

## Vida útil de granos *Phaseolus vulgaris* L. fermentados y listos para el consumo

### Stability of bioprocessed and ready-to-eat *Phaseolus vulgaris* L.

M. Granito, Y. Valero y S. Pérez

Universidad Simón Bolívar, Valle de Sartenejas, Baruta - Apartado  
Postal N° 89.000 Caracas 108-A Venezuela

### Resumen

*Phaseolus vulgaris*, fuente de nutrientes y compuestos bioactivos forma parte de los hábitos alimenticios de muchas poblaciones latinoamericanas, a pesar que su consumo por veces se ve limitado, debido a los largos períodos de cocción requeridos y a la flatulencia que se produce después de su ingesta. La flatulencia, producto de la fermentación colónica de los  $\alpha$ -galactósidos y de la fibra soluble, disminuye mediante la fermentación natural del grano, obteniéndose un alimento nutritivo, sensorialmente aceptado que no produce flatulencia. El objetivo de este trabajo fue medir la vida útil de granos de *P. vulgaris*, fermentados y listos para el consumo. Se usó una variedad blanca de *P. vulgaris* fermentada, cocida y envasada en salmuera al 2%. Cada 15 días se evaluó el pH, la acidez titulable, agentes de deterioro microbiológico y el color instrumental (L, a, b) a 30°C, 35°C y 40°C durante 2 meses. A los 60 días de almacenamiento, el pH se incrementó en 2% a 30°C y 40°C mientras que para las muestras almacenadas a 35°C se observó un aumento del 6%. La acidez titulable se incrementó con las 3 temperaturas evaluadas. A los 45 días de almacenamiento los principales agentes causales de deterioro fueron los mesófilos (105 UFC.mL<sup>-1</sup>) y los mohos (102 UFC.mL<sup>-1</sup>). Asimismo, se incrementó el valor de L (luminosidad) a los 60 días. Se estimó una vida media de 45 días para granos de *P. vulgaris* fermentados, cocidos, y envasados en salmuera, almacenados a 30°C.

**Palabras clave:** *Phaseolus vulgaris*, vida útil, fermentación, estabilidad.

## Abstract

*Phaseolus vulgaris*, source of nutrients and bioactive compounds, is part of the staple diet of many populations despite its consumption being sometimes limited due to the long cooking periods required and to the flatulence produced after its ingestion. The flatulence, product of the colonic fermentation of the agalactosides and soluble fiber, can be significantly decreased by natural fermentation of the grain, prior to its consumption, with a more nutritious, sensorially accepted and non-flatulence producing foodstuff being obtained. The objective of this work was to measure the stability of fermented and ready-to-eat *P. vulgaris*. A white variety of fermented, cooked, and bottled in brine at 2% *P. vulgaris* was used. pH, titrable acidity, microbiological deterioration agents and instrumental color (L, a, b) was evaluated every 15 days at 30°C, 35°C and 40°C for 2 months. At 60 days of storage, the pH increased in 2% for the samples stored at 30°C and 40°C; at 35°C it increased in 6%. Titrable acidity increased for samples stored at every treatment. Mesophilous and the moulds were the main causal agents of deterioration at 45 days, with 105 CFU.mL<sup>-1</sup> and 102 CFU.mL<sup>-1</sup> being quantified, respectively. Values of L and b increased at 60 days of storage. A shelf-life of 45 days was estimated for fermented, cooked and bottled in brine *P. vulgaris* beans stored at 30°C.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*, fermentation, stability, shelf-life.

## Introducción

*Phaseolus vulgaris*, también conocida por los nombres comunes de caraotas, judías, alubias, frijoles, entre otros, es una leguminosa que representa una importante fuente de carbohidratos complejos y de proteína, cuya calidad, si se combina con la proteína de los cereales es equivalente a la de la carne (Bressani, 2002). Aporta además compuestos bioactivos como la fibra dietética, insoluble y soluble (Pereira *et al.*, 2002), que junto al almidón resistente, previenen la incidencia de enfermedades relacionadas con el tránsito intestinal y tienen efecto hipocolesterolémico (Champ, 2002); adicionalmente, contienen polifenoles y taninos, los cuales poseen capacidad antioxidante (Granito *et al.*,

## Introduction

*Phaseolus vulgaris*, also known by its common names "caraotas", "judias", "alubias", "frijoles", among others, is one legumes that represents an important source of complex carbohydrates and protein the quality of which if combined with cereal proteins is equivalent to meat (Bressani, 2002). It also contributes with bioactive compounds like dietetic fiber, insoluble and soluble (Pereira *et al.*, 2002), that together with resistant starch, prevent the incidence of diseases related to intestinal transit and have hypocholesterolemic effect (Champ, 2002); additionally, they have polyphenols and tannins which have antioxidant capacity (Granito *et al.*, 2007). In Latin America, *P. vulgaris*

2007). En Latinoamérica, *P. vulgaris* forma parte de los hábitos alimenticios de muchas poblaciones, para las que representa una de las principales fuentes de proteína y minerales (Messina, 1999).

