 |
| | **Alanina** | 0.0391 | 0.1032 | -0.0642 |
| | **Prolina** | 0.0765 | 0.3129 | -0.2364 |
| | **Cisteína** | 0.0056 | 0.0000 | 0.0056 |
| | **Tirosina** | 0.0555 | 0.0452 | 0.0104 |
| | **Valina** | 0.0985 | 0.0290 | 0.0695 |
| | **Metionina** | 0.0253 | 0.0000 | 0.0253 |
| | **Lisina** | 0.0085 | 0.0419 | -0.0334 |
| | **Isoleucina** | 0.0663 | 0.0226 | 0.0437 |
| | **Leucina** | 0.1041 | 0.0581 | 0.0460 |
| | **Fenilalanina** | 0.0666 | 0.0323 | 0.0343 |
| | **Total de los AA** | 1.0000 | 1.0000 | 0.0000 |

Con esta corrección es posible entonces hacer comparaciones justas del efecto del proceso de pre-gelatinización. De esta tabla es posible inferir lo siguiente:

1. De acuerdo a la columna de la pérdida o ganancia según el análisis normalizado, se puede ver que el proceso de hidrólisis no afecta a todos los aminoácidos por igual ya que la pérdida o ganancia aparece positiva en algunos casos y negativa en otros.

2. La fila de los totales contabiliza la cantidad para las fracciones de cada una de las columnas. Nótese que, puesto que se consideran los mismos aminoácidos en ambas muestras, la base de normalización es la misma, pero eso no significa que la cantidad neta total en base al contenido de proteína, sea la misma. Por ejemplo, de los datos originales (Tabla 19) se observa que el total de aminoácidos considerados del arroz control es 71.66g/100 gramos de proteína, esto no implica que el contenido total de los mismos aminoácidos del arroz pre-gelatinizado sea esa misma cantidad. Esta discrepancia es atribuida a que el efecto en los otros compuestos nitrogenados que se consideran en el análisis de proteína total también es variable. Entonces, de éstos ser menos afectados, el contenido total de los aminoácidos considerados en este análisis va a ser menor que los 71.66g/100 gramos de proteína del arroz control.

3. La cantidad total para la columna de pérdida o ganancia es igual a cero. Esto es importante ya que asegura que toda variación entre los datos normalizados está debidamente contabilizada y no hay masa excedente o faltante.

4. Las cantidades que refleja la columna de pérdida o ganancia definen la merma de cada aminoácido, de forma individual, atribuida al proceso de pre-gelatinización. Este valor puede ser utilizado para estimar la cantidad perdida o ganada de cada aminoácido, dada una cantidad de proteína.

Puesto que se desea estimar la cantidad final de los distintos aminoácidos luego de la pre-gelatinización del arroz, se debe usar un factor de corrección de (1-X), donde X es el valor de pérdida o ganancia de cada aminoácido. Esto da la cantidad retenida. Los valores estimados aparecen en le Tabla 21.

**Tabla 21.** Datos estimados para el perfil de aminoácidos de arroz pre-gelatinizado.

| Unidades | Datos Experimentales | | | Estimado |
|---|---|---|---|---|
| | | Control Arroz | Arroz Pre-gelatinizado | arroz pre-gelatinizado |
| g PRO/100g sólidos | * %Proteína B.S. | 8.50 | 7.88 | 7.88 |
| g AA/100g PRO | **Ac. Aspártico** | 4.91 | 0.21 | 4.91 |
| | **Serina** | 2.91 | 0.09 | 2.88 |
| | **Ac. Glutámico** | 11.16 | 0.23 | 10.25 |
| | **Glicina** | 0.09 | 0.07 | 0.09 |
| | **Histidina** | 0.77 | 0.04 | 0.77 |
| | **$NH_3$** | 2.09 | 0.40 | 2.30 |
| | **Arginina** | 6.64 | 0.01 | 6.05 |
| | **Treonina** | 3.97 | 0.05 | 3.81 |
| | **Alanina** | 2.80 | 0.32 | 2.98 |
| | **Prolina** | 5.48 | 0.97 | 6.78 |
| | **Cisteína** | 0.40 | 0.00 | 0.40 |
| | **Tirosina** | 3.98 | 0.14 | 3.94 |
| | **Valina** | 7.06 | 0.09 | 6.57 |
| | **Metionina** | 1.81 | 0.00 | 1.76 |
| | **Lisina** | 0.61 | 0.13 | 0.63 |
| | **Isoleucina** | 4.75 | 0.07 | 4.54 |
| | **Leucina** | 7.46 | 0.18 | 7.12 |
| | **Fenilalanina** | 4.77 | 0.10 | 4.61 |
| | **Total de los AA** | 71.66 | 3.10 | 70.38 |

Con estos datos estimados se puede hacer el análisis de las formulaciones base.

### 4.9.2 Formulación base

Para desarrollar la formulación se debe cumplir con el objetivo de obtener una proteína completa, es decir un perfil de aminoácidos completos en el producto que se desea ofrecer. Dado a que no se encontró diferencia significativa en el perfil de aminoácidos y el análisis proximal, se decidió hacer un promedio de éstos para poder

calcular la formulación. Como se mencionó anteriormente el gandul presenta dos aminoácidos esenciales limitantes.

**Tabla 22.** Puntaje de aminoácidos para gandul Lázaro

| **Aminoácido Esencial** | **Puntaje** |
|---|---|
| Histidina | 2.95 |
| Treonina | 1.51 |
| Metionina | 1.79 |
| Cisteína | 3.90 |
| Valina | 1.22 |
| Lisina | 0.86 |
| Isoleucina | 1.53 |
| Leucina | 0.95 |
| Fenilalanina + Tirosina | 2.73 |

En la Tabla 22 se presentan los punteos de los aminoácidos esenciales para el gandul Lázaro obtenidos a partir de la razón de la cantidad de cada aminoácido (mg/g proteína, referencia en Tabla 13) y el requerimiento diario (mg/g proteína, referencia en Tabla 8). Se puede observar que lisina y leucina son los dos aminoácidos limitantes con punteos de 0.86 y 0.95, respectivamente.

El resto de los aminoácidos excede la cantidad requerida, lo que significa que si se consume un gramo de gandul se puede obtener la cantidad necesaria de todos los aminoácidos esenciales a excepción de lisina y leucina.

Para poder obtener un alimento que pudiera proporcionar un perfil de aminoácidos esenciales completo de acuerdo a los requerimientos diarios, era necesario complementar la cantidad de lisina y leucina en el gandul. El adicionarle arroz pre-gelatinizado al gandul no se logra aumentar la cantidad lisina por gramo de proteína sino que se obtiene lo contrario. Esto es debido a que el arroz pre-gelatinizado tiene menos cantidad de lisina presente por gramo de proteína, lo que genera una dilución de la lisina de gandul, obteniéndose un puntaje de lisina menor para el producto mezclado que el puntaje del gandul solo. En la Figura 9 se presenta el cálculo y el punteo de los

aminoácidos esenciales para una mezcla de gandul y arroz con una proporción 90:10. Se puede observar que el punteo para lisina bajó a 0.83 y el del leucina a 0.91.

A la luz de esta información es necesario proveer opciones para poder obtener la cantidad de aminoácidos necesarios en el producto final. El arroz pre-gelatinizado no puede ser removido de la formulación debido a que este sirve como medio de absorción del agua del gandul fermentado, así como estabilizante de la mezcla. Al adicionar arroz no es necesaria la adición de gomas, ni de procesos extra para poder concentrar el gandul fermentado.

Se proponen dos soluciones para el desarrollo de la formulación. La primera opción es encontrar un balance entre arroz pre-gelatinizado y gandul tal que se complete la lisina y leucina basándose un valor de servicio (serving size) de un producto comercial.

| | Peso | Proteína B.S. | Lisina | Metionina | Cisteína | Treonina | Valina | Isoleucina | Leucina | Fenilalalina + Tirosina |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | (g) | (g/100g) | mg/g proteina | | | | | | | |
| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J |
| Gandul | 90 | 23.24 | 38.60 | 28.73 | 23.38 | 34.70 | 47.48 | 45.83 | 55.88 | 97.525 |
| Arroz | 10 | 7.88 | 6.3 | 17.60 | 4 | 38.1 | 65.7 | 45.4 | 71.2 | 85.5 |

| CANTIDADES EN MEZCLA | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Proteina | Lisina | Metionina | Cisteína | Treonina | Valina | Isoleucina | Leucina | Fenilalalina + Tirosina |
| | (g) | mg | | | | | | | |
| | A*B/100 =P | P*C | P*D | P*E | P*F | P*G | P*H | P*I | P*J |
| Gandul | 20.92 | 807.36 | 600.92 | 489.02 | 725.79 | 993.09 | 958.58 | 1168.79 | 2039.83 |
| Arroz | 0.79 | 4.96 | 13.87 | 3.15 | 30.02 | 51.77 | 35.78 | 56.11 | 67.37 |
| Total | 21.70 | 812.32 | 614.79 | 492.17 | 755.81 | 1044.86 | 994.36 | 1224.89 | 2107.21 |
| Aminoácidos: mg/g proteína (Total aminoácido/total proteína) | | | | | | | | | |
| Aminoácidos: | | 37.43 | 28.33 | 22.68 | 34.82 | 48.14 | 45.81 | 56.44 | 97.09 |

| PATRONES DE REFERENCIA Y PUNTEO DE AMINOÁCIDOS | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Lisina | Metionina | Cisteína | Treonina | Valina | Isoleucina | Leucina | Fenilalalina + Tirosina |
| **REFERENCIA** | mg/g proteína | | | | | | | |
| Adulto >18 Años | 45.00 | 16.00 | 6.00 | 23.00 | 39.00 | 30.00 | 59.00 | 38.00 |
| | amino acido/ proteína en referencia | | | | | | | |
| **PUNTEO AMINOÁCIDO** | **0.83** | **1.77** | **3.78** | **1.51** | **1.23** | **1.53** | **0.96** | **2.55** |

**Figura 9**. Punteo de aminoácidos esenciales para mezcla de gandul-arroz (90:10)

En el mercado se encuentran varios productos listos para el consumo que se presentan como suplemento alimenticio. Entre ellos se encuentra la popular bebida "Ensure®", la cual cuenta con una línea de productos diversos para diferentes necesidades. La compañía manufacturera del producto informa que éste está hecho a

base de caseinatos, derivados de caseína. Caseína es la proteína de la leche, la cual es considerada una proteína de calidad pues tiene un puntaje de aminoácidos completo para los aminoácidos esenciales (Sarwar, 2007). El producto original, cuenta con 9 gramos de proteína por servicio o botella (257mL) y es considerado un suplemento adecuado para niños y adultos que no cuentan con dietas balanceadas. Suponiendo que los 9 gramos de proteína en este producto cuentan con un perfil completo, se obtuvo el valor de lisina que se estaría consumiendo en un servicio de Ensure ®. Se multiplicó el requerimiento de 45mg de lisina/g de proteína por 9 gramos y se obtuvieron 405mg de lisina por cada servicio. Para encontrar el balance de arroz y gandul necesario para que el producto alcanzara esta cantidad de lisina se despejó la siguiente ecuación por medio de iteración con una calculadora científica.

- $A + G = 100$
- $6.3 \times 10^{-3} * 0.0788A + 0.2324 * 0.0386G = 0.405$

Se obtuvo una cantidad de 58.07 gramos de Arroz y 41.93 gramos de gandul para poder obtener una valor final de 0.405mg de lisina y 14.32g de proteína. La proteína sería mayor a la del servicio del Ensure®, pues para el gandul y el arroz se requiere más materia prima para completar el valor de requerimiento de aminoácidos. Con esta mezcla también se obtienen 60.78mg de leucina por cada gramo de proteína, dato que cumple con la cantidad que requiere la Organización Mundial de la Salud (WHO/FAO/ONU, 2002), que son 59mg/g proteína.

Para calcular la proporción de gandul que se debe usar primero debe tomarse en cuenta que el gandul se encuentra en solución y que el valor propuesto esta en base seca. Así que los 41.93 gramos de gandul deben multiplicarse por la razón de peso de la mezcla fermentada, la cual es 1221g de mezcla/ 221g de gandul. Con esta primicia se obtienen los siguientes valores para la formulación propuesta:

**Tabla 23.** Proporción de gandul y arroz para completar requerimiento de lisina y leucina en mezcla comparada con Ensure ®.

| **Producto** | **Cantidad (gramos)** |
|---|---|
| Gandul en base seca | 41.93 |
| Gandul (fermentado en solución) | 231.66 |
| Arroz Pre-gelatinizado | 58.07 |

Otra opción era complementar la formulación con lisina y leucina obtenidos de fuentes comerciales. Teniendo 9 gramos de proteína como base para el cálculo, se obtuvieron los valores de gandul y arroz necesarios para obtener esta cantidad de proteína basándose en las siguientes ecuaciones de balance de masa:

- $A + G = 50$
- $0.0788A + 0.2324G = 9$

Se tomó como base 50 unidades de masa, debido a que con 100 unidades de masa no se obtenían valores que lograran satisfacer los puntajes de los aminoácidos esenciales en 9 gramos de proteína. Para este nuevo cálculo se obtuvo una cantidad de 17.057 gramos de Arroz y 32.943 gramos de gandul para poder obtener un valor final de 9 gramos de proteína. Esta mezcla permite obtener un puntaje completo de aminoácidos para todos los aminoácidos esenciales excepto lisina y leucina, nuevamente. Para poder completar el puntaje de aminoácidos por gramo de proteína para estos aminoácidos, es necesario agregar 101.04mg de lisina y 7.51mg de leucina. Esta opción puede traer consecuencias económicas por lo que el producto podría hacerse menos accesible a personas de bajos recursos. La formulación final transformando los gramos de gandul a mezcla de gandul fermentado es la siguiente:

**Tabla 24.** Proporción de gandul y arroz para completar requerimiento de Lisina y Leucina en 9 gramos de proteína.

| **Producto** | **Cantidad** |
|---|---|
| Gandul en base seca | 32.94 |
| Gandul (fermentado en solución) | 182.01 g. |
| Arroz Pre-gelatinizado | 17.06 g. |
| Lisina | 101.04 mg. |
| Leucina | 7.51 mg. |

# 5 CONCLUSIONES

La fermentación natural llevada a cabo bajo condiciones de inocuidad controladas es protagonizada mayormente por bacterias ácido lácticas. Estas bacterias producen una disminución del pH desde un rango de 6.30 - 6.38 hasta un rango de pH de 4.75 - 4.35 en 24 horas de fermentación provocando un ambiente desfavorable para el crecimiento de bacterias patógenas. Desde el punto de vista de inocuidad el tratamiento a 35°C por 57.7 horas es considerado el mejor dado a que alcanzó a las 24 horas de fermentación el pH que los otros tratamientos (28°C y 42°C) lograron alcanzar hasta las 48 horas de tratamiento.

Entre los azúcares solubles presentes en el gandul crudo variedad "Lázaro", se encuentran en mayor cantidad fructosa, glucosa, sacarosa, rafinosa y estaquiosa; galactosa se encuentra en bajas cantidades. Después de la fermentación se encontró una disminución de estaquiosa y rafinosa en todas las muestras fermentadas y un aumento esperado de galactosa. Como se esperaba, los tres tratamientos tuvieron disminuciones significativas de los α-galactósidos. A pesar que los tres tratamientos no presentaron diferencia significativa entre los valores finales de los azúcares rafinosa y estaquiosa, el tratamiento que favorece la disminución de estaquiosa y rafinosa en el menor tiempo posible fue a 35°C por 57.7 horas terminando con valores de 0.001 gramos de estaquiosa por cada 100 gramos de materia seca, presentado una disminución del 99.3% y 0.033 gramos de rafinosa por cada 100 gramos de materia seca siendo este valor representativo de una disminución del 84.5%. Se concluye que este es el tratamiento reduce la presencia de estaquiosa y rafinosa en el menor tiempo posible.

En cuanto a los demás azúcares, se observó una disminución esperada de sacarosa para los tres tratamientos, los tratamientos con mayor disminución fueron 28°C por 65.4 horas y 35°C por 57.7 horas que presentaron disminuciones del 96.5% y 99.7%, respectivamente.

El aumento de glucosa en el tratamiento a 42°C pudo deberse a que se detuvo el consumo glucosa por las condiciones de pH y temperatura que ayudaron a los

microorganismos a llegar a su fase estacionaria y muerte. Fructosa presentó una disminución en las tres fermentaciones, pero ésta tuvo la menor disminución en el tratamiento de 42°C.

En cuanto al análisis del perfil de aminoácidos para el gandul variedad Lázaro, no se encontró diferencia significativa entre ningún tratamiento, ni tampoco entre los tratamientos y el control; lo que trae como conclusión que la fermentación no trae consecuencias significativas en el perfil de aminoácidos del gandul.

Los aminoácidos serina, histidina, arginina, treonina, prolina, valina, isoleucina y fenilalanina se encontraron entre los rangos reportados por la literatura. La disminución del ácido aspártico y ácido glutámico pudo deberse a que son precursores de otros aminoácidos que no pudieron ser cuantificados pues no son contemplados por el método de detección.

Cisteína y metionina se encontraron en mayor proporción en el gandul variedad "Lázaro", contrario a lo que se esperaba por justificación de la literatura, estos aminoácidos no se perdieron durante la hidrólisis. Con los valores reportados en esta investigación estos aminoácidos azufrados lograron cubrir el puntaje requerido y dejaron de ser los aminoácidos limitantes en el gandul. Tirosina presentó un comportamiento similar, reportándose en valores más altos a los esperados. Se concluye que el método de derivatización y detección por fluorescencia tiene más resolución y sensibilidad para detectar los aminoácidos que fueron hidrolizados por el método convencional.

Los aminoácidos que se encontraron por debajo de los valores reportados por la literatura fueron lisina y glicina. Lisina es el aminoácido limitante de mayor importancia pues se pierde durante el procesamiento de alimentos por diversas reacciones. El gandul se reconoce por tener una gran cantidad de lisina (entre 4.7g/100g de proteína a 7.2g/100g de proteína) dado a que no se cuenta con información previa sobre el perfil de aminoácidos totales del gandul variedad "Lázaro" no se puede asegurar que se haya perdido durante el proceso de extracción.

Se obtuvo el puntaje para todos los aminoácidos, los aminoácidos esenciales lograron alcanzar un puntaje mayor de uno excepto por lisina y leucina, siendo lisina el aminoácido con menor puntaje se convierte en el aminoácido limitante del gandul.

En el análisis de aminoácidos para el arroz crudo y pre-gelatinizado se encontraron diferencias. Al comparar el arroz crudo con el perfil de aminoácidos del arroz de referencia, se encontraron valores menores para glicina, histidina, alanina, cisteína, metionina, lisina y fenilalanina. El perfil de aminoácidos para el arroz pre-gelatinizado resultó ser mucho menor al control. Se esperaba que la cantidad de aminoácidos no variara demasiado pues la proteína del arroz no disminuyó en gran cantidad. Esto trae como conclusión que los aminoácidos pudieron haberse desnaturalizado durante el proceso de pre-gelatinización e hidrólisis de la muestra para la extracción de aminoácidos. El arroz pre-gelatinizado cuenta con glucosa libre y más aminoácidos libres. Estas condiciones más el factor de añadirle calor, proporcionan el escenario óptimo para las reacciones de Maillard lo que trae consigo la formación de compuestos de Amadori. Se realizó una normalización de los aminoácidos obtenidos para estimar un perfil de aminoácidos en el arroz pre-gelatinizado que se ajustara al valor real.

El análisis proximal del gandul y el arroz crudo concordó con los valores reportados en la literatura. En el caso del gandul, la fermentación no tiene efecto en la composición proximal del gandul. A pesar de tener una disminución de azúcares solubles como rafinosa y estaquiosa, la cantidad de carbohidratos totales no se vió disminuida en una cantidad drástica, esto se debe a que la mayoría de los carbohidratos en el gandul pertenecen a moléculas de almidón, carbohidratos insolubles y fibra. En base a los valores encontrados se concluye que el gandul proporciona una cantidad importante de proteína en base seca (aproximadamente 23%), alto contenido de minerales por su porcentaje de ceniza (3% aproximadamente) y baja cantidad de grasa (aproximadamente 2%). El gandul también aporta una cantidad considerable de fibra en base seca, aportando aproximadamente 10 gramos de fibra por cada 100 gramos de gandul seco.

En el análisis proximal del arroz se encontró diferencia significativa entre el control y el tratamiento de pre-gelatinización. La proteína, la grasa y la ceniza disminuyeron significativamente. Se concluye que la disminución de proteína y minerales se pudo deber a la pérdida de aminoácidos libres solubles y disolución de minerales en agua durante los remojos del gandul para la producción de arroz pre-gelatinizado. Al encontrarse menos cantidad de estos componentes los carbohidratos aumentan por resultado de la diferencia.

El arroz fue pre-gelatinizado con el fin de proporcionar un medio de absorción del agua del gandul fermentado. Para demostrar el cambio en las propiedades de hidratación del arroz se midieron tres parámetros, el índice de absorción de agua, el poder de hinchamiento y la solubilidad en agua. La pre-gelatinización trajo una mejoría en los tres parámetros, mejorando la capacidad de absorción de agua en un 48%, haciendo el arroz más soluble en un 436% y aumentando el poder de hinchamiento en un 43%

Para el desarrollo de la formulación se tomó un promedio del perfil de aminoácidos para los tres tratamientos y el perfil de aminoácidos del arroz pre-gelatinizado estimado. Se concluyó que dado a que el arroz cuenta con un perfil de aminoácidos muy pequeño, al unirlo con el gandul disminuye el puntaje de aminoácidos de los aminoácidos limitantes en el gandul.

Para el cálculo de la formulación se tomó como base la cantidad de aminoácido limitante, en este caso lisina, aportada por 9 gramos de proteína. Con este valor se intentó completar la cantidad uniendo gandul fermentado con arroz pre-gelatinizado. Se obtuvo que una mezcla de 231.66 gramos de gandul fermentado en solución y 58.07 gramos de arroz, aportan los 405 gramos de lisina que se espera obtener de 9 gramos de proteína con puntaje de aminoácidos completo. La cantidad de proteína que ambos valores aportan es de 14.32 gramos. Una segunda opción para la formulación se buscó completar el requerimiento de lisina y leucina para 9 gramos de proteína provenientes de la mezcla de gandul fermentado y arroz pre-gelatinizado. La mezcla debe tener 182.01

gramos de gandul, 17.06 gramos de arroz, 101.04mg de lisina y 7.51mg de leucina. Este proceso puede traer implicaciones económicas adicionales debido a la compra de estos aminoácidos de manera comercial.

# 6 RECOMENDACIONES

Para futuros trabajos, sería interesante observar la digestibilidad de la formulación propuesta por esta investigación así como el perfil de aminoácidos final y su puntaje corregido por la digestibilidad del mismo. Con esta información se puede determinar si la mezcla fue adecuada y el valor nutricional real que ésta podría aportar.

Se recomienda el estudio de la proteína de gandul como remplazo de proteína de soya. Su alto porcentaje en base seca lo convierte en otra opción de consumo, además se estaría presentando una opción que no es considerada como alérgeno. Se realizó como prueba preliminar una especie de "tofú" de gandul en el cual se logró separar la proteína. Así que se sugiere caracterizar la proteína de gandul.

Se recomienda un estudio de las propiedades funcionales del gandul fermentado, entre ellas se encuentran las propiedades de hidratación, comportamiento reológico, gelificación, propiedades de superficie como emulsificación de proteínas y grasas.

Se sugiere un análisis sensorial de la formulación final que debe estar enriquecida con ingredientes que proporcionen sabor y reduzcan la acidez del producto final.

Se recomienda analizar el efecto de la fermentación en los otros antinutrientes que tiene el gandul, tales como taninos, ácido fítico e inhibidores de tripsina y quimotripsina.

También se recomienda estudiar a fondo el efecto de la pre-gelatinización en la cantidad de aminoácidos.

# 7 REFERENCIAS


Achieng, D. 2007. The Potential of Pigeonpea (*Cajanus Cajan* (L.) Millsp.) in Africa. Natural Resources Forum 31. Blackwell Publishing Ltd: 297-305.

Adams, D.M., Adams, M.R. & Nout, M.J.R. 2001. *Fermentation and food safety*. Springer.

Alemañy, A.M. 2001. Determinación de los Factores que Contribuyen al ennegrecimiento del Gandul Refrigerado Desgranado a Maquina. Tésis Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayaguez.

Akintayo, E., Oshodi, A. & Esuoso, K. 1999. Effects of NaCl, ionic strength and pH on the foaming and gelation of pigeon pea (Cajanus cajan) protein concentrates. *Food Chemistry*. 66(1). pp.51–56.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis Association of Official Analytical Chemistry. Washington D.C., USA.

AOCS. 2005. Official Method Am 5-04. American Oil Chemist's Society. Urbana, Illinois, USA.

Apata D.F. 2008. Effect of cooking methods on available and unavailable carbohydrates of some tropical grain legumes. *Afr. J. Biotechnol. African Journal of Biotechnology*. 7(16). pp.2940–2945.

Azevedo, R.A.. Lancien, M. & Lea, P.J. 2006. The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. *Amino Acids*. 30(2). pp.143–162.

Braham, E., Vela, R.M., Bressani, R., Jarquín, R. 1965. Efecto de la cocción y de la suplementación con aminoácidos sobre el valor nutritivo de la proteína del gandul (Cajanus indicus). *Archivos Venezolanos de Nutrición*, 15(1), 19-32.

Bressani, R., Gómez-Brenes, R. y Elías, L.G. 1986. Calidad Nutricional de la Proteína de Gandul Tierno y Maduro y su Valor Suplementario a los Cereales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* XXXVI, no. 1, 108-116.

Boutrif, E. 1991. Recent Developments in Protein Quality Evaluation. *FAO/WHO Food, Nutrition and Agriculture, Nutrient Requirements*, 2, Rome.

Cazetta, J.O., Silva, H.C., Braga, G.L.,y Carvalho, R. 1991. Oligosaccharide Levels in Immature and Nature Seeds from Several Varieties of Pigeon Pea (Cajanus cajan). *Alimentos e Nutrição*, 3, pp.75–84.

Cedano, J. 2006. Guía Técnica Cultivo de Gandul. I, Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal Inc. (Diciembre). República Dominicana.

Cerezal, P., Carrasco, A., Pinto, K., Romero, N. y Arcos, R. 2007. Suplemento Alimenticio de Alto Contenido Proteico para Niños de 2-5 años. Desarrollo de la Formulación y Aceptabilidad. *Interciencia* XXXII, no. 12 (Diciembre): 857-864.

Codex Committee on Vegetable Proteins. 1989. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Alimentarius Commission, Eighteenth Session .

Cooper, C., Packer, N. & Williams, K. 2001. *Amino acid analysis protocols*, Totowa, N.J.: Humana Press.

Dávila, M.A., Sangronis, E. y Granito, M. 2003. Leguminosas germinadas o fermentadas: alimentos o ingredientes de alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 53(4), 348-354.

Department of Health of South Africa. 2002. Regulations Relating to Labelling and Advertising of Foodstuffs, R 1055/2002,Annexures 4, Methods of Analylsis-Method of Determining Net Protein Digestibility-Corrected Amino acid Score (PDCAAS). South Africa.

Deza, K.M. 2006. Modified Atmosphere Packaging and Postharvest Quality of Pigeon Pea. Tésis. Universidad of Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayaguez.

Eneche, E. 1999. Biscuit-making potential of millet/pigeon pea flour blends . *Plant Foods for Human Nutrition*, 54(1), 21-27.

Fazardi, M., Khatami, S., Mousavi, M. & Amirmozafari, N. 2011. Purification and Characterization of a-galactosidase From Lactobacillus Acidophilus. *African Journal of Biotechnology*, 10(10), pp.1873–1879.

Food and Agriculture Organization/World Health Organization/United Nations University. 1985.World Health Organization Technical Report Series, 724, *WHO*, Geneva, Switzerland.

Frias, J., Vidal-Valverde, C., Kozlowska, H., Tabera, J., Honke, J. & Hedley, C. 1996. Natural Fermentation of Lentils. Influence of Time, Flour Concentration, and temperature on the Kinetics of Monosaccharides, Disaccharide, and α-Galactosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(2), pp.579-584.

Granito, M., Frias, J., Doblado, R., Guerra, M. & Champ, M. 2002. Nutritional improvement of beans (Phaseolus vulgaris) by natural fermentation. *European Food Research and Technology*, 214(3), pp.226- 231.

Grupo InfoStat. 2009. Universidad Nacional de Córdova Facultad de Ciencias Agropecuarias. Córdova, Argentina.

Hollingsworth, P. 2003. Food and the Aging Consumer. *Food Technology*, 57(7), 28-30.

Houston, D.F., Allis, M.E. & Kohler, G.O., 1969. Amino Acid Composition of Rice and Rice By Products. *Cereal Chemistry*, 46, pp.527–536.

Hugo, L.F., Rooney, L.W. & Taylor, J.R.N., 2003. Fermented Sorghum as a Functional Ingredient in Composite Breads. *Cereal Chemistry*, 80(5), pp.495-499.

Lai, His-Mei. 2001. Effects of hydrothermal treatment on the physicochemical properties of pregelatinized rice flour. Food Chemistry, 72, pp.455-463.

LeBlanc JG, Silvestroni A, Connes C, Juillard V, de Giori GS, Piard JC, Sesma F. 2004. Reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk: application of engineered lactic acid bacteria that produce alpha-galactosidase. *Genet Mol Res*.Sep 30;3(3):432-40.

Martínez, J. & García, P. 2006. *Nutrición Humana*, España: Universidad Politécnica de Valencia.

Martínez-Villaluenga C., Torres, A., Frias, J. & Vidal-Valverde, C. 2010. Semolina supplementation with processed lupin and pigeon pea flours improve protein quality of pasta. *LWT - Food Sci. Technol. LWT - Food Science and Technology*, 43(4), pp.617–622.

Motarjemi, Y. & Nout, M.J.1996. Food fermentation: a safety and nutritional assessment. Joint FAO/WHO Workshop on Assessment of Fermentation as a Household Technology for Improving Food Safety. *Bulletin of the World Health Organization*, 74(6), pp.553–559.

Morton, J., Smith, R., Lugo-López, M.A. & Abrams, R. 1982. Pigeonpeas (Cajanus Cajan Millisp.): A Valuable Crop of the Tropics. Department of Agronomy and Soils, University of Puerto Rico (November): 9-122.

Mueses, C., De León, L., Matute, J. y Bressani, R. 1993a. Elaboración de harinas procesadas de semilla de gandul. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 43(1), 33-40.

Mueses, C., De León, L. y Bressani, R. 1993b. Estudios sobre la posibilidad de aplicación de la harina de gandul en productos elaborados a base de arroz o harina de trigo. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 43(1), 41-50.

Nout, M.J.R., Rombouts, F.M. & Havelaar, A., 1989. Effect of accelerated natural lactic fermentation of infant good ingredients on some pathogenic microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 8(4), pp.351-361.

Nwokolo, E. 1987. Nutritional Evaluation of Pigeon Pea Meal. *Plant Foods for Human Nutrition*, 37(4), 283-290.

Oboh, H.A., Muzquiz, M., Burbano, C., Cuadrado, C., Pedrosa, M.M., Ayet, G. & Osagie, A.U. 2000. Effect of soaking, cooking and germination on the oligosaccharide content of selected Nigerian legume seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 55(2), pp.97-110.

Okpala, L.C., Mamah, E.N. 2001. Functional Properties of Raw and Processed Pigeonpea (*Cajanus Cajan)* flour. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 52: 343-346.

Olave, Mariela. 1981. Análisis Económico de los Costos e Ingresos de la Produccion de Gandules a nivel comercial en Puerto Rico. Tesis. Universidad de Puerto Rico pp 74.

Onweluzo, J.C. & Nwabugwu, C.C. 2009. Development and Evaluation of Weaning Foods from Pigeon Pea and Millet. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(6), 725-730.

Oshodi, A.A., Olaofe, O. & Hall, G.M. 1993. Amino acid, fatty acid and mineral composition of pigeon pea (cajanus cajan). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 43(4), pp.187–191.

Popper, R. & Kroll, B.J. 2003. Food Preference and Consumption Among the Elderly. *Food Technology*, 57(7), 32-40.

Premi, L., Sandine, W.E. & Elliker, P.R. 1972. Lactose-Hydrolyzing Enzymes of Lactobacillus Species1. *Applied Microbiology*, 24(1), pp.51–57.

Rao, P.U. & Belavady, B. 1978. Oligosaccharides in pulses: varietal differences and effects of cooking and germination. *J. Agric. Food Chem.*, 26(2), pp.316–319.

Saladín, F. 1989. Cultivo de Gandul. Boletín técnico. Fundación de Desarrollo Agropecuario, Inc.

Sarwar, Ghulam. 2007.The Protein Digestibility-Corrrected Amino Acid Score Method Overestimates Quality of Proteins Containing Antinutritional Factors and of Poorly Digestible Proteins Supplemented with Limiting Amino Acid in Rats. *The Journal of Nutrition*, (May, 17): 758:764.

Saikusa, T., Horino, T. & Mori, Y. 1994. Distribution of Free Amino Acids in the Rice Kernel and Kernel Fractions and the Effect of Water Soaking on the Distribution. *J. Agric. Food Chem. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(5), pp.1122–1125.

Schaafsma, G. 2000. The Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score. *The Journal of Nutrition*, 130(7), 1865S-1867S.

Schaafsma, G. 2005. The Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score (PDCAAS)-A Concept for Describing Protein Quality in Foods and Food Ingredients: A Critical Review. *Journal of AOAC International*, 88(3), 988-994.

Singh, B.P.N.; Kulshperstha, S.P. 1987. Kinetics of Water Sorption by Soybean and Pigeonpea Grains. *Journal of Food Science* 52, no. 6: 1538-1541.

Singh, F. & Diwakar, B. 1993. Nutritive Value and Uses of Pigeonpea and Groundnut. *International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics*.

Singh, U; Jain, K. C.; Jambunathan, R. & Faris, D.G. 1984. Nutritional Quality of Vegetable Pigeonpeas [Cajanus cajan (L.) Millsp.]: Dry Matter Accumulation, Carbohydrates and Proteins. *Journal of Food Science* 49, no. 3: 799-802.

Smith, B.J. 1997. *Protein sequencing protocols*, Totowa, N.J.: Humana Press.

Sosulski, F.W., Elkowicz, L. & Reichert, R.D. 1982. Oligosaccharides in Eleven Legumes and Their Air-Classified Protein and Starch Fractions. *Journal of Food Science*, 47(2), pp.498–502.

Stiles, M.E. & Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* **36**: 1–29

Taniguchi, M., Nakanaga, R. & Yano, N. 1988. Method of manufacturing dried rice with pregelatinized starch content - US 4794012 - IP.com. Available at: http://ip.com/patent/US4794012 [Accessed June 4, 2011].

The United Nations Children´s Fund (UNICEF). 2006. Análisis de situación de los alimentos complementarios fortificados para la niñez entre 6 y 36 meses de edad en la región de América Latina y El Caribe; Septiembre.

Torres, A., Frias, J., Granito, M. & Vidal-Valverde, C. 2006. Fermented Pigeon Pea (Cajanus cajan) Ingredients in Pasta Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18), 6685-6691.

Torres, A., Frias, J., Granito, M. & Vidal-Valverde, C. 2007. Germinated Cajanus cajan seeds as ingredients in pasta products: Chemical, biological and sensory evaluation. *Food chemistry*., 101(1), 202-211.

United States Department of Agriculture, USDA; 2011. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24; National Agricultura Library. Agricultural Research Service.

Wadchararat C., Thongngam, M. & Naivikul, O., 2006. Characterization of Pregelatinized and Heat Moisture Treated Rice Flours. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 40(Suppl.), pp.144 – 153.