Sin embargo, *P. vulgaris* presenta una serie de factores que limitan su consumo. Además de los compuestos antinutricionales naturalmente presentes en los granos (Lajolo *et al.*, 1991; Granito *et al.*, 2001), requiere largos tiempos de cocción y contiene compuestos productores de flatulencia, como los  $\alpha$ -galactosidos, rafinosa, estaquirosa, verbascosa y la fibra soluble (Desphande, 1992; Granito *et al.*, 2003) los cuales una vez fermentados por las bacterias colónicas residentes en el intestino grueso, producen una serie de síntomas intestinales molestos (Granito *et al.*, 2005).

*P. vulgaris* al igual que todas las leguminosas debe ser procesada previo a su consumo, lo cual altera su composición química. Bioprocesos como la fermentación natural de *P. vulgaris* y su posterior cocción, disminuyen significativamente los factores antinutricionales y productores de flatulencia, mejorando además la calidad nutritiva de los granos, sin detrimento de su aceptabilidad sensorial (Granito *et al.*, 2001; Granito *et al.*, 2003). Adicionalmente, la fermentación natural incrementa el potencial de *P. vulgaris* como ingrediente funcional, susceptible de ser utilizado en el desarrollo de productos extendidos con leguminosas (Ghavidel y Prakash, 2007) o de nuevos productos a base de 100% de leguminosas (Granito y Guinand, 2005).

En Venezuela, *P. vulgaris* forma

is part of the dietary habits of many populations, where it represents one of the main sources of protein and minerals (Messina, 1999).

Nevertheless, *P. vulgaris* shows one part of a serial work of factors that limit its consumption. Besides of anti nutritional compounds naturally present in grains (Lajolo *et al.*, 1991, Granito *et al.*, 2001), require long cooking times and possess compounds producers of flatulence, like  $\alpha$ -galactosides, raffinose, stachyose, verbascose and soluble fiber (Desphande, 1992, Granito *et al.*, 2003) which once fermented by colonic bacteria resident in the large intestine, produces a serie of uncomfortable intestinal symptoms (Granito *et al.*, 2005).

*P. vulgaris* as all the leguminous, has to be processed prior to its consumption which modifies its chemical composition. Bioprocesses like natural fermentation of *P. vulgaris* and its posterior cooking, significantly diminish anti nutritional factors and flatulence producers, also improving nutritive quality of grains, without detriment of its sensorial acceptance (Granito *et al.*, 2001; Granito *et al.*, 2003). Additionally, natural fermentation increases *P. vulgaris* potential as functional ingredient susceptible to being used in the development of products extended with leguminous (Ghavidel and Prakash, 2007) or new products based on 100% leguminous (Granito and Guinand 2005).

In Venezuela, *P. vulgaris* takes part of feeding habits of population and it is consumed at an average of 12 kg.person.year<sup>-1</sup> (INN, 2000b). If processes of natural fermentation and

parte de los hábitos alimenticios de la población y se consume en promedio 12 kg.persona.año<sup>-1</sup> (INN, 2000b). Si se aplican procesos de fermentación natural y posterior cocción a granos de caraota se potencia y facilita la ingesta del producto al proveer al consumidor dos grandes ventajas: i) se evita el tiempo que necesariamente se emplea en la cocción de los granos y ii) la fermentación previa a la cocción, disminuye los niveles de los factores antinutricionales y responsables de la flatulencia (Granito *et al.*, 2002). De lo anterior se desprende, el alto impacto que puede tener este producto en el consumidor, con el valor agregado que representa el incremento de la ingesta de leguminosas por parte de la población.