Waters Corporation. 2008. AccQ.Fluor Reagent Kit, Care and Use Manual. Waters Corporation, MA, USA.

Wellner, A., Huettl, C. & Henle, T. 2011. Formation of Maillard Reaction Products during Heat Treatment of Carrots. *J. Agric. Food Chem.*, 59(14), pp.7992–7998.

Wijtzes, T., Wit, J.C., Huis, J.H.J., Riet, K. & Zwietering, M.H. 1995. Modelling Bacterial Growth of Lactobacillus curvatus as a Function of Acidity and Temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7), pp.2533–2539.

World Health Organization/Food and Agriculture Organization/United Nations University. 2002. Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition. World Health Organization Technical Report Series, 935. Geneva, Switzerland.

Wong, D.W.S., 1989. *Mechanism and theory in food chemistry*, Springer.

Young, V.R. & Borgonha, S. 2000. Nitrogen and Amino Acid Requirements: The Massachusetts Institute of Technology Amino Acid Requirement Pattern. *Journal of Nutrition*, 130, 1841S-1849S.

# 8 APÉNDICES

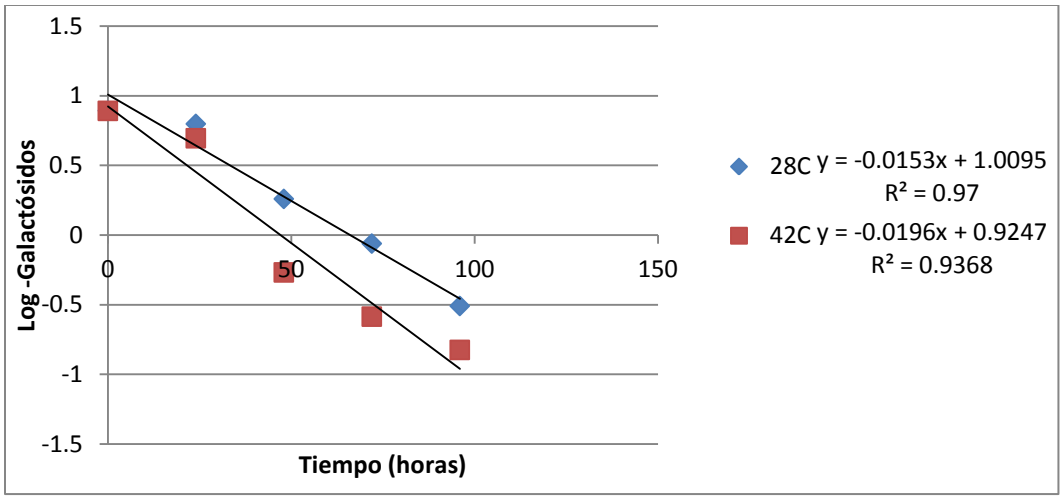
## 8.1 Obtención de condiciones de fermentación

**Tabla 25.** Condiciones y resultados de reducción de α-galactósidos en fermentación de lentejas (Frias et al., 1996)

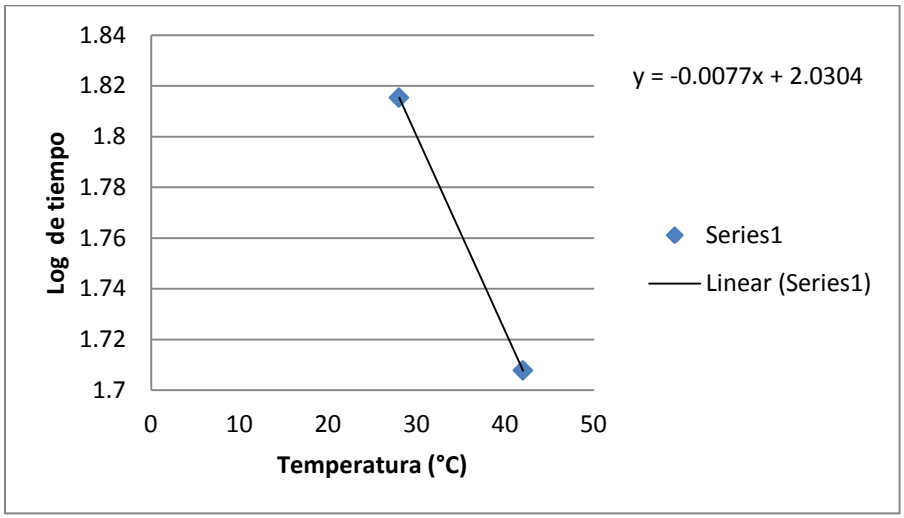
| | a-galactósidos | | | log(a-galactósidos) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Tiempo** | **28ºC** | **35ºC** | **42ºC** | **28ºC** | **35ºC** | **42ºC** |
| 0 | 7.83 | 6.21 | 7.80 | 0.8938 | 0.7931 | 0.8921 |
| 24 | 6.29 | 5.07 | 4.96 | 0.7987 | 0.7047 | 0.6955 |
| 48 | 1.82 | 0.92 | 0.54 | 0.2601 | -0.0346 | -0.2676 |
| 72 | 0.87 | 0.20 | 0.26 | -0.0605 | -0.6918 | -0.5850 |
| 96 | 0.31 | 0.06 | 0.15 | -0.5086 | -1.1984 | -0.8239 |

Las condiciones presentadas en la Tabla 25 fueron determinadas basándose en la disminución o eliminación de α-galactósidos en lentejas. La relación de tiempo y temperatura a masa constante de 221g/L fue analizada por Frías et al., (1996). Con los datos obtenidos de esta investigación se determinó la razón de disminución logarítmica (tiempo de reducción decimal) de α-galactósidos en lentejas con respecto al tiempo a una concentración de 221g/L y esta información es ilustrada en el Gráfica 9. Esta gráfica en escala logarítmica presenta un comportamiento lineal lo que permite encontrar una ecuación que describe la disminución de los α-galactósidos para cada temperatura. Para 28°C la ecuación es -0.0153x + 1.0095 y para 42°C la ecuación es -0.0196x + 0.9247.

Se encontró la pendiente de cada línea y a cada una se le sacó la inversa para encontrar el tiempo en promedio necesario para reducir en un 90% los α-galactósidos (un ciclo logarítmico). Para 28°C el tiempo calculado fue de 65.4 horas y para 42°C el tiempo fue de 51.0 horas. Para obtener una relación de resistencia termal, se obtuvo el logaritmo de ambos tiempos y se graficaron con respecto a la temperatura para así encontrar la relación lineal entre ellos e interpolar para encontrar el tiempo para la temperatura intermedia de 35°C (Gráfica 10). La ecuación lineal para esta gráfica fue -0.0077x + 2.0304. El tiempo determinado fue de 57.7 horas.




**Gráfica 9.** Disminución logarítmica de α-galactósidos vs. Tiempo a razón de 221 g/L en lentejas. Frías et al. (1996)




**Gráfica 10.** Relación entre el logaritmo del tiempo y temperatura de tratamientos para eliminación de α-galactósidos a razón de 221 g/L en lentejas. Frías et al. (1996)

## 8.2 Pruebas preliminares en arroz

Se llevaron a cabo cuatro pruebas preliminares en la harina de arroz para determinar cual tratamiento logra la modificación de almidón tal que el índice de absorción de agua, la solubilidad y el poder de hinchamiento aumentaran. Se hizo una prueba de pre-gelatinización de arroz, y tres pruebas de "Heat moisture treatment" (tratamiento de calentamiento y humedad) por triplicado. Este último es un tratamiento

en el cual el arroz es sumergido en agua a diferentes temperaturas en donde se requiere que se aumente la humedad de la harina por lo menos 30% (Wadchararat et al., 2006).

El método utilizado para la pre-gelatinización esta detallada en la Figura 2 (Taniguchi et al., 1988). Las pruebas de "heat moisture treatment" fueron basadas en la metodología de Wadchararat y colaboradores (2006) y fueron clasificadas como A, B y C. Todas las pruebas fueron sumergidas en agua por 30 minutos y después se llevaron a secado por bandejas por un tiempo de 5 horas. Para la prueba A, se utilizó agua a 30°C; la prueba B, utilizó agua a 50°C y finalmente la prueba C utilizó agua a 70°C.

En la Tabla 26 se presentan los resultados del índice de absorción de agua (WAI), porcentaje de solubilidad (%WS) y poder de hinchamiento (SP) para el tratamiento control, pregelatinizado, y "heat moisture treatment" A, B y C.

**Tabla 26**. Resultados de pruebas preliminares de hidratación para arroz.

| Tratamiento | WAI | WS | SP |
|---|---|---|---|
| Pregelatinizado (Taniguchi et al., 1988) | $3.53^{a}$ | $3.46^{a}$ | $3.41^{a}$ |
| Heat Moisture Treatment (Wadchararat et al., 2006) | | | |
| A | $2.46^{b}$ | $1.81^{b}$ | $2.42^{b}$ |
| B | $2.64^{bc}$ | $2.31^{b}$ | $2.58^{bc}$ |
| C | $2.74^{c}$ | $2.01^{b}$ | $2.69^{c}$ |
| Control (arroz crudo) | $2.13^{d}$ | $0.86^{b}$ | $2.11^{d}$ |

Medias seguidas por la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes ($p<0.05$).
WAI, índice de absorción de agua, WS% solubilidad en agua, SP% poder de hinchamiento

En el índice de absorción de agua se encontró diferencia significativa entre los tratamientos y el control. Se observa que hay diferencia significativa entre el tratamiento pregelatinizado y los tratamientos de "heat moisture treatment". El máximo valor de absorción de agua se obtuvo en el tratamiento de pregalitinización. En cuando a la solubilidad en agua, se observa que el tratamiento de "heat moisture treatment" no tuvo influencia significativa, sin embargo se observa que el tratamiento de pregelatinización demuestra un aumento significativo en la solubilidad.

Por último, el poder de hinchamiento, al igual que la absorción de agua presentó diferencia significativa entre el tratamiento de pregelatinización y los tratamientos de "heat moisture treatment". Todos los tratamientos fueron significativamente diferentes al control. El tratamiento que presentó mayor poder de hinchamiento fue el de pregelatinización. A la luz de estos resultados se concluyó que se utilizaría el tratamiento de pregelatinización para modificar el almidón del arroz y convertirlo en el medio de absorción del agua de la fermentación.

## 8.3 Ejemplo de cálculo para concentración de estándares de aminoácidos

A continuación se presenta un ejemplo de cálculo para la dilución de los estándares y un ejemplo de la concentración y cantidad que se inyecta en 5µL de solución de estándares.

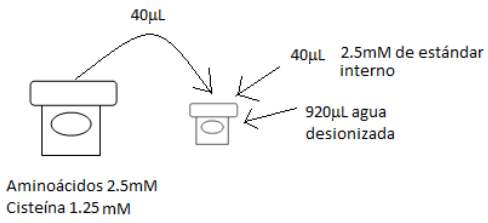



**Figura 10.** Primera dilución de estándar de calibración de aminoácidos.

a) Para todos los aminoácidos excepto cisteína,

$$C_1V_1 = C_fV_f$$

$$(2.5mM)(40\mu L) = C_f(1000\mu L)$$

$$C_f = 0.1mM$$

b) Cisteína

$$C_1V_1 = C_fV_f$$

$$(1.25mM)(40\mu L) = C_f(1000\mu L)$$

$$C_f = 0.05mM$$

c) Transformando la concentración de milimolar a pmol/µL para los aminoácidos excepto cisteína

$$0.1\frac{mMol}{L} * \left(\frac{1\ mol}{1000mMol}\right) * \left(\frac{1L}{1{,}000{,}000\mu L}\right) * \left(\frac{1.0x10^{12}pmol}{1mol}\right) = \frac{100pmol}{\mu L}$$

d) Transformando la concentración de milimolar a pmol/µL para cisteína

$$0.05\frac{mMol}{L} * \left(\frac{1\ mol}{1000mMol}\right) * \left(\frac{1L}{1{,}000{,}000\mu L}\right) * \left(\frac{1.0x10^{12}pmol}{1mol}\right) = \frac{50pmol}{\mu L}$$

Entonces para la derivatización se realizó una segunda dilución

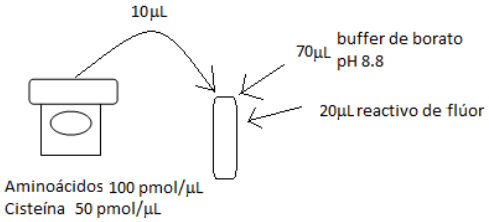



**Figura 11.** Segunda dilución y derivatización de los estándares de aminoácidos

e) Para todos los aminoácidos excepto cisteína,

$$C_1V_1 = C_fV_f$$

$$(100pmol/\mu L)(10\mu L) = C_f(100\mu L)$$

$$C_f = \frac{10pmol}{\mu L} * 5\mu L\ inyección = 50pmol$$

f) Cisteína

$$C_1V_1 = C_fV_f$$

$$(50pmol/\mu L)(10\mu L) = C_f(100\mu L)$$

$$C_f = \frac{5pmol}{\mu L} * 5\mu L\ inyección = 25pmol$$

## 8.4 Resultados Estadísticos

### Determinación de PH

**Analysis of variance**

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| pH | 36 | 0.99 | 0.99 | 1.86 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model | 29.86 | 11 | 2.71 | 340.21 | <0.0001 |
| Tiempo | 29.26 | 3 | 9.75 | 1222.69 | <0.0001 |
| Tratamiento | 0.35 | 2 | 0.17 | 21.64 | <0.0001 |
| Tiempo*Tratamiento | 0.25 | 6 | 0.04 | 5.15 | 0.0016 |
| Error | 0.19 | 24 | 0.01 | | |
| Total | 30.05 | 35 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=0.11614**

*Error: 0.0080 df: 24*

| Tiempo | Means | n | S.E. | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 6.35 | 9 | 0.03 | A | | |
| 24 | 4.53 | 9 | 0.03 | | B | |
| 48 | 4.20 | 9 | 0.03 | | | C |
| >50 | 4.16 | 9 | 0.03 | | | C |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=0.09107**

*Error: 0.0080 df: 24*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 28C-65.4h | 4.91 | 12 | 0.03 | A | |
| 42C-51h | 4.84 | 12 | 0.03 | A | |
| 35C-57.7h | 4.68 | 12 | 0.03 | | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=0.26295**

*Error: 0.0080 df: 24*

| Tiempo | Tratamiento | Means | n | S.E. | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 42C-51h | 6.38 | 3 | 0.05 | A | | | | |
| 0 | 35C-57.7h | 6.37 | 3 | 0.05 | A | | | | |
| 0 | 28C-65.4h | 6.30 | 3 | 0.05 | A | | | | |
| 24 | 28C-65.4h | 4.75 | 3 | 0.05 | | B | | | |
| 24 | 42C-51h | 4.48 | 3 | 0.05 | | | C | | |
| 24 | 35C-57.7h | 4.35 | 3 | 0.05 | | | C | | |
| 48 | 28C-65.4h | 4.29 | 3 | 0.05 | | | C | D | |
| >50 | 28C-65.4h | 4.28 | 3 | 0.05 | | | C | D | |
| 48 | 42C-51h | 4.26 | 3 | 0.05 | | | C | D | |
| >50 | 42C-51h | 4.26 | 3 | 0.05 | | | C | D | |
| 48 | 35C-57.7h | 4.04 | 3 | 0.05 | | | | D | E |
| >50 | 35C-57.7h | 3.94 | 3 | 0.05 | | | | | E |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

## Análisis de WAI, WS% y SP% para el arroz

**Analysis of variance**

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| WAI | 15 | 0.95 | 0.94 | 4.63 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model | 3.87 | 1 | 3.87 | 238.17 | <0.0001 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Tratamiento | 3.87 | 1 | 3.87 | 238.17 | <0.0001 |
| Error | 0.21 | 13 | 0.02 | | |
| Total | 4.08 | 14 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=0.14361**

*Error: 0.0162 df: 13*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Pregelatinizado | 3.17 | 9 | 0.04 | A | |
| Control | 2.13 | 6 | 0.05 | | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| WS% | 15 | 0.86 | 0.85 | 25.32 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model | 50.65 | 1 | 50.65 | 81.65 | <0.0001 |
| Tratamiento | 50.65 | 1 | 50.65 | 81.65 | <0.0001 |
| Error | 8.06 | 13 | 0.62 | | |
| Total | 58.72 | 14 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=0.88765**

*Error: 0.6204 df: 13*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Pregelatinizado | 4.61 | 9 | 0.26 | A | |
| Control | 0.86 | 6 | 0.32 | | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| SP% | 15 | 0.93 | 0.92 | 4.98 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model | 2.98 | 1 | 2.98 | 170.44 | <0.0001 |
| Tratamiento | 2.98 | 1 | 2.98 | 170.44 | <0.0001 |
| Error | 0.23 | 13 | 0.02 | | |
| Total | 3.21 | 14 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=0.14898**

*Error: 0.0175 df: 13*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Pregelatinizado | 3.02 | 9 | 0.04 | A | |
| Control | 2.11 | 6 | 0.05 | | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

## Carbohidratos Solubles en Gandul Fermentado y Control.

**Analysis of variance**

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| Estaquiosa | 30 | 0.8982 | 0.8769 | 67.1061 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model | 0.0586 | 5 | 0.0117 | 42.3297 | <0.0001 |
| Tratamiento | 0.0574 | 3 | 0.0191 | 69.1043 | <0.0001 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Replica | 0.0012 | 2 | 0.0006 | 2.1678 | 0.1363 |
| Error | 0.0066 | 24 | 0.0003 | | |
| Total | 0.0653 | 29 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=0.02483**

*Error: 0.0003 df: 24*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | | |
|---|---|---|---|---|---|
| control | 0.1547 | 3 | 0.0096 | A | |
| 28C-65.4h | 0.0166 | 9 | 0.0055 | | B |
| 42C-51h | 0.0134 | 9 | 0.0055 | | B |
| 35C-57.7h | 0.0011 | 9 | 0.0055 | | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