Además de conocer el efecto del procesamiento sobre las características químicas y físicas de los granos, es necesario conocer su estabilidad o vida útil. La predicción de este tiempo se realiza mediante un estudio de estabilidad que tiene como objetivo evaluar el comportamiento de los productos en desarrollo y tradicionales a los que se les ha hecho algún cambio en la receta o en el proceso, durante un tiempo determinado y a diferentes temperaturas (Rondón *et al.*, 2004). La vida útil de un alimento se puede definir como el periodo de tiempo durante el cual el producto almacenado no se percibe significativamente distinto al producto inicial o recién elaborado, o que no significa un riesgo para la salud de la persona que lo consume. Para la evaluación de los productos se utilizan técnicas de análisis sensorial, físicos, químicos y microbiológicos (Kilcast y

posterior cooking are applied to bean grains the makes easier ingestion of product when supplies to consumer two high advantages: 1) time used for grains cooking is avoided and 2) fermentation prior cooking reduces levels of anti nutritional factors responsible of flatulence (Granito *et al.*, 2002). From this, it is possible to induce that the high impact that this product could have on consumers, with the aggregate value that the increase on leguminous intake by population represents.

Besides of knowing the effect of processing on chemical and physical characteristics of grains it is necessary to know its stability or useful life. Prediction of this time is made through an stability study having as an objective to evaluate behavior of in development and traditional products which have been changed in process, during determined time and to different temperatures (Rondón *et al.*, 2004). The useful life of an aliment can be defined like time during the stored product is not perceived in a different way in relation to those initial one, or it does not implies a risk for the health of people who consume it.

For the evaluation of products, techniques of sensorial analysis are used, like physical, chemical and microbiological ones (Kilcast and Subramaniam, 2000; Rondón *et al.*, 2004).

Considering the importance of this food in daily diet of population, the possibility of packing white beans fermented and cooked, ready to be immediately consumed from package and to measure its stability on time it is proposed in here.

Subramaniam, 2000; Rondón *et al.*, 2004).

Considerando la importancia de este alimento en la dieta diaria de la población se planteó la posibilidad de envasar caraotas blancas fermentadas y cocidas, listas para su consumo inmediato directamente del envase y medir su estabilidad en el tiempo.

## Materiales y métodos

**Muestra:** Se usó una variedad de semilla blanca de *Phaseolus vulgaris* L., denominada Victoria, la cual fue suministrada por el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas (INIA) Maracay.

**Higienización de los granos:** Los granos fueron lavados e higienizados para reducir la carga microbiana acompañante inicial. Para el lavado se usó agua destilada estéril en una relación grano:agua de 1:1 (p/v), la cual luego fue descartada. Posteriormente, se colocaron los granos en una solución de ácido láctico al 1%, se agitaron durante 10 min, se descartó la solución de ácido láctico y se volvió a enjuagar con agua destilada estéril.

**Fermentación natural:** Los granos de caraota blanca higienizados se colocaron en un micro fermentador marca New Brunswick Scientific Co. Inc, Edison New Cork, U.S.A. modelo BIOFLO 2000, que contenía agua destilada estéril en una proporción grano:agua de 1:4 (p/v). La fermentación se realizó de acuerdo a Granito *et al.* (2001) durante 48 horas. Finalizada la fermentación, los granos fermentados fueron escurridos, reservándose parte del agua de fermentación para análisis posteriores.

## Materials and methods

**Sample:** A variety of white seed from *Phaseolus vulgaris* L., called "Victoria" was used, which was supplied by the Instituto Nacional de Investigaciones Agronomicas (INIA) Maracay.

**Grains hygienization:** Grains were washed and hygienized for reducing the initial microbial charge. For washing, sterile distilled water was used in a relationship grain:water of 1:1 (p/v), which was after taken off. Later, grains were placed on a solution of lactic acid to 1%, agitated during 10 min; the lactic acid solution was ruled out and sterile distilled water was used for washing again.

**Natural fermentation:** Hygienic white common bean grains were placed on a micro fermenter New Brunswick Scientific Co. Inc, Edison New Cork, U.S.A. model BIOFLO 2000, having sterile distilled water in a proportion grain:water of 1:4 (p/v). Fermentation was made according to Granito *et al.* (2001) during 48 hours. When fermentation was finished, fermented grains were strained, by keeping back part of fermentation water for later analysis.

**Cooking:** Fermented grains were subjected to a cooking in water in a proportion of 1:4 (p/v) at atmospherically pressure during three hours. Finalized grains cooking they were strained.

**Packing:** Cooked grains were packed in glasses bottles of 300 mL in a proportion of 70 g of white beans by bottle. For package a saline solution (2% NaCl, pH 5) to 100°C in

**Cocción:** Los granos fermentados fueron sometidos a una cocción en agua en una proporción de 1:4 (p/v) a presión atmosférica durante tres horas. Finalizada la cocción los granos fueron escurridos.

**Envasado:** Los granos cocidos fueron envasados en frascos de vidrio de 300 mL de capacidad, en una proporción de 70 g de caraoas blancas por frasco. Para el envasado se empleó una solución de salmuera (2% NaCl, pH 5) a 100°C en una proporción 1:3 (p/v) salmuera:grano. Una vez llenados los frascos con la solución de salmuera, se procedió al cierre inmediato de los frascos y posteriormente se colocaron en un baño de agua a 100°C durante 5 min.

**Almacenamiento:** Los frascos enfriados se almacenaron en estufas de convección a tres temperaturas distintas: 30°C, 35°C y 40°C. El estudio se realizó durante 2 meses, con determinaciones de los parámetros de calidad cada 15 días.

**Composición química de los granos envasados:** Se analizaron los granos fermentados y cocidos según la AOAC, (1990), determinándose los siguientes parámetros: contenido de humedad (método 925.10), cenizas (método 923.03), grasas (método 920.39) y proteínas (método 960.52). Los minerales se cuantificaron por Espectrofotometría de Absorción Atómica (AOAC, 1990). La digestibilidad *in vitro* se determinó usando un sistema multienzimático de tripsina, quimiotripsina, y peptidasa y el grado de hidrólisis enzimática se determinó por el método de la caída del pH después de 10 min, según Hsu *et al.* (1977). La fibra dietética se cuantifi-

a a proporción de 1:3 (p/v) saline:grain was used. Once bottles filled with the saline solution, bottles were immediately closed and later they were placed on a water bath to 100°C during 5 min.

**Storage:** The cooled bottles were stored in convection heaters to three different temperatures: 30°C, 35°C and 40°C. Study was carried out during 2 months, with determinations of quality parameters each 15 days.

**Chemical composition of packed grains:** Fermented and cooked grains were analyzed according to the AOAC, (1990), being determined the following parameters: moisture (method 925.10), ashes (method 923.03), fats (method 920.39) and proteins (method 960.52). Minerals were quantified through Spectrophotometry of Atomic Absorption (AOAC, 1990). The *in vitro* digestibility was determined by using a multi enzymatic system of tripsine, chimiotripsine, and peptidase and the degree of enzymatic hydrolysis was determined by the method of pH fall after 10 min, according to Hsu *et al.* (1977). Dietetic fiber was quantified by using the enzymatic-gravimetric method described by Prosky *et al.*, (1992).

**Stability measurement of white bean grains fermented and cooked:** Physical, chemical and microbiological determinations were made each 15 days, from time 0 and times 15, 30, 45 and 60 days.

**Microbiological analysis:** Microbiological determinations were accomplished for monitoring possible changeable micro organisms or pathogens that could modify the final

có usando el método enzimático-gravimétrico descrito por Prosky *et al.* (1992).

**Medida de la estabilidad de los granos de caraotas blancas fermentadas y cocidas:** Las determinaciones físicas, químicas y microbiológicas se realizaron cada 15 días, partiendo del tiempo 0 y a los tiempos 15, 30, 45 y 60 días.

**Análisis microbiológicos:** Las determinaciones microbiológicas se realizaron para monitorear los posibles microorganismos adulterantes o patógenos que pudiesen alterar el producto final. Se realizaron usando la metodología del compendio APHA (1992) para el análisis de: aerobios mesófilos (Plate Count Agar, Himedia M091), coliformes totales (Violet Red Bile Agar, Himedia M049), Lactobacillus (Lactobacilli MRS Agar, Himedia M641) y mohos y levaduras (Potato Dextrose Agar, Himedia M096). Se realizaron diluciones en el orden de  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  por duplicado, analizándose adicionalmente el del agua de fermentación.

Análisis químicos y físicos:

**pH:** La determinación del potencial de Hidrógeno se realizó utilizando el método potenciométrico (AOAC, 1990) usando un pH meter COLEMAN, Modelo 39.

**Acidez titulable:** La acidez titulable fue cuantificada según la norma COVENIN 1787:1981 (1981). Los resultados se reportaron como porcentaje de ácido láctico.

**Color:** La determinación de color se realizó por el método Triestímulus, utilizando el colorímetro Hunter Lab MINISCAN iluminante

product. They were analyzed by using methodology of APHA compendium (1992) for the analysis of: mesophilous aerobia (Plate Count Agar, Himedia M091), total coliforms (Violet Red Bile Agar, Himedia M049), Lactobacillus (Lactobacilli MRS Agar, Himedia M641) and mildews and yeasts (Potato Dextrose Agar, Himedia M096). Dilutions in the order of  $10^{-1}$  and  $10^{-2}$  were made by duplicate, and fermentation water was additionally analyzed.