**Analysis of variance**

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| Rafinosa | 30 | 0.9202 | 0.9036 | 25.9142 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model | 0.0774 | 5 | 0.0155 | 55.3764 | <0.0001 |
| Tratamiento | 0.0762 | 3 | 0.0254 | 90.8407 | <0.0001 |
| Replica | 0.0012 | 2 | 0.0006 | 2.1798 | 0.1349 |
| Error | 0.0067 | 24 | 0.0003 | | |
| Total | 0.0841 | 29 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=0.02495**

*Error: 0.0003 df: 24*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | | |
|---|---|---|---|---|---|
| control | 0.2127 | 3 | 0.0097 | A | |
| 28C-65.4h | 0.0578 | 9 | 0.0056 | | B |
| 42C-51h | 0.0532 | 9 | 0.0056 | | B |
| 35C-57.7h | 0.0332 | 9 | 0.0056 | | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

**Analysis of variance**

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| Sacarosa | 30 | 0.99 | 0.99 | 23.16 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model | 5.18 | 5 | 1.04 | 458.54 | <0.0001 |
| Tratamiento | 5.18 | 3 | 1.73 | 764.12 | <0.0001 |
| Replica | 7.6E-04 | 2 | 3.8E-04 | 0.17 | 0.8468 |
| Error | 0.05 | 24 | 2.3E-03 | | |
| Total | 5.23 | 29 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=0.07091**

*Error: 0.0023 df: 24*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| control | 1.44 | 3 | 0.03 | A | | |
| 42C-51h | 0.15 | 9 | 0.02 | | B | |
| 35C-57.7h | 0.05 | 9 | 0.02 | | | C |
| 28C-65.4h | 4.0E-03 | 9 | 0.02 | | | C |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

**Analysis of variance**

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| Glucosa | 30 | 0.95 | 0.94 | 25.22 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model | 36.41 | 5 | 7.28 | 88.62 | <0.0001 |
| Tratamiento | 36.27 | 3 | 12.09 | 147.12 | <0.0001 |
| Replica | 0.14 | 2 | 0.07 | 0.86 | 0.4371 |
| Error | 1.97 | 24 | 0.08 | | |
| Total | 38.38 | 29 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=0.42764**

*Error: 0.0822 df: 24*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 42C-51h | 2.75 | 9 | 0.10 | A | | |
| control | 1.31 | 3 | 0.17 | | B | |
| 35C-57.7h | 0.32 | 9 | 0.10 | | | C |
| 28C-65.4h | 0.28 | 9 | 0.10 | | | C |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

**Analysis of variance**

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| Galactosa | 30 | 0.71 | 0.65 | 33.35 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model | 0.77 | 5 | 0.15 | 11.84 | <0.0001 |
| Tratamiento | 0.74 | 3 | 0.25 | 19.10 | <0.0001 |
| Replica | 0.02 | 2 | 0.01 | 0.95 | 0.4011 |
| Error | 0.31 | 24 | 0.01 | | |
| Total | 1.08 | 29 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=0.16992**

*Error: 0.0130 df: 24*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 42C-51h | 0.55 | 9 | 0.04 | A | | |
| 28C-65.4h | 0.34 | 9 | 0.04 | | B | |
| 35C-57.7h | 0.21 | 9 | 0.04 | | B | C |
| control | 0.10 | 3 | 0.07 | | | C |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

**Analysis of variance**

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| Fructosa | 30 | 0.85 | 0.82 | 16.13 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model | 2.95 | 5 | 0.59 | 27.01 | <0.0001 |
| Tratamiento | 2.77 | 3 | 0.92 | 42.33 | <0.0001 |
| Replica | 0.18 | 2 | 0.09 | 4.03 | 0.0310 |
| Error | 0.52 | 24 | 0.02 | | |
| Total | 3.47 | 29 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=0.22039**

*Error: 0.0218 df: 24*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| control | 1.75 | 3 | 0.09 | A | | |
| 42C-51h | 0.99 | 9 | 0.05 | | B | |
| 35C-57.7h | 0.80 | 9 | 0.05 | | B | C |
| 28C-65.4h | 0.68 | 9 | 0.05 | | | C |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

## Análisis de Perfil de Aminoácidos en Gandul

**Analysis of variance**

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| ASP | 30 | 0.28 | 0.20 | 24.14 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 11.01 | 3 | 3.67 | 3.36 | 0.0339 |
| Tratamiento | 11.01 | 3 | 3.67 | 3.36 | 0.0339 |
| Error | 28.38 | 26 | 1.09 | | |
| Total | 39.38 | 29 | | | |

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| SER | 30 | 0.20 | 0.11 | 32.70 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 5.40 | 3 | 1.80 | 2.17 | 0.1153 |
| Tratamiento | 5.40 | 3 | 1.80 | 2.17 | 0.1153 |
| Error | 21.53 | 26 | 0.83 | | |
| Total | 26.93 | 29 | | | |

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| GLU | 30 | 0.07 | 0.00 | 39.11 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 8.39 | 3 | 2.80 | 0.62 | 0.6107 |
| Tratamiento | 8.39 | 3 | 2.80 | 0.62 | 0.6107 |
| Error | 117.94 | 26 | 4.54 | | |
| Total | 126.32 | 29 | | | |

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| GLY | 30 | 0.13 | 0.03 | 33.07 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 2.19 | 3 | 0.73 | 1.30 | 0.2943 |
| Tratamiento | 2.19 | 3 | 0.73 | 1.30 | 0.2943 |
| Error | 14.54 | 26 | 0.56 | | |
| Total | 16.73 | 29 | | | |

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| HIS | 29 | 0.01 | 0.00 | 31.25 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 0.53 | 3 | 0.18 | 0.09 | 0.9623 |
| Tratamiento | 0.53 | 3 | 0.18 | 0.09 | 0.9623 |
| Error | 46.93 | 25 | 1.88 | | |
| Total | 47.46 | 28 | | | |

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| NH3 | 29 | 0.26 | 0.17 | 39.28 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 2.88 | 3 | 0.96 | 2.95 | 0.0523 |
| Tratamiento | 2.88 | 3 | 0.96 | 2.95 | 0.0523 |
| Error | 8.15 | 25 | 0.33 | | |
| Total | 11.03 | 28 | | | |

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| ARG | 30 | 0.08 | 0.00 | 15.34 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 1.79 | 3 | 0.60 | 0.78 | 0.5182 |
| Tratamiento | 1.79 | 3 | 0.60 | 0.78 | 0.5182 |
| Error | 19.95 | 26 | 0.77 | | |
| Total | 21.73 | 29 | | | |

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| THR | 30 | 0.13 | 0.03 | 14.60 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 1.00 | 3 | 0.33 | 1.27 | 0.3041 |
| Tratamiento | 1.00 | 3 | 0.33 | 1.27 | 0.3041 |
| Error | 6.82 | 26 | 0.26 | | |
| Total | 7.82 | 29 | | | |

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| ALA | 30 | 0.10 | 0.00 | 6.43 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 0.16 | 3 | 0.05 | 0.98 | 0.4153 |
| Tratamiento | 0.16 | 3 | 0.05 | 0.98 | 0.4153 |
| Error | 1.40 | 26 | 0.05 | | |
| Total | 1.56 | 29 | | | |

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| PRO | 30 | 0.16 | 0.06 | 14.62 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 2.44 | 3 | 0.81 | 1.66 | 0.1999 |
| Tratamiento | 2.44 | 3 | 0.81 | 1.66 | 0.1999 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Error | 12.73 | 26 | 0.49 | | |
| Total | 15.17 | 29 | | | |

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| CYS | 30 | 0.12 | 0.02 | 36.85 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 2.95 | 3 | 0.98 | 1.21 | 0.3266 |
| Tratamiento | 2.95 | 3 | 0.98 | 1.21 | 0.3266 |
| Error | 21.15 | 26 | 0.81 | | |
| Total | 24.10 | 29 | | | |

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| TYR | 30 | 0.06 | 0.00 | 7.06 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 0.14 | 3 | 0.05 | 0.53 | 0.6660 |
| Tratamiento | 0.14 | 3 | 0.05 | 0.53 | 0.6660 |
| Error | 2.22 | 26 | 0.09 | | |
| Total | 2.36 | 29 | | | |

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| VAL | 30 | 0.28 | 0.20 | 7.56 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 1.35 | 3 | 0.45 | 3.43 | 0.0316 |
| Tratamiento | 1.35 | 3 | 0.45 | 3.43 | 0.0316 |
| Error | 3.42 | 26 | 0.13 | | |
| Total | 4.77 | 29 | | | |

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| MET | 30 | 0.10 | 1.1E-03 | 16.04 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 0.65 | 3 | 0.22 | 1.01 | 0.4037 |
| Tratamiento | 0.65 | 3 | 0.22 | 1.01 | 0.4037 |
| Error | 5.54 | 26 | 0.21 | | |
| Total | 6.19 | 29 | | | |

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| LYS | 30 | 0.13 | 0.03 | 15.15 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 1.42 | 3 | 0.47 | 1.33 | 0.2860 |
| Tratamiento | 1.42 | 3 | 0.47 | 1.33 | 0.2860 |
| Error | 9.24 | 26 | 0.36 | | |
| Total | 10.65 | 29 | | | |

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| ILE | 30 | 0.20 | 0.10 | 9.91 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 1.34 | 3 | 0.45 | 2.12 | 0.1215 |
| Tratamiento | 1.34 | 3 | 0.45 | 2.12 | 0.1215 |
| Error | 5.48 | 26 | 0.21 | | |
| Total | 6.82 | 29 | | | |

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| LEU | 30 | 0.16 | 0.07 | 13.39 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 2.96 | 3 | 0.99 | 1.68 | 0.1956 |
| Tratamiento | 2.96 | 3 | 0.99 | 1.68 | 0.1956 |
| Error | 15.24 | 26 | 0.59 | | |
| Total | 18.19 | 29 | | | |

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| PHE | 30 | 0.15 | 0.06 | 14.15 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 3.12 | 3 | 1.04 | 1.57 | 0.2208 |
| Tratamiento | 3.12 | 3 | 1.04 | 1.57 | 0.2208 |
| Error | 17.26 | 26 | 0.66 | | |
| Total | 20.38 | 29 | | | |

## Análisis de Perfil de Aminoácidos en Arroz

**Analysis of variance**

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| ASP | 6 | 0.74 | 0.68 | 65.82 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 33.00 | 1 | 33.00 | 11.58 | 0.0272 |
| Tratamiento | 33.00 | 1 | 33.00 | 11.58 | 0.0272 |
| Error | 11.40 | 4 | 2.85 | | |
| Total | 44.40 | 5 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=3.82740**

*Error: 2.8505 df: 4*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Arroz Pregelatinizado | 0.22 | 3 | 0.97 | A | |
| Control arroz | 4.91 | 3 | 0.97 | | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| SER | 6 | 1.00 | 1.00 | 2.28 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 11.90 | 1 | 11.90 | 10109.59 | <0.0001 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Tratamiento | 11.90 | 1 | 11.90 | 10109.59 | <0.0001 |
| Error | 4.7E-03 | 4 | 1.2E-03 | | |
| Total | 11.91 | 5 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=0.07779**

*Error: 0.0012 df: 4*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | |
|---|---|---|---|---|
| Arroz Pregelatinizado | 0.10 | 3 | 0.02 | A |
| Control arroz | 2.91 | 3 | 0.02 | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| GLU | 6 | 1.00 | 0.99 | 8.14 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 178.84 | 1 | 178.84 | 831.64 | <0.0001 |
| Tratamiento | 178.84 | 1 | 178.84 | 831.64 | <0.0001 |
| Error | 0.86 | 4 | 0.22 | | |
| Total | 179.70 | 5 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=1.05127**

*Error: 0.2150 df: 4*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | |
|---|---|---|---|---|
| Arroz Pregelatinizado | 0.24 | 3 | 0.27 | A |
| Control arroz | 11.16 | 3 | 0.27 | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| GLY | 6 | 0.02 | 0.00 | 127.91 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 1.0E-03 | 1 | 1.0E-03 | 0.09 | 0.7756 |
| Tratamiento | 1.0E-03 | 1 | 1.0E-03 | 0.09 | 0.7756 |
| Error | 0.04 | 4 | 0.01 | | |
| Total | 0.04 | 5 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=0.23587**

*Error: 0.0108 df: 4*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | |
|---|---|---|---|---|
| Arroz Pregelatinizado | 0.07 | 3 | 0.06 | A |
| Control arroz | 0.09 | 3 | 0.06 | A |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| HIS | 6 | 0.23 | 0.04 | 200.57 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 0.79 | 1 | 0.79 | 1.19 | 0.3375 |
| Tratamiento | 0.79 | 1 | 0.79 | 1.19 | 0.3375 |
| Error | 2.67 | 4 | 0.67 | | |
| Total | 3.47 | 5 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=1.85347**

*Error: 0.6685 df: 4*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | |
|---|---|---|---|---|
| Arroz Pregelatinizado | 0.04 | 3 | 0.47 | A |
| Control arroz | 0.77 | 3 | 0.47 | A |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| NH3 | 6 | 0.89 | 0.87 | 28.11 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 4.16 | 1 | 4.16 | 33.23 | 0.0045 |
| Tratamiento | 4.16 | 1 | 4.16 | 33.23 | 0.0045 |
| Error | 0.50 | 4 | 0.13 | | |
| Total | 4.66 | 5 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=0.80211**

*Error: 0.1252 df: 4*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Arroz Pregelatinizado | 0.43 | 3 | 0.20 | A | |
| Control arroz | 2.09 | 3 | 0.20 | | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| ARG | 6 | 0.90 | 0.88 | 39.95 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 65.98 | 1 | 65.98 | 37.35 | 0.0036 |
| Tratamiento | 65.98 | 1 | 65.98 | 37.35 | 0.0036 |
| Error | 7.07 | 4 | 1.77 | | |
| Total | 73.05 | 5 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=3.01310**

*Error: 1.7666 df: 4*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Arroz Pregelatinizado | 0.01 | 3 | 0.77 | A | |
| Control arroz | 6.64 | 3 | 0.77 | | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| THR | 6 | 0.67 | 0.58 | 84.58 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 23.10 | 1 | 23.10 | 7.97 | 0.0477 |
| Tratamiento | 23.10 | 1 | 23.10 | 7.97 | 0.0477 |
| Error | 11.59 | 4 | 2.90 | | |
| Total | 34.69 | 5 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=3.85904**

*Error: 2.8978 df: 4*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Arroz Pregelatinizado | 0.05 | 3 | 0.98 | A | |
| Control arroz | 3.97 | 3 | 0.98 | | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| ALA | 6 | 0.76 | 0.70 | 53.86 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 9.06 | 1 | 9.06 | 12.68 | 0.0236 |
| Tratamiento | 9.06 | 1 | 9.06 | 12.68 | 0.0236 |
| Error | 2.86 | 4 | 0.71 | | |
| Total | 11.92 | 5 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=1.91671**

*Error: 0.7149 df: 4*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | |
|---|---|---|---|---|
| Arroz Pregelatinizado | 0.34 | 3 | 0.49 | A |
| Control arroz | 2.80 | 3 | 0.49 | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| PRO | 6 | 0.95 | 0.94 | 19.40 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 30.54 | 1 | 30.54 | 78.20 | 0.0009 |
| Tratamiento | 30.54 | 1 | 30.54 | 78.20 | 0.0009 |
| Error | 1.56 | 4 | 0.39 | | |
| Total | 32.10 | 5 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=1.41672**

*Error: 0.3906 df: 4*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | |
|---|---|---|---|---|
| Arroz Pregelatinizado | 0.97 | 3 | 0.36 | A |
| Control arroz | 5.48 | 3 | 0.36 | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| CYS | 6 | 0.36 | 0.20 | 162.32 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 0.24 | 1 | 0.24 | 2.28 | 0.2058 |
| Tratamiento | 0.24 | 1 | 0.24 | 2.28 | 0.2058 |
| Error | 0.41 | 4 | 0.10 | | |
| Total | 0.65 | 5 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=0.73001**

*Error: 0.1037 df: 4*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | |
|---|---|---|---|---|
| Arroz Pregelatinizado | 0.00 | 3 | 0.19 | A |
| Control arroz | 0.40 | 3 | 0.19 | A |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| TYR | 6 | 0.95 | 0.94 | 26.21 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 21.98 | 1 | 21.98 | 75.09 | 0.0010 |
| Tratamiento | 21.98 | 1 | 21.98 | 75.09 | 0.0010 |
| Error | 1.17 | 4 | 0.29 | | |

| | | |
|---|---|---|
| Total | 23.15 | 5 |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=1.22655**

*Error: 0.2927 df: 4*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Arroz Pregelatinizado | 0.15 | 3 | 0.31 | A | |
| Control arroz | 3.98 | 3 | 0.31 | | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

| Variable | N | R² | Adj R² | CV |
|---|---|---|---|---|
| VAL | 6 | 0.97 | 0.96 | 21.15 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 72.82 | 1 | 72.82 | 127.28 | 0.0004 |
| Tratamiento | 72.82 | 1 | 72.82 | 127.28 | 0.0004 |
| Error | 2.29 | 4 | 0.57 | | |
| Total | 75.11 | 5 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=1.71472**

*Error: 0.5721 df: 4*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Arroz Pregelatinizado | 0.09 | 3 | 0.44 | A | |
| Control arroz | 7.06 | 3 | 0.44 | | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

| Variable | N | R² | Adj R² | CV |
|---|---|---|---|---|
| MET | 6 | 0.93 | 0.91 | 34.03 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 4.93 | 1 | 4.93 | 51.81 | 0.0020 |
| Tratamiento | 4.93 | 1 | 4.93 | 51.81 | 0.0020 |
| Error | 0.38 | 4 | 0.10 | | |
| Total | 5.31 | 5 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=0.69955**

*Error: 0.0952 df: 4*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Arroz Pregelatinizado | 0.00 | 3 | 0.18 | A | |
| Control arroz | 1.81 | 3 | 0.18 | | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

| Variable | N | R² | Adj R² | CV |
|---|---|---|---|---|
| LYS | 6 | 0.99 | 0.99 | 7.17 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 0.33 | 1 | 0.33 | 470.94 | <0.0001 |
| Tratamiento | 0.33 | 1 | 0.33 | 470.94 | <0.0001 |
| Error | 2.8E-03 | 4 | 7.1E-04 | | |
| Total | 0.34 | 5 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=0.06035**