Physical and chemical analysis:

**pH:** Determination of Hydrogen potential was made through the potentiometric method (AOAC, 1990) by using a pH meter COLEMAN, Model 39.

**Titration acidity:** It was quantified according to the COVENIN rule 1787:1981 (1981). Results were reported as % of lactic acid.

**Color:** Color determination was made according to the Triestímulus method, by using the colorimeter Hunter Lab MINISCAN lighter D-65 for determining coordinates that describes object, considering the following parameters: luminosity or darkness degree (L), red quantity versus green quantity (a) and yellow quantity versus blue quantity (b).

**Statistical analysis:** Results were expressed like the average of 3 determinations  $\pm$  standard deviation. Means comparison was made through an analysis of variance of one way (ANOVA), with a later means comparison (Duncan test) or Student t, by using the Statgraphics Plus 5.1 program. Probability level used for all the statistical analysis was of  $P \leq 0.05$ .

D-65 para determinar las coordenadas que describen el objeto, considerando los parámetros: luminosidad o grado de oscurecimiento del producto (L), cantidad de rojo versus cantidad de verde (a) y la cantidad de amarillo versus la cantidad de azul (b).

**Análisis estadísticos:** Los resultados fueron expresados como el promedio de 3 determinaciones. La comparación de medias se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), con posterior comparación de medias (test de Duncan) o t de Student, usando el programa Statgraphics Plus 5.1. El nivel de probabilidad empleado para todos los análisis estadísticos fue de  $P \leq 0.05$ .

## Resultados y discusión

Una vez finalizado el proceso de fermentación y cocción se calculó el rendimiento de los granos, obteniéndose un incremento de peso del 67,1%.

En el cuadro 1 se presentan los resultados correspondientes a la composición proximal de los granos de *P. vulgaris* fermentados y cocidos al inicio del estudio de vida útil. Se encontraron valores de proteínas de 22,43% y de grasa y cenizas de 1,6 y 3,8%, respectivamente. Estos resultados son similares a los reportados en la Tabla de Composición de Alimentos Venezolana (INN, 1999) para granos crudos de variedades blancas de *P. vulgaris*: proteínas 23,9 g.100g<sup>-1</sup>, grasas 1,6 g.100g<sup>-1</sup> y cenizas 3,8 g.100g<sup>-1</sup> base seca.

En un estudio realizado por Granito *et al.* (2001b) a 10 variedades latinoamericanas de *P. vulgaris*, inclu-

## Results and discussion

Once fermentation and cooking process ended, grain yield was calculated, by being getting an increase on weight of 67.1%.

Table 1 shows the results of proximal composition of *P. vulgaris* grains fermented and cooked at the beginning of useful life study. Protein values were found of 22.43% and fat and ashes of 1.6 and 3.8%, respectively. These results are similar to those reported in Venezuelan Food Composition Table (INN, 1999) for not cooked grains of white varieties of *P. vulgaris*: proteins 23.9 g.100g<sup>-1</sup>, fats 1.6 g.100g<sup>-1</sup> and ashes 3.8 g.100g<sup>-1</sup> dry bass.

In one study carried out by Granito *et al.*, (2001b) in 10 Latin American varieties of *P. vulgaris*, including varieties of dark and clear seeds, protein values were reported from 22.5% to 30.8% in cooked samples and without fermenting. Independently of little differences originated by the applied processes (fermentation, cooking, etc.), the chemical composition of grains also is a product of genetic characteristics of varieties, of soil conditions, climate effect and other environmental factors such as geographical localization, growth and crop conditions season, however, it could be suggested for *P. vulgaris* a proteins content that oscillates between 20% and 30%.

Respect to the soluble and insoluble fiber of fermented and cooked grains, values of 1.26 and 23.06 g.100g<sup>-1</sup>, respectively, were found. Granito *et al.*, (2001a) reported values



**Cuadro 1. Composición química de los granos de *P. vulgaris* L. fermentados y cocidos, previo al envasado.**

**Table 1. Chemical composition of *P. vulgaris* L. grains bioprocessed and cooked, previous to bottled.**

Análisis	<i>P. vulgaris</i> fermentada y cocida
Proteínas*	22,43 ± 0,11
Digestibilidad Proteica <i>in vitro</i> *	79,23 ± 0,43
Grasa*	1,60 ± 0,02
Cenizas*	3,77 ± 0,21
Fibra soluble*	1,26 ± 0,23
Fibra insoluble*	23,05 ± 0,34
Fe**	3,43 ± 0,20
P**	29,33 ± 0,56
Zn**	2,70 ± 0,12
Mg**	82,88 ± 0,22
Ca**	179,16 ± 0,38
K**	460,28 ± 1,43