*Error: 0.0007 df: 4*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | |
|---|---|---|---|---|
| Arroz Pregelatinizado | 0.14 | 3 | 0.02 | A |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Control arroz | 0.61 | 3 | 0.02 | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| ILE | 6 | 0.97 | 0.97 | 20.03 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 32.82 | 1 | 32.82 | 140.89 | 0.0003 |
| Tratamiento | 32.82 | 1 | 32.82 | 140.89 | 0.0003 |
| Error | 0.93 | 4 | 0.23 | | |
| Total | 33.75 | 5 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=1.09415**

*Error: 0.2330 df: 4*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | |
|---|---|---|---|---|
| Arroz Pregelatinizado | 0.07 | 3 | 0.28 | A |
| Control arroz | 4.75 | 3 | 0.28 | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| LEU | 6 | 0.98 | 0.98 | 16.41 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 79.40 | 1 | 79.40 | 201.51 | 0.0001 |
| Tratamiento | 79.40 | 1 | 79.40 | 201.51 | 0.0001 |
| Error | 1.58 | 4 | 0.39 | | |
| Total | 80.98 | 5 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=1.42303**

*Error: 0.3940 df: 4*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | |
|---|---|---|---|---|
| Arroz Pregelatinizado | 0.19 | 3 | 0.36 | A |
| Control arroz | 7.46 | 3 | 0.36 | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| PHE | 6 | 0.96 | 0.96 | 22.60 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 32.82 | 1 | 32.82 | 108.33 | 0.0005 |
| Tratamiento | 32.82 | 1 | 32.82 | 108.33 | 0.0005 |
| Error | 1.21 | 4 | 0.30 | | |
| Total | 34.04 | 5 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=1.24788**

*Error: 0.3030 df: 4*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | |
|---|---|---|---|---|
| Arroz Pregelatinizado | 0.10 | 3 | 0.32 | A |
| Control arroz | 4.77 | 3 | 0.32 | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

## Análisis Proximal Gandul

**Analysis of variance**

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| %Grasa B.S. | 30 | 0.08 | 0.00 | 15.95 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 0.38 | 3 | 0.13 | 0.75 | 0.5347 |
| Tratamiento | 0.38 | 3 | 0.13 | 0.75 | 0.5347 |
| Error | 4.43 | 26 | 0.17 | | |
| Total | 4.81 | 29 | | | |

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| %Ceniza B.S. | 30 | 0.18 | 0.09 | 9.03 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 0.60 | 3 | 0.20 | 1.93 | 0.1493 |
| Tratamiento | 0.60 | 3 | 0.20 | 1.93 | 0.1493 |
| Error | 2.69 | 26 | 0.10 | | |
| Total | 3.29 | 29 | | | |

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| %Proteina B.S. | 30 | 0.07 | 0.00 | 6.71 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 4.99 | 3 | 1.66 | 0.69 | 0.5662 |
| Tratamiento | 4.99 | 3 | 1.66 | 0.69 | 0.5662 |
| Error | 62.60 | 26 | 2.41 | | |
| Total | 67.58 | 29 | | | |

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| %Carbohidratos B.S. | 30 | 0.06 | 0.00 | 2.52 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 5.68 | 3 | 1.89 | 0.60 | 0.6227 |
| Tratamiento | 5.68 | 3 | 1.89 | 0.60 | 0.6227 |
| Error | 82.49 | 26 | 3.17 | | |
| Total | 88.17 | 29 | | | |

## Análisis Proximal Arroz

**Analysis of variance**

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| %Carbohidratos B.S. | 6 | 0.81 | 0.77 | 0.47 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 3.26 | 1 | 3.26 | 17.57 | 0.0138 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Tratamiento | 3.26 | 1 | 3.26 | 17.57 | 0.0138 |
| Error | 0.74 | 4 | 0.19 | | |
| Total | 4.00 | 5 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=0.97589**

*Error: 0.1853 df: 4*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Control arroz | 90.09 | 3 | 0.25 | A | |
| Pregel | 91.56 | 3 | 0.25 | | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| %Grasa B.S. | 6 | 0.60 | 0.49 | 45.31 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 0.71 | 1 | 0.71 | 5.89 | 0.0722 |
| Tratamiento | 0.71 | 1 | 0.71 | 5.89 | 0.0722 |
| Error | 0.48 | 4 | 0.12 | | |
| Total | 1.20 | 5 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=0.78916**

*Error: 0.1212 df: 4*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | |
|---|---|---|---|---|
| Pregel | 0.42 | 3 | 0.20 | A |
| Control arroz | 1.11 | 3 | 0.20 | A |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| % Ceniza B.S. | 6 | 0.81 | 0.76 | 21.81 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 0.04 | 1 | 0.04 | 17.19 | 0.0143 |
| Tratamiento | 0.04 | 1 | 0.04 | 17.19 | 0.0143 |
| Error | 0.01 | 4 | 2.2E-03 | | |
| Total | 0.05 | 5 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=0.10713**

*Error: 0.0022 df: 4*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Pregel | 0.14 | 3 | 0.03 | A | |
| Control arroz | 0.30 | 3 | 0.03 | | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

| Variable | N | $R^2$ | Adj $R^2$ | CV |
|---|---|---|---|---|
| %Proteina B.S. | 6 | 0.67 | 0.59 | 3.29 |

**Analysis of variance table (Partial SS)**

| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 0.58 | 1 | 0.58 | 8.05 | 0.0470 |
| Tratamiento | 0.58 | 1 | 0.58 | 8.05 | 0.0470 |
| Error | 0.29 | 4 | 0.07 | | |
| Total | 0.87 | 5 | | | |

**Test:Tukey Alpha:=0.05 LSD:=0.60984**

*Error: 0.0724 df: 4*

| Tratamiento | Means | n | S.E. | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Pregel | 7.88 | 3 | 0.16 | A | |
| Control arroz | 8.50 | 3 | 0.16 | | B |

*Means with a common letter are not significantly different (p<= 0.05)*

### Análisis de Fibra en Gandul

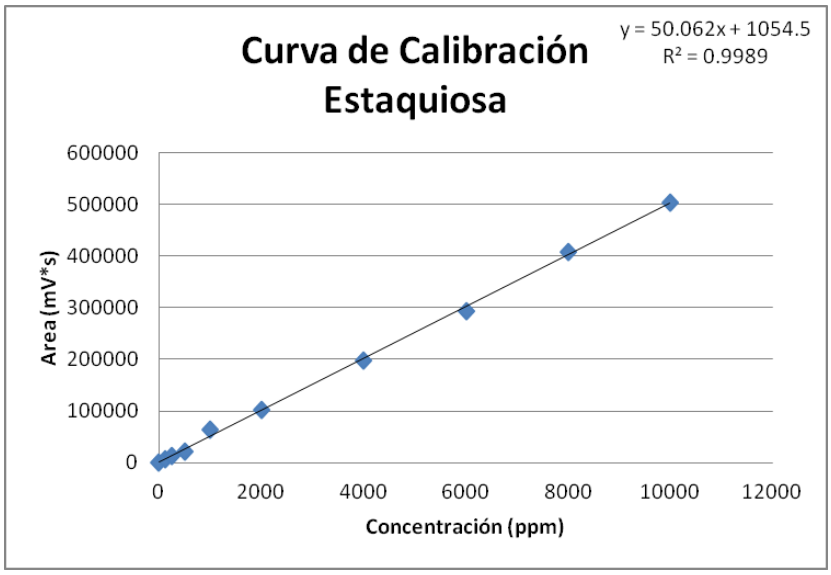
**Analysis of variance**

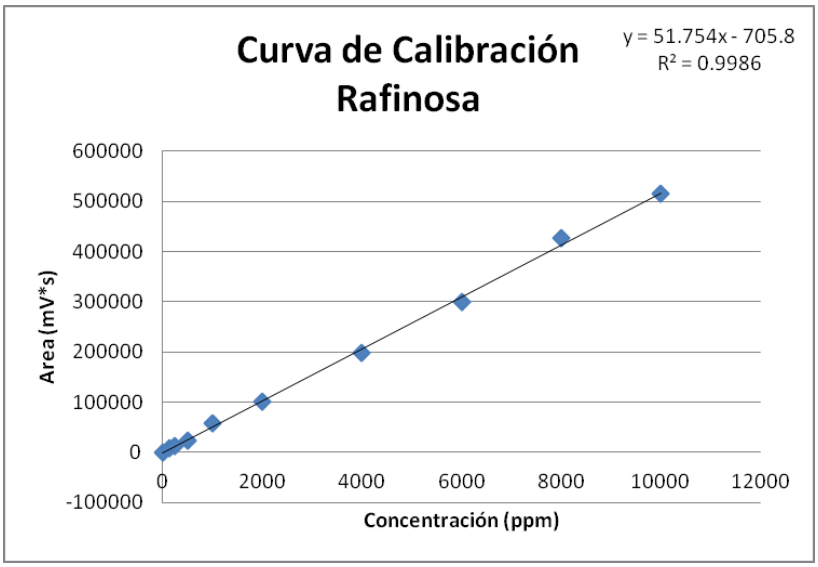
| Variable | N | R² | Adj R² | CV |
|---|---|---|---|---|
| Fibra | 30 | 0.05 | 0.00 | 66.27 |

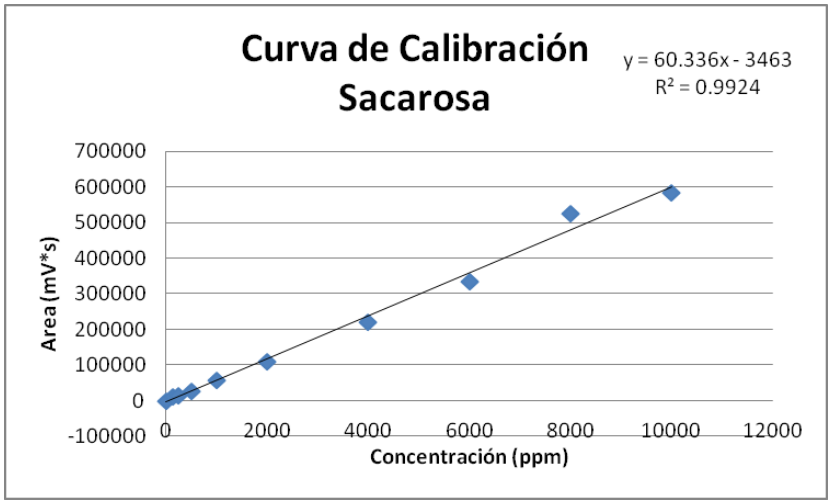
**Analysis of variance table (Partial SS)**

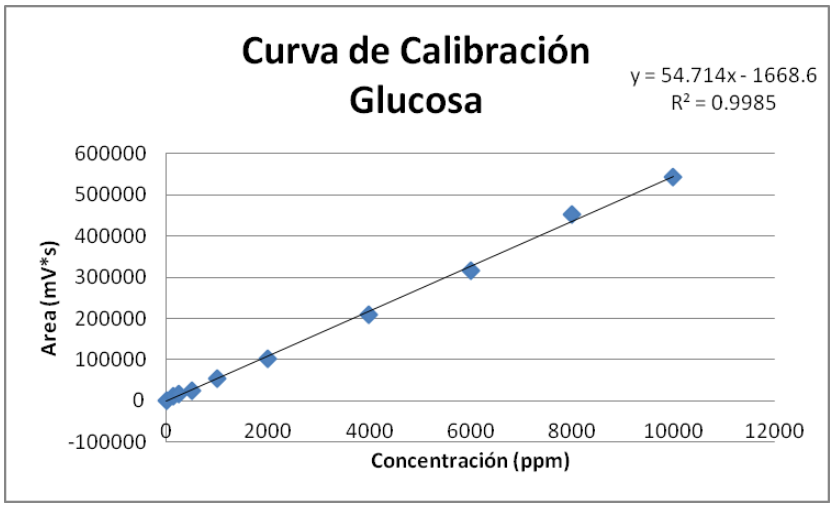
| S.V. | SS | df | MS | F | p-value |
|---|---|---|---|---|---|
| Model. | 80.64 | 3 | 26.88 | 0.50 | 0.6887 |
| Tratamiento | 80.64 | 3 | 26.88 | 0.50 | 0.6887 |
| Error | 1411.09 | 26 | 54.27 | | |
| Total | 1491.73 | 29 | | | |

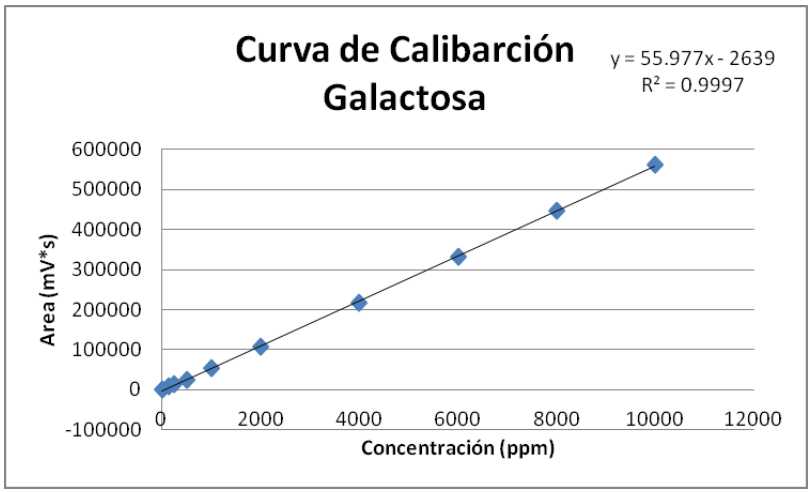
## 8.5 Curvas de calibración de carbohidratos (método de HPLC)

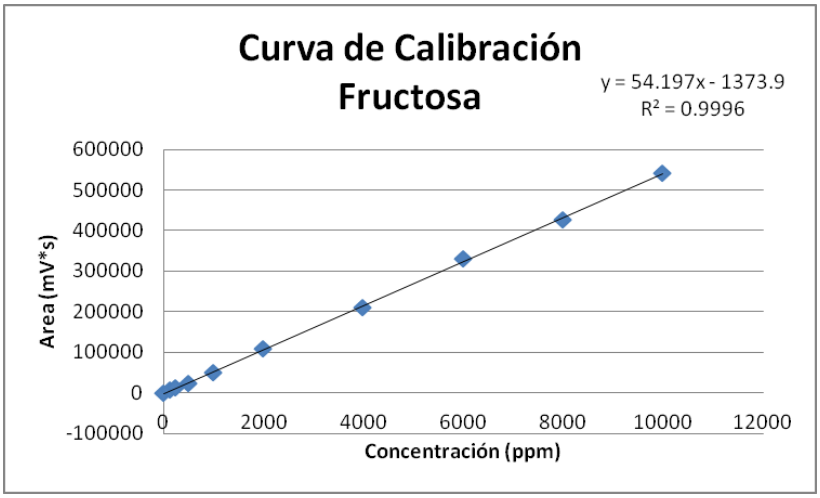



Curva de Calibración Rafinosa
y = 51.754x - 705.8
R² = 0.9986
Area (mV*s)
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
-100000
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
Concentración (ppm)

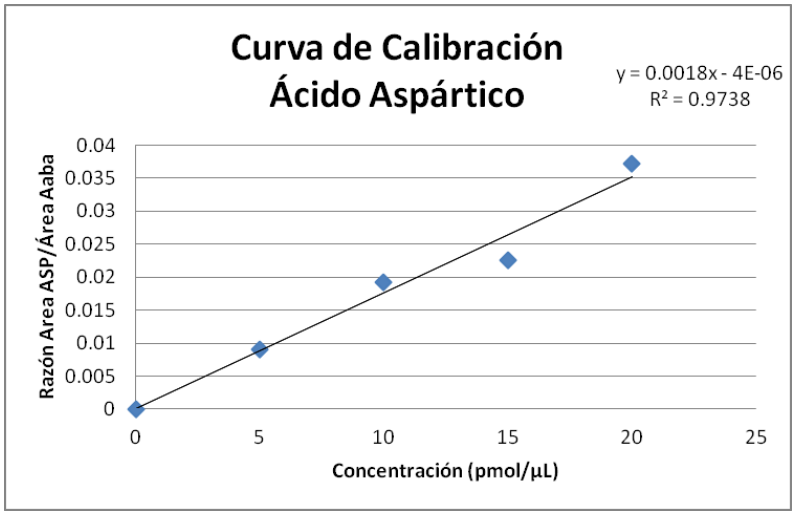

Curva de Calibración Sacarosa
y = 60.336x - 3463
R² = 0.9924
Area (mV*s)
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
-100000
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
Concentración (ppm)

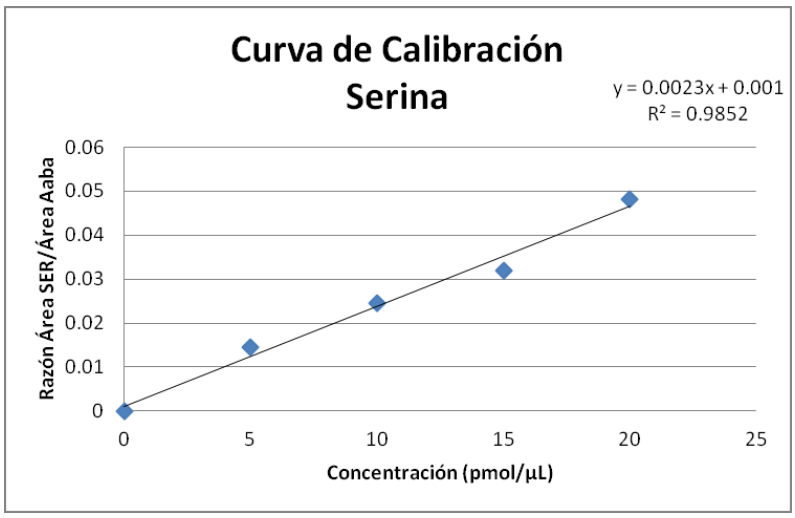

Curva de Calibración Glucosa
y = 54.714x - 1668.6
R² = 0.9985
Area (mV*s)
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
-100000
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
Concentración (ppm)