\*g.100g<sup>-1</sup> \*\*mg.100g<sup>-1</sup>

yendo variedades de semillas oscuras y claras, se reportaron valores de proteínas desde 22,5% a 30,8% en muestras cocidas y sin fermentar. Independientemente de las pequeñas diferencias originadas por los distintos procesos aplicados (fermentación, cocción, etc.), la composición química de los granos también es producto de las características genéticas de las variedades, del efecto de las condiciones del suelo, clima y demás factores ambientales tales como localización geográfica, estación de crecimiento y condiciones de cultivo, sin embargo, se podría sugerir para *P. vulgaris* un contenido de proteínas que oscila entre 20% y 30%.

Respecto a la fibra soluble e insoluble de los granos fermentados y cocidos se encontraron valores de 1,26

of soluble and insoluble fiber of 3.26 and 28.59 g.100g<sup>-1</sup> for not cooked grains. Decrease on soluble fiber values could be due to the usage by part of responsible micro organisms natural fermentation of the main components of soluble fiber presents in the variety studied (Granito *et al.*, 2001a), whereas the increase of insoluble fiber could be attributed to the formation of resistant starches type RS3 (retrograded starch) product of successive processes of heating and cooling which samples were submitted (Granito *et al.*, 2001b).

From the point of view of human nutrition, calcium and iron are minerals of high importance (Latham, 2002), particularly in Venezuela in where are considered like "potentially" deficient. In relation to

y 23,06 g.100g<sup>-1</sup>, respectivamente. Granito *et al.* (2001a) reportaron valores de fibra soluble e insoluble de 3,26 y 28,59 g.100g<sup>-1</sup> para granos crudos. La disminución en los valores de la fibra soluble podría deberse a la utilización por parte de los microorganismos responsables de la fermentación natural de los componentes principales de la fibra soluble presentes en la variedad estudiada (Granito *et al.*, 2001a), mientras que el incremento de la fibra insoluble podría ser atribuido a la formación de almidones resistentes tipo RS3 (almidón retrogradado) producto de los sucesivos procesos de calentamiento y enfriamiento a los que se sometieron las muestras (Granito *et al.*, 2001b).

Desde el punto de vista de la nutrición humana, el calcio y el hierro son minerales de gran importancia (Latham, 2002), particularmente en Venezuela donde son considerados como "potencialmente" deficientes. Al respecto, es importante señalar que la biodisponibilidad de minerales, especialmente del hierro, presentes en alimentos de origen vegetal es inferior a la biodisponibilidad de los minerales presentes en alimentos de origen animal (Ghavidel y Prakash, 2007), sin embargo, cualquier aporte puede contribuir a incrementar la ingesta de estos micronutrientes y por tanto a mejorar la nutrición de quien los consume. Analizando los resultados obtenidos (cuadro 1) y considerando una ingesta de 200g de granos de *P. vulgaris* fermentados y cocidos, se desprende que esta ración aportaría el 36% del requerimiento diario de calcio, establecido en 1000mg para la población venezolana (INN, 2000a), y

this, it is important to detach that minerals bioavailability, iron specially, presents in vegetal origin foods is inferior to the bioavailability of minerals present in animal origin foods (Ghavidel and Prakash, 2007), and nevertheless, any contribution could increase consumption of these micro nutrients and improve nutrition of people who consumes it. Analyzing results obtained (table 1) and considering a consumption of 200g of *P. vulgaris* grains., fermented and cooked, it can be established that this ration would give 36% of daily requirement of calcium, established in 1000mg for Venezuelan population (INN, 2000a), and 67% and 36% of iron and zinc daily requirements.

Table 2 shows results of pH, acidity and microbial flora of fermented and cooked grains, previous to its storage, and water in where they were fermented. When analyzing microbial flora of fermentation water it can be observed that predominant population are *Lactobacillus sp*, which agree with previous studies (Granito and Alvarez, 2006).

Natural fermentation is produced by micro organisms present in grains which comes from soil and its manipulation before they arrives to consumer. Additionally, presence of total coliforms, mildews and yeasts was determined at the end of 48 hours of fermentation.

According to results obtained it could be infer that *Lactobacillus sp* are the responsible of fermentation because they are in an order of magnitude greater than the rest of micro organisms present. In the same

el 67% y 36% de los requerimientos diarios de hierro y zinc.