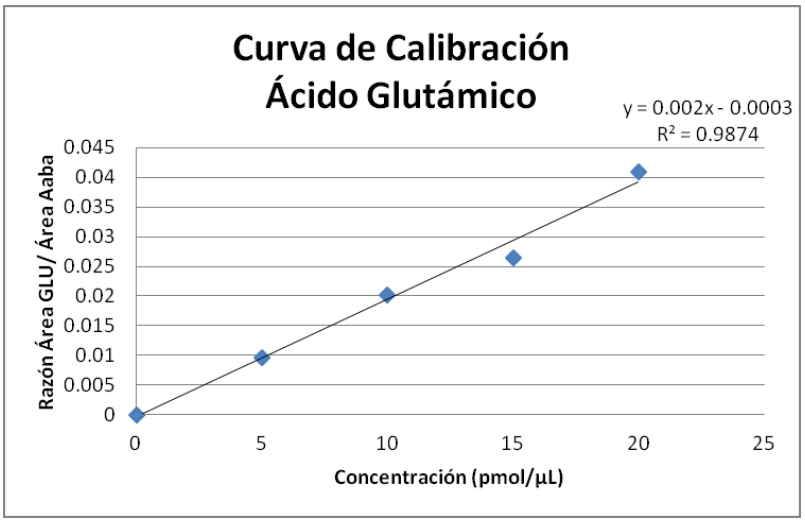


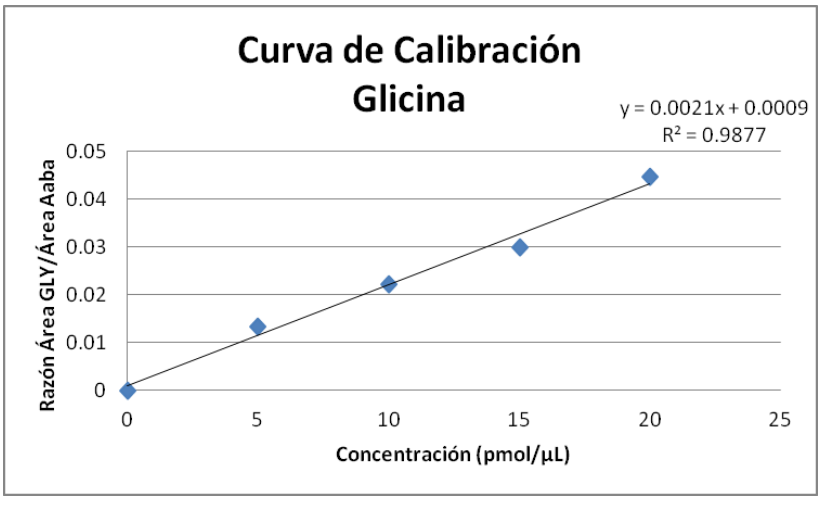



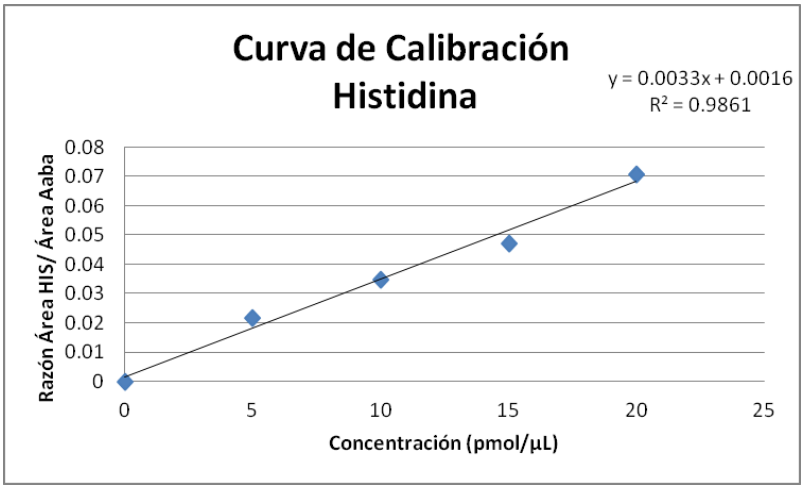

## 8.6 Curvas de calibración de aminoácidos- curva con valores pequeños (método de HPLC)

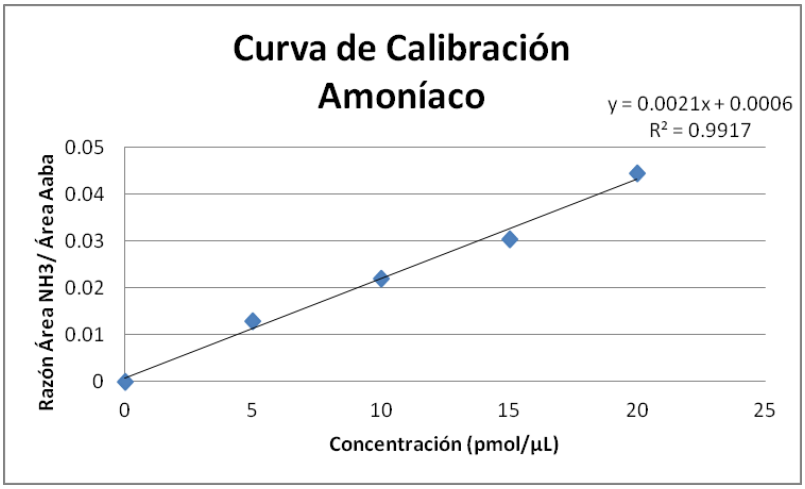


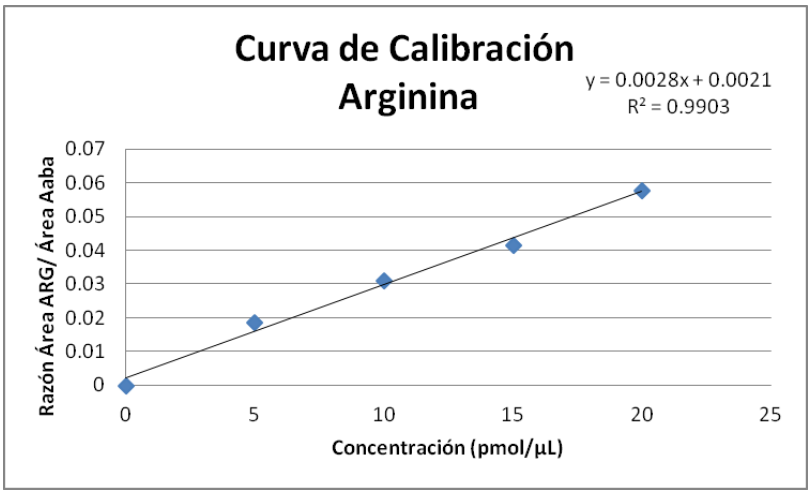

Curva de Calibración
Serina
y = 0.0023x + 0.001
R² = 0.9852
Razón Área SER/Área Aaba
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
0
5
10
15
20
25
Concentración (pmol/µL)

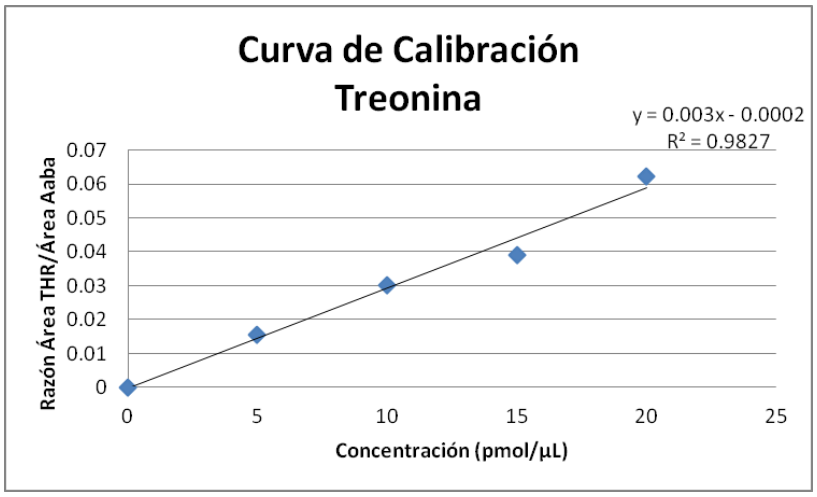

Curva de Calibración
Ácido Glutámico
y = 0.002x - 0.0003
R² = 0.9874
Razón Área GLU/ Área Aaba
0.045
0.04
0.035
0.03
0.025
0.02
0.015
0.01
0.005
0
0
5
10
15
20
25
Concentración (pmol/µL)

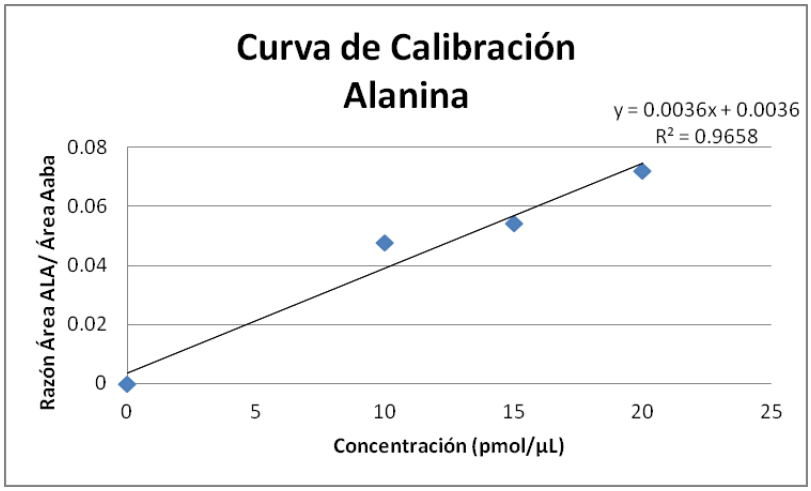

Curva de Calibración
Glicina
y = 0.0021x + 0.0009
R² = 0.9877
Razón Área GLY/Área Aaba
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
0
5
10
15
20
25
Concentración (pmol/µL)

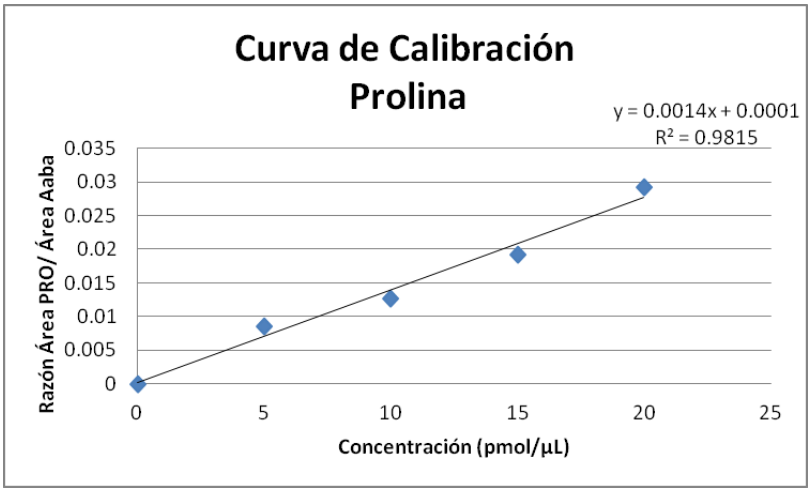

Curva de Calibración
Histidina
y = 0.0033x + 0.0016
R² = 0.9861
Razón Área HIS/ Área Aaba
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
0
5
10
15
20
25
Concentración (pmol/µL)

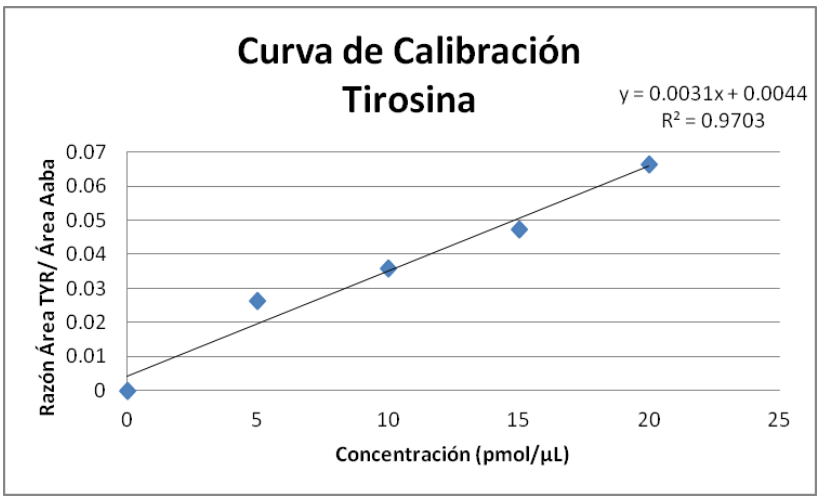

Curva de Calibración
Amoníaco
y = 0.0021x + 0.0006
R² = 0.9917
Razón Área NH3/ Área Aaba
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
0
5
10
15
20
25
Concentración (pmol/µL)

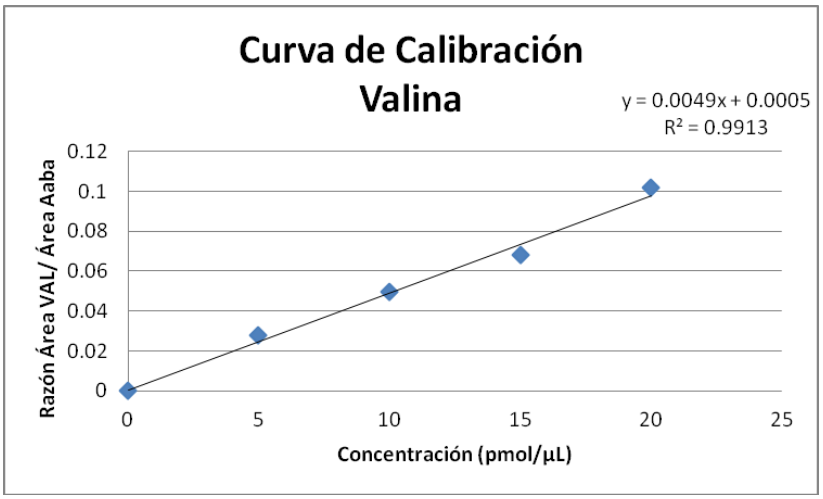

Curva de Calibración
Arginina
y = 0.0028x + 0.0021
R² = 0.9903
Razón Área ARG/ Área Aaba
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
0
5
10
15
20
25
Concentración (pmol/µL)

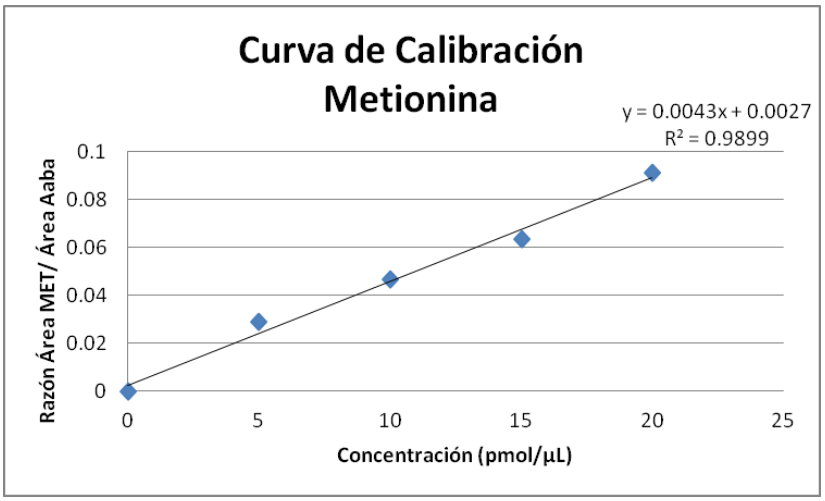

Curva de Calibración
Treonina
y = 0.003x - 0.0002
R² = 0.9827
Razón Área THR/Área Aaba
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
0
5
10
15
20
25
Concentración (pmol/µL)

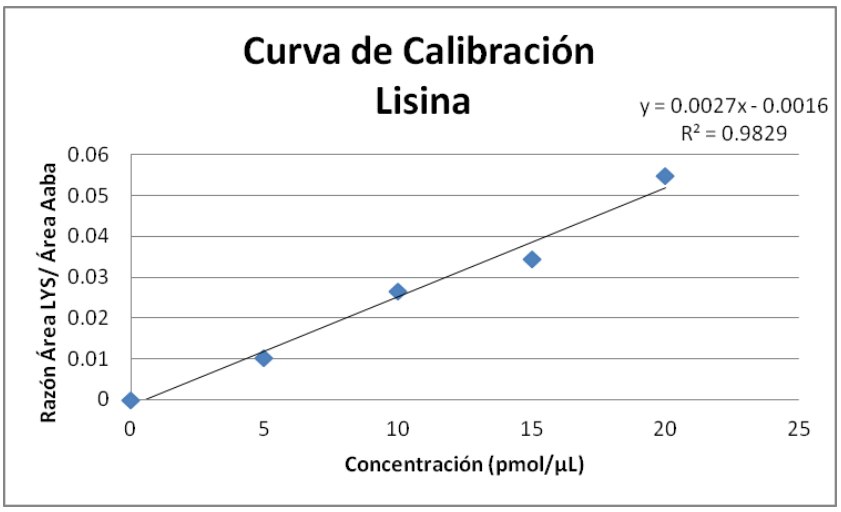

Curva de Calibración
Alanina
y = 0.0036x + 0.0036
R² = 0.9658
Razón Área ALA/ Área Aaba
0.08
0.06
0.04
0.02
0
0
5
10
15
20
25
Concentración (pmol/µL)