En el cuadro 2 se presentan los resultados de pH, acidez y flora microbiana de los granos fermentados y cocidos, previo a su almacenamiento, y del agua donde fueron fermentados. Al analizar la flora microbiana del agua de fermentación se puede observar que la población predominante son los *Lactobacillus sp*, lo cual coincide con estudios previamente realizados (Granito y Alvarez, 2006).

La fermentación natural es producida por los microorganismos presentes en los granos, los cuales provienen del suelo y de la manipulación a la que son sometidos antes de que lleguen a manos del consumidor. Adicionalmente, se determinó la presencia de coliformes totales, mohos y levaduras al final de las 48 horas de fermentación.

De acuerdo a los resultados ob-

way, pH (4.07) and titrable (0.13) quantified in fermentation water suggest the active presence of acid lactic bacteria like responsible of process. Additionally, production of lactic acid by these micro organisms contributes to the companion flora do not increase in a significant way. Jay (2000) reports that coliforms could growth in a pH rank between 4.4 and 4.9; in such a way that reduction of micro organisms different of *Lactobacillus sp* could be great by extending fermentation time, and as a consequence the concentration of lactic acid would increase too toward no tolerable levels by these bacteria.

These results are in agreement with those reported by Granito and Álvarez (2006) who identified like responsible of natural fermentation of a black variety of *Phaseolus vulgaris*, to *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* which

## Cuadro 2. Características químicas y microbiológicas del agua de fermentación y de los granos fermentados y cocidos previo a su almacenamiento (Tiempo 0).

Table 2. Chemical and microbiological of fermenting water and fermented and cooked previous to its storage (Time 0).

Mediciones	Agua de fermentación	Granos fermentados y cocidos
pH	4,07 ± 0,1	5,1 ± 0,1
Acidez titulable(% ácido láctico)	0,13 ± 0,0	0,16 ± 0,1
Mesófilos aerobios*	2,5x10 <sup>5</sup>	<10 est**
Coliformes totales*	3,4x10 <sup>4</sup>	<10 est**
Lactobacillus*	4,4x10 <sup>5</sup>	<10 est**
Mohos y levaduras*	2,0x10 <sup>3</sup>	<10 est**

\*ufc.g<sup>-1</sup> \*\*Estimado.

tenidos se podría inferir que *Lactobacillus sp* son los responsables de la fermentación ya que se encuentran en un orden de magnitud mayor que el resto de microorganismos presentes. De igual manera, el pH (4,07) y la acidez titulable (0,13) cuantificados en el agua de fermentación sugieren la presencia activa de bacterias ácido lácticas como responsables del proceso. Adicionalmente, la producción de ácido láctico por parte de estos microorganismos contribuye a que la flora acompañante no se incremente de manera significativa. Jay (2000) reporta que los coliformes pueden crecer en un intervalo de pH entre 4,4 y 4,9; de manera que la reducción de los microorganismos diferentes de *Lactobacillus sp* pudiese ser mayor extendiendo el tiempo de fermentación, incrementándose en consecuencia la concentración de ácido láctico a niveles no tolerables por dichas bacterias.

Estos resultados coinciden con los reportados por Granito y Álvarez (2006) quienes identificaron como responsables de la fermentación natural de una variedad negra de *Phaseolus vulgaris*, a *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum*. Estos representaron el 36% del total de microorganismos encontrados en el agua, luego de 48 horas de fermentación cuando se alcanzó un pH final de 4,02. Por su parte, Zamora y Fields (1979) reportaron como responsables del proceso de fermentación natural (96 horas a 25°C) de variedades de frijol (*Vigna sinensis*) y garbanzo (*Cicer arietinum*) a *Pediococcus sp*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum*. La presencia de

represented 36% of total of micro organisms found in water, after 48 hours of fermentation when a final pH of 4.02 was reached. On his part, Zamora and Fields (1979) reported like responsible of natural fermentation process (96 hours to 25°C) of frijol (*Vigna sinensis*) and chickpea (*Cicer arietinum*) varieties, to *Pediococcus sp*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. Presence of *Lactobacillus helveticus* only was reported in chickpea fermentation.

In time 0 (table 2), the micro organisms presence was undetected in bottled grains, probably because to the sterilization process they were submit before sealed. Previous sterility conditions of bottles, (TERMO ENCOGIBLE) and sealed according to aseptic conditions was applied like barriers for avoiding growth of micro organisms during storage time. pH (5.1) and acidity (0.16) of product represent additional barriers for avoiding its possible damage. These parameters were monitored on time, since any change could suggest micro organism's presence and the consequent product damage.