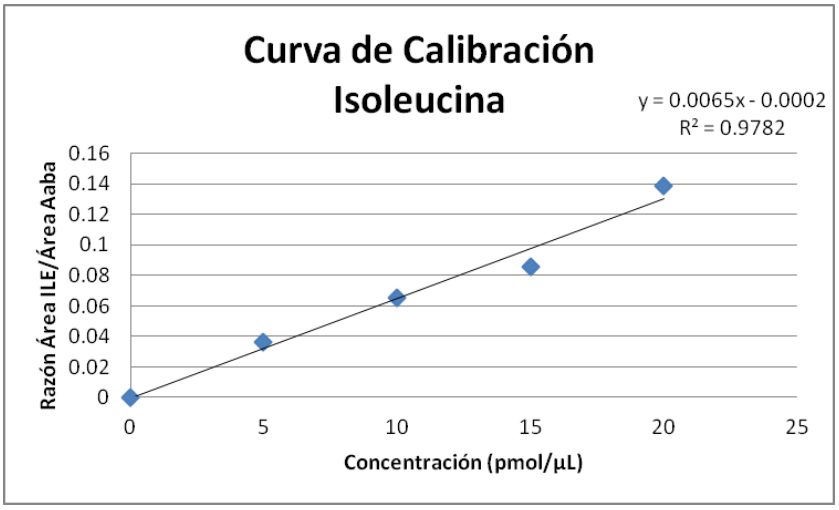

Curva de Calibración
Prolina
y = 0.0014x + 0.0001
R² = 0.9815
Razón Área PRO/ Área Aaba
0.035
0.03
0.025
0.02
0.015
0.01
0.005
0
0
5
10
15
20
25
Concentración (pmol/µL)

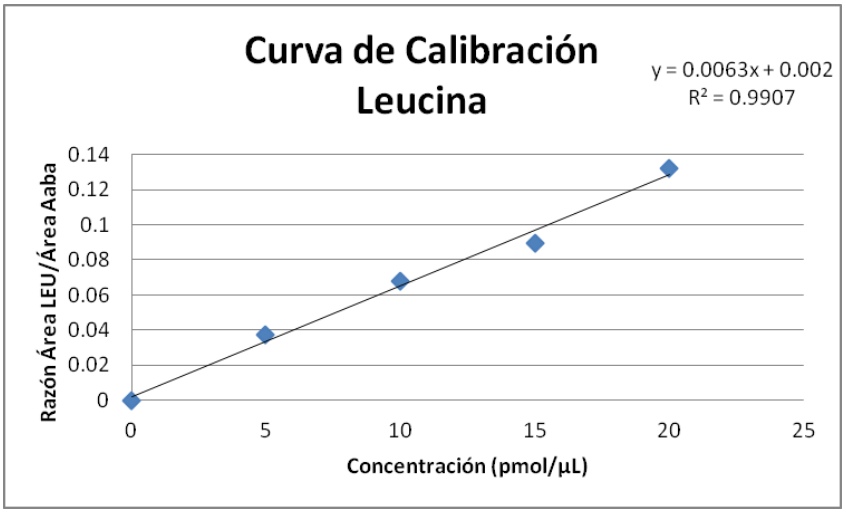

Curva de Calibración
Tirosina
y = 0.0031x + 0.0044
R² = 0.9703
Razón Área TYR/ Área Aaba
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
0
5
10
15
20
25
Concentración (pmol/µL)

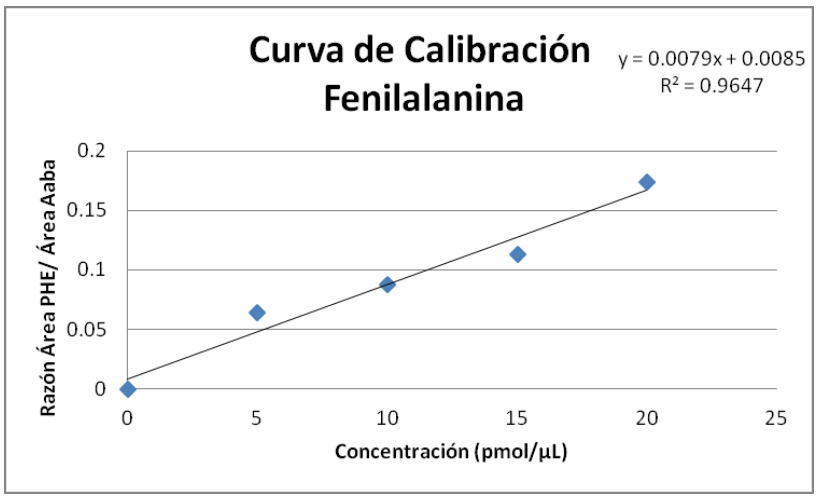

Curva de Calibración
Valina
y = 0.0049x + 0.0005
R² = 0.9913
Razón Área VAL/ Área Aaba
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
0
5
10
15
20
25
Concentración (pmol/µL)

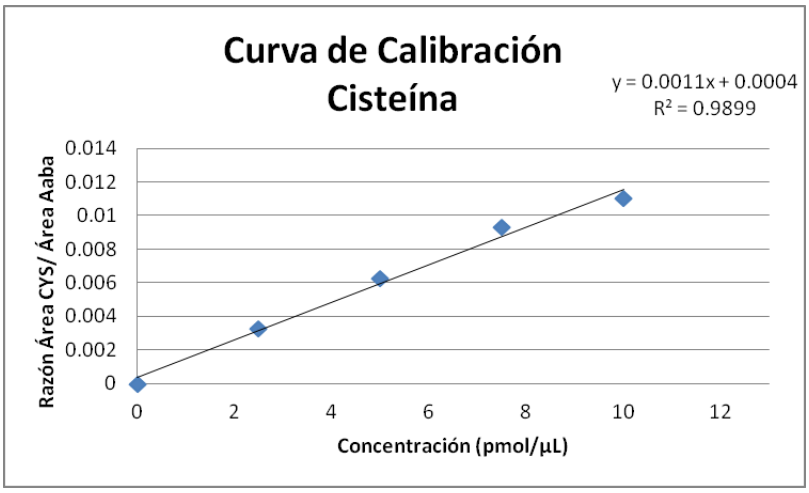

Curva de Calibración
Metionina
y = 0.0043x + 0.0027
R² = 0.9899
Razón Área MET/ Área Aaba
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
0
5
10
15
20
25
Concentración (pmol/µL)


Curva de Calibración
Lisina
y = 0.0027x - 0.0016
R² = 0.9829
Razón Área LYS/ Área Aaba
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
0
5
10
15
20
25
Concentración (pmol/µL)

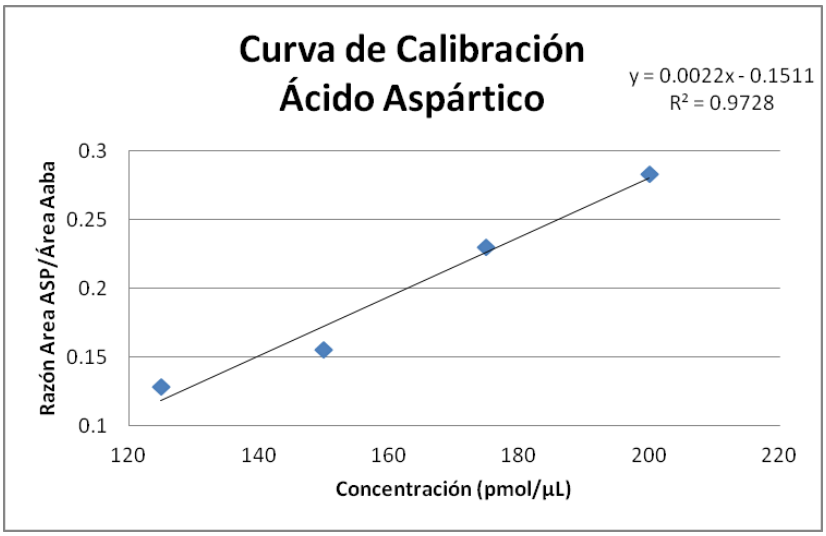

Curva de Calibración
Isoleucina
y = 0.0065x - 0.0002
R² = 0.9782
Razón Área ILE/Área Aaba
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
0
5
10
15
20
25
Concentración (pmol/µL)

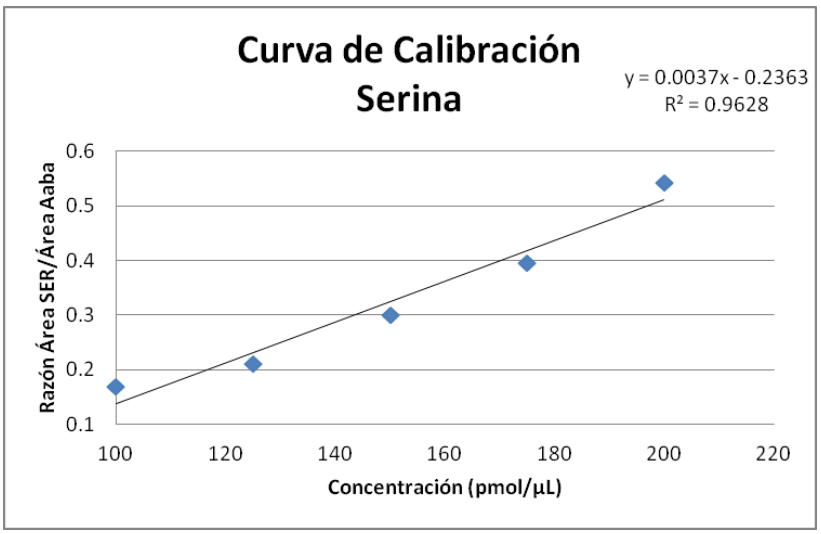

Curva de Calibración
Leucina
y = 0.0063x + 0.002
R² = 0.9907
Razón Área LEU/Área Aaba
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
0
5
10
15
20
25
Concentración (pmol/µL)

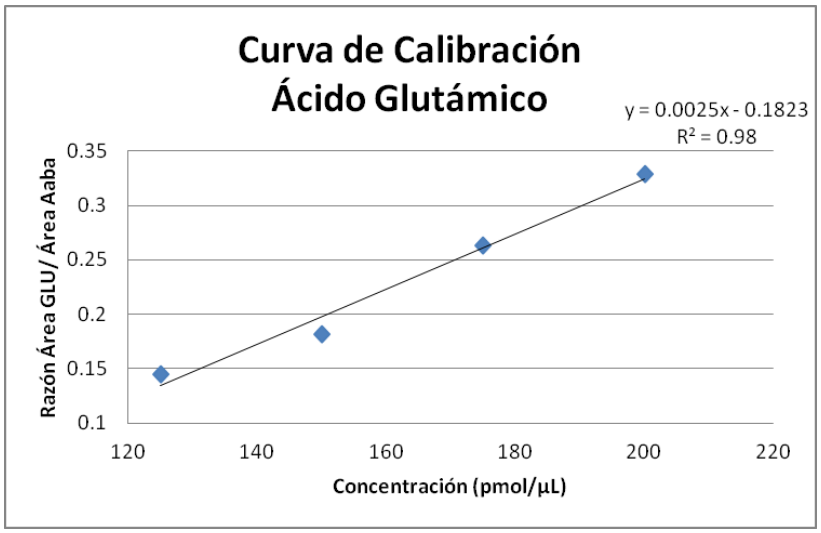


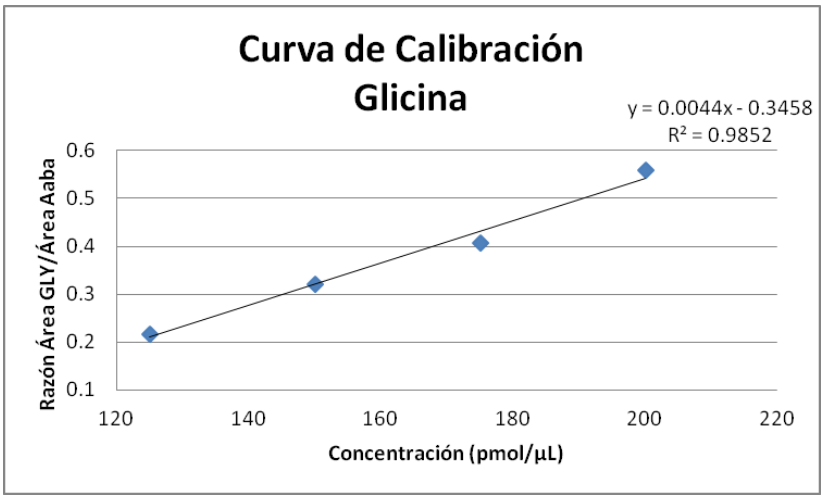



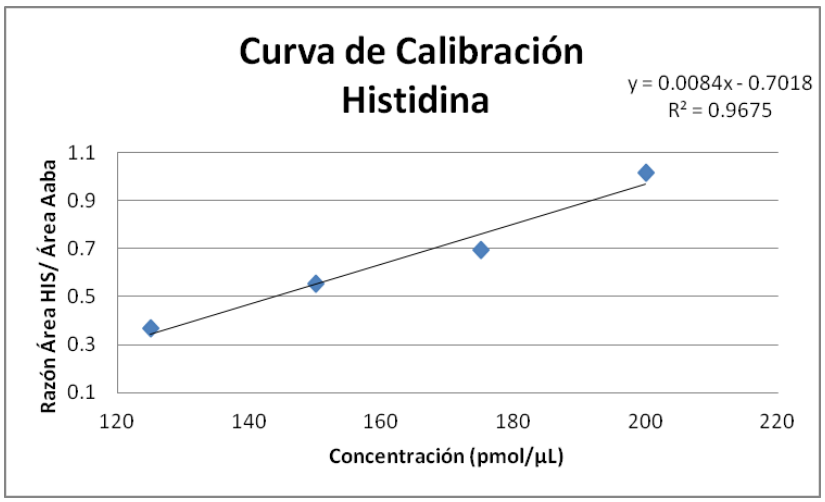

## 8.7 Curvas de calibración de aminoácidos- curva con valores grandes (método de HPLC)

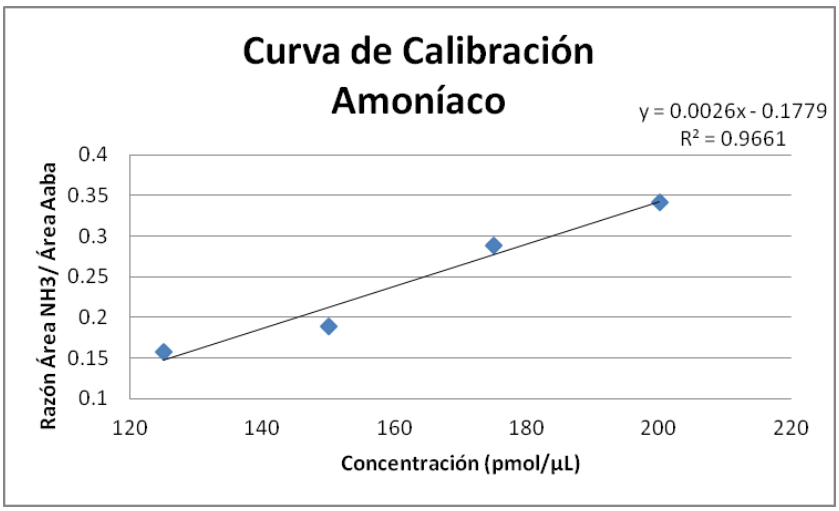


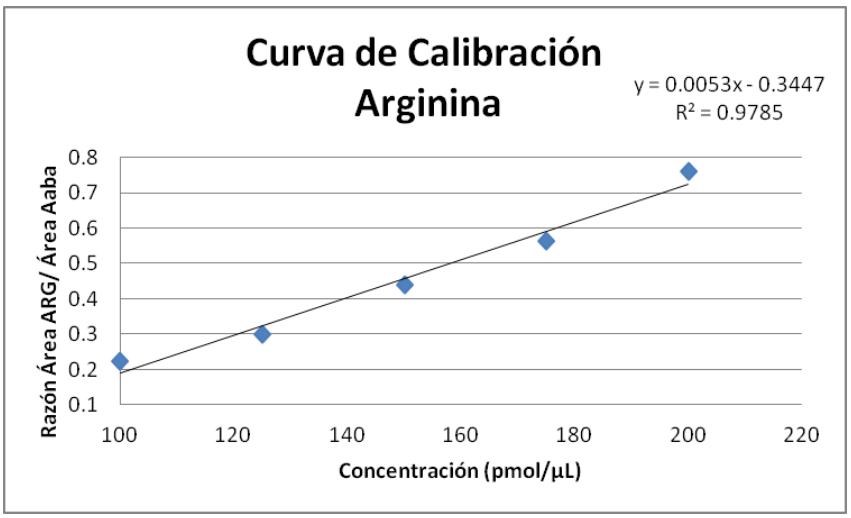

Curva de Calibración
Serina
y = 0.0037x - 0.2363
R² = 0.9628
Razón Área SER/Área Aaba
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
100
120
140
160
180
200
220
Concentración (pmol/µL)

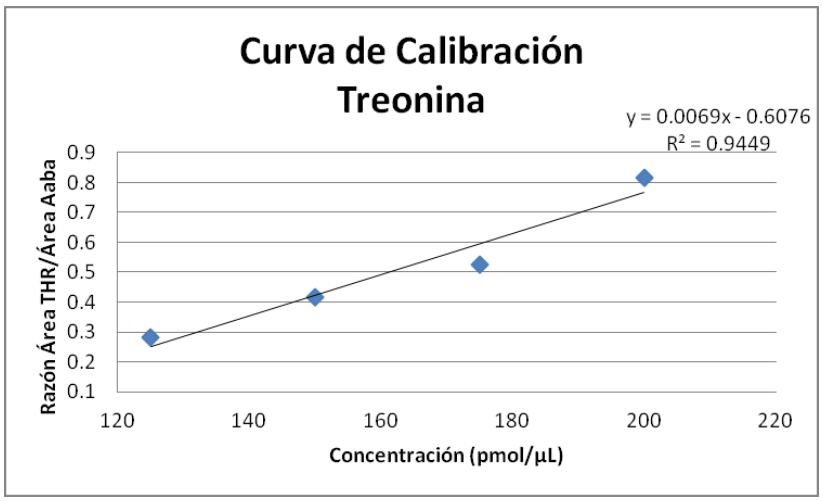

Curva de Calibración
Ácido Glutámico
y = 0.0025x - 0.1823
R² = 0.98
Razón Área GLU/ Área Aaba
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
120
140
160
180
200
220
Concentración (pmol/µL)

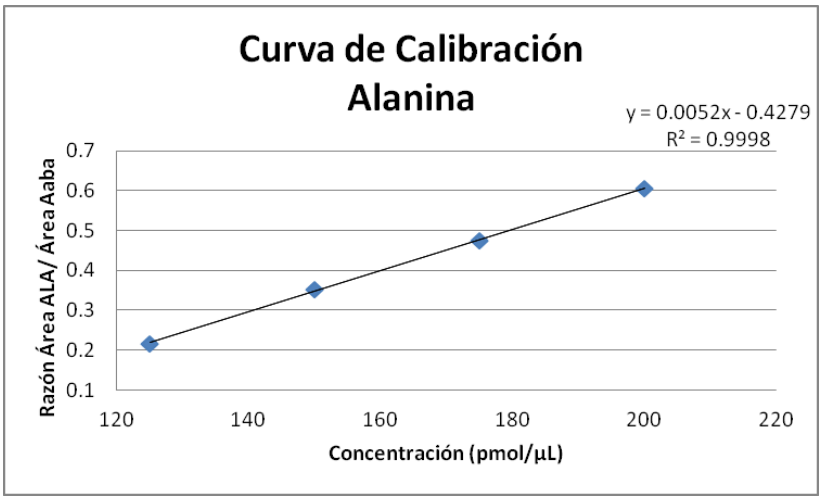

Curva de Calibración
Glicina
y = 0.0044x - 0.3458
R² = 0.9852
Razón Área GLY/Área Aaba
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
120
140
160
180
200
220
Concentración (pmol/µL)

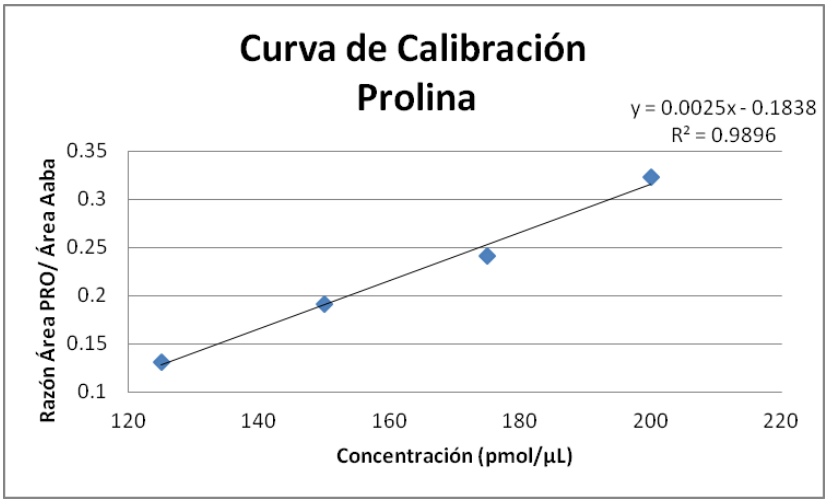

Curva de Calibración
Histidina
y = 0.0084x - 0.7018
R² = 0.9675
Razón Área HIS/ Área Aaba
1.1
0.9
0.7
0.5
0.3
0.1
120
140
160
180
200
220
Concentración (pmol/µL)

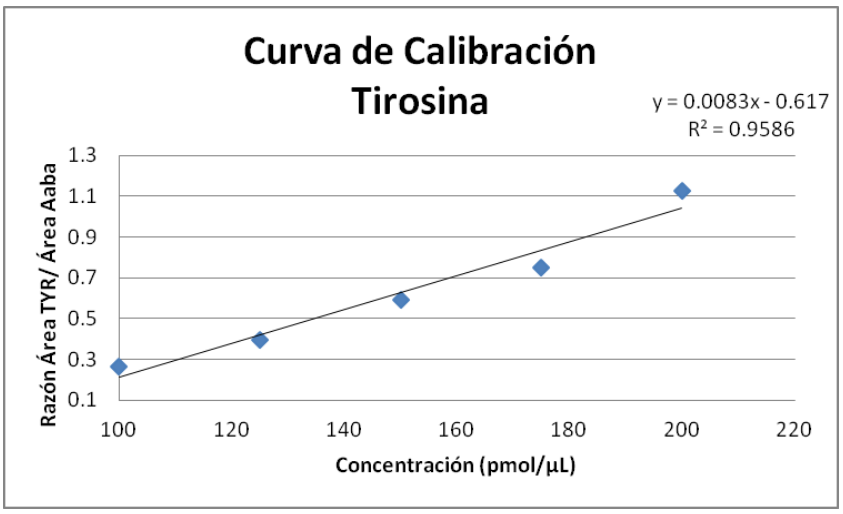

Curva de Calibración
Amoníaco
y = 0.0026x - 0.1779
R² = 0.9661
Razón Área NH3/ Área Aaba
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
120
140
160
180
200
220
Concentración (pmol/µL)

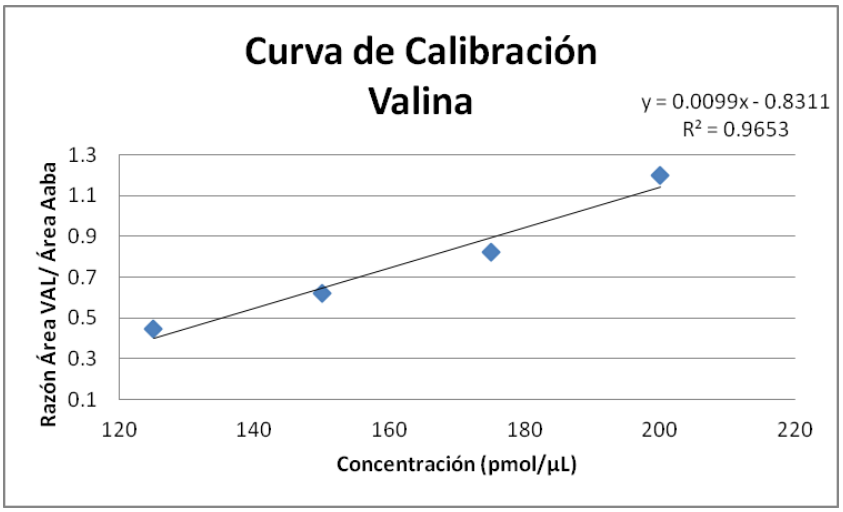

Curva de Calibración
Arginina
y = 0.0053x - 0.3447
R² = 0.9785
Razón Área ARG/ Área Aaba
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
100
120
140
160
180
200
220
Concentración (pmol/µL)

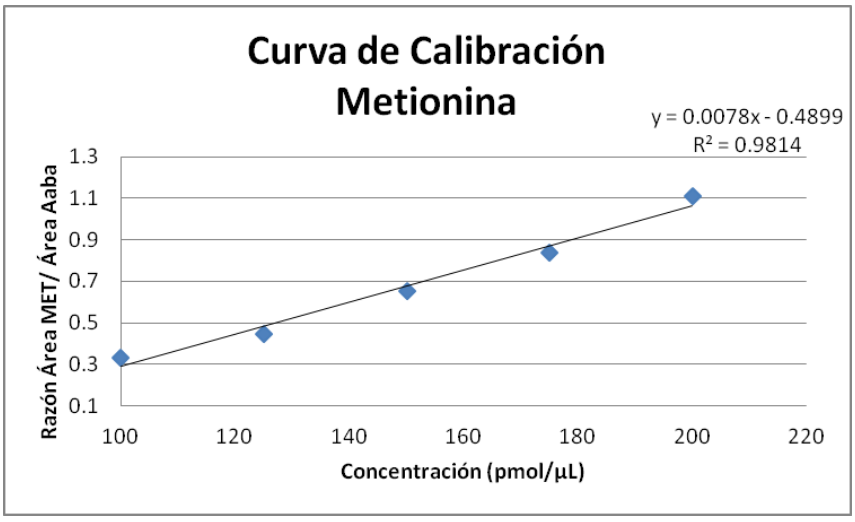

Curva de Calibración
Treonina
y = 0.0069x - 0.6076
R² = 0.9449
Razón Área THR/Área Aaba
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
120
140
160
180
200
220
Concentración (pmol/µL)

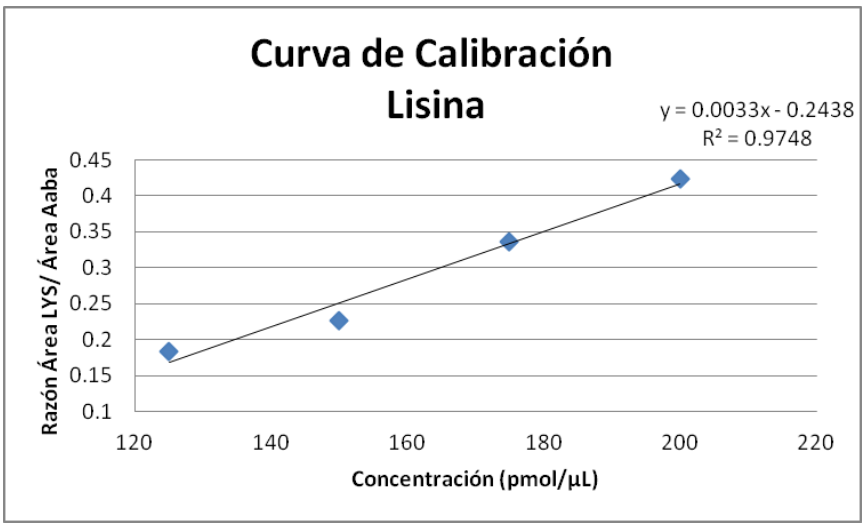

Curva de Calibración
Alanina
y = 0.0052x - 0.4279
R² = 0.9998
Razón Área ALA/ Área Aaba
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
120
140
160
180
200
220
Concentración (pmol/µL)

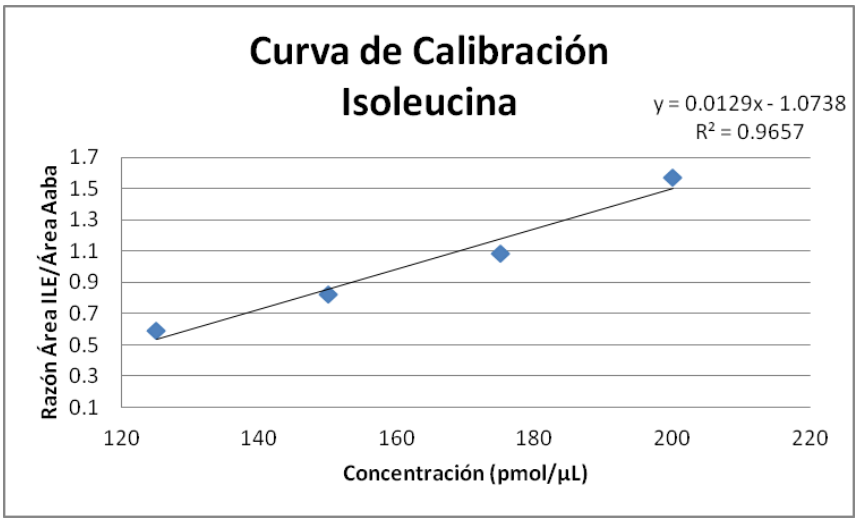

Curva de Calibración
Prolina
y = 0.0025x - 0.1838
R² = 0.9896
Razón Área PRO/ Área Aaba
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
120
140
160
180
200
220
Concentración (pmol/µL)

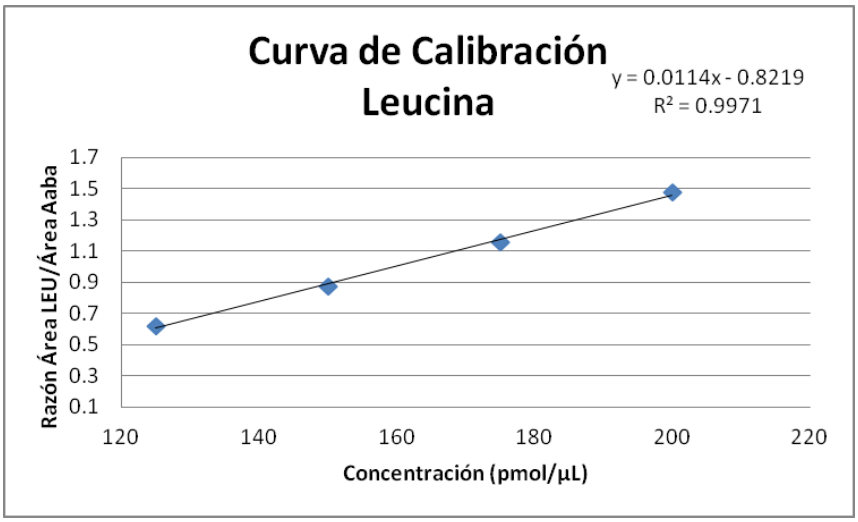

Curva de Calibración
Tirosina
y = 0.0083x - 0.617
R² = 0.9586
Razón Área TYR/ Área Aaba
1.3
1.1
0.9
0.7
0.5
0.3
0.1
100
120
140
160
180
200
220
Concentración (pmol/µL)

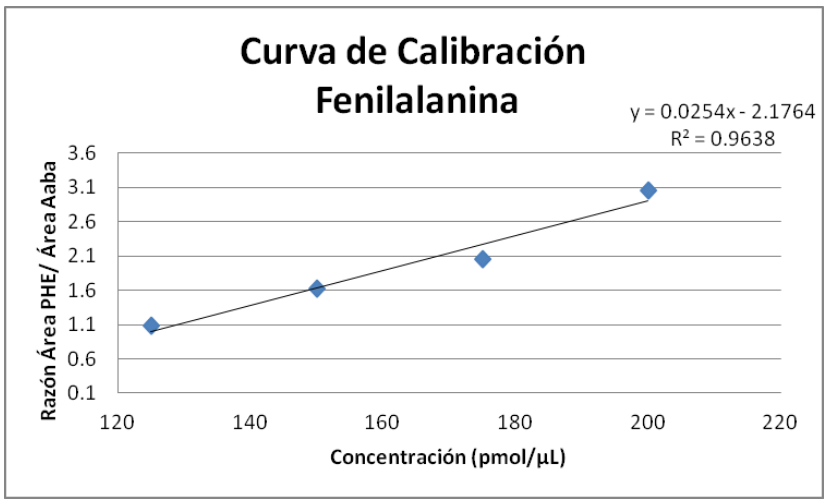

Curva de Calibración
Valina
y = 0.0099x - 0.8311
R² = 0.9653
Razón Área VAL/ Área Aaba
1.3
1.1
0.9
0.7
0.5
0.3
0.1
120
140
160
180
200
220
Concentración (pmol/µL)

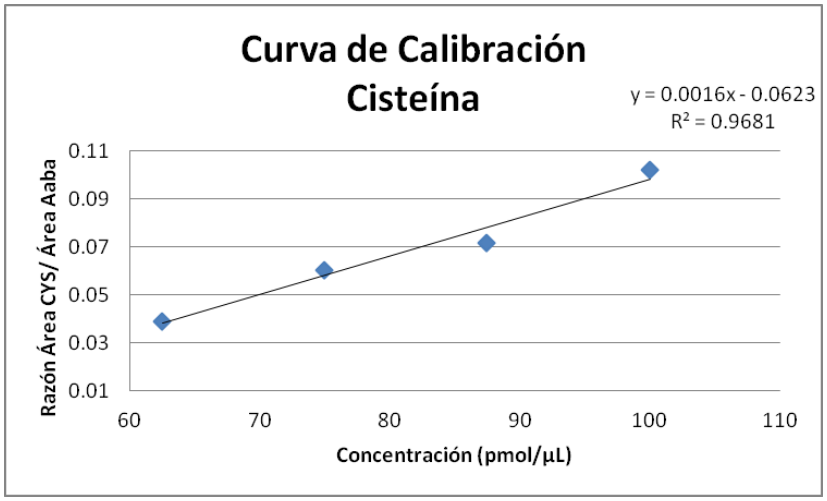

Curva de Calibración
Metionina
y = 0.0078x - 0.4899
R² = 0.9814
Razón Área MET/ Área Aaba
1.3
1.1
0.9
0.7
0.5
0.3
0.1
100
120
140
160
180
200
220
Concentración (pmol/µL)


Curva de Calibración
Lisina
y = 0.0033x - 0.2438
R² = 0.9748
Razón Área LYS/ Área Aaba
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
120
140
160
180
200
220
Concentración (pmol/µL)


Curva de Calibración
Isoleucina
y = 0.0129x - 1.0738
R² = 0.9657
Razón Área ILE/Área Aaba
1.7
1.5
1.3
1.1
0.9
0.7
0.5
0.3
0.1
120
140
160
180
200
220
Concentración (pmol/µL)


Curva de Calibración
Leucina
y = 0.0114x - 0.8219
R² = 0.9971
Razón Área LEU/Área Aaba
1.7
1.5
1.3
1.1
0.9
0.7
0.5
0.3
0.1
120
140
160
180
200
220
Concentración (pmol/µL)


Curva de Calibración
Fenilalanina
y = 0.0254x - 2.1764
R² = 0.9638
Razón Área PHE/ Área Aaba
3.6
3.1
2.6
2.1
1.6
1.1
0.6
0.1
120
140
160
180
200
220
Concentración (pmol/µL)


Curva de Calibración
Cisteína
y = 0.0016x - 0.0623
R² = 0.9681
Razón Área CYS/ Área Aaba
0.11
0.09
0.07
0.05
0.03
0.01
60
70
80
90
100
110
Concentración (pmol/µL)