Table 3 shows pH and titrable acidity measured during storage period. At 30°C pH decreased in a significant way ( $P<0.05$ ) at 15 storage days, being increase at 60 days to similar values to those found at the beginning of storage. The titrable acidity was significant increased ( $P<0.05$ ) until day 15, keeping without significant variations ( $P<0.05$ ) until finishing storage time. At 35°C pH remained constant until 60 storage

*Lactobacillus helveticus* sólo se reportó en la fermentación de garbanzos.

Al tiempo 0 (cuadro 2), no se detectó presencia de microorganismos en los granos contenidos en los envases, probablemente debido al proceso de esterilización al que fueron sometidos antes del sellado. Las condiciones de esterilidad previa de los envases, el envasado en caliente y el sellado en condiciones asépticas se aplicaron como barreras para evitar el crecimiento de los microorganismos durante el tiempo de almacenamiento. El pH (5,1) y la acidez (0,16) del producto representan barreras adicionales para evitar su posible deterioro. Estos parámetros fueron monitoreados en el tiempo, ya que cualquier cambio podría sugerir la presencia de microorganismos y el consecuente deterioro del producto.

En el cuadro 3 se muestra el pH y la acidez titulable medidos durante el período de almacenamiento. A 30°C el pH disminuyó significativamente ( $P < 0,05$ ) a los 15 días de almacenamiento, incrementándose luego a los 60 días a valores similares a los encontrados al inicio del almacenamiento. Paralelamente, la acidez titulable se incrementó significativamente ( $P < 0,05$ ) hasta el día 15, manteniéndose sin variaciones significativas ( $P > 0,05$ ) hasta finalizar el tiempo de almacenamiento. A 35°C el pH se mantuvo constante hasta los 60 días de almacenamiento cuando se incrementó significativamente ( $P < 0,05$ ), en tanto que la acidez se mantuvo constante hasta los 30 días, incrementándose significativamente luego hasta los 60 días de almacenamiento.

A 40°C el pH no varió

days when increased in a significant way ( $P < 0.05$ ), whereas the acidity remained constant until 30 days, by increasing in a significant way until 60 storage days.

At 40°C pH did not vary in a significant way ( $P < 0.05$ ) during storage time; in relation to the acidity there was a significant increase ( $P < 0.05$ ) and constant during all the storage time.

Kim *et al.*, (2008) found in kimchi, a vegetal fermented food of Korean origin, stored in laminated aluminum packages of low density polyethylene (Al-LDPE) and previously submitted to thermic treatment (60°C during 30 min) a pH decrease and an increase on acidity during storage time (30 days to 35°C). This result showed survival and growth of micro organism after thermic treatment.

On the other hand, Fleming *et al.*, (1983) reported that fermented vegetables are microbiologically stables during storage, as long as all the sugars be removed when changed into acids, alcohols and other products during initial fermentation of acid lactic bacteria or yeasts. Incomplete fermentation of sugars during storage can create a secondary fermentation made by yeasts during storage. On this respect, it is opportune to detach that according to results obtained by Granito and Guerra (2005) at the end of fermentation and cooking process, fermented sugars raffinose, stachyose and sucrose in *P. vulgaris* are undetected

Microbiological study carried out in storage water showed aerobia mesophilous growth, total coliforms

**Cuadro 3. pH y acidez titulable medidos durante el periodo del almacenamiento.**  
**Table 3. pH and titrable acidity measured during storage period.**

	pH			Acidez titulable (% ácido láctico)		
	30°C	35°C	40°C	30°C	35°C	40°C
0	5,0 ± 0,0 <sup>1,A2</sup>	5,0 ± 0,0 <sup>3,A</sup>	5,0 ± 0,0 <sup>3,A</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>3,A</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>3,A</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>3,A</sup>
15	4,6 ± 0,1 <sup>b,C</sup>	4,9 ± 0,1 <sup>a,B</sup>	4,8 ± 0,1 <sup>3,A,B</sup>	0,15 ± 0,0 <sup>b,B</sup>	0,12 ± 0,1 <sup>b,A</sup>	0,12 ± 0,1 <sup>b,A</sup>
30	4,2 ± 0,1 <sup>a,B</sup>	4,9 ± 0,1 <sup>a,A</sup>	4,7 ± 0,1 <sup>3,A</sup>	0,15 ± 0,0 <sup>b,B</sup>	0,12 ± 0,1 <sup>b,A</sup>	0,12 ± 0,0 <sup>b,A</sup>
45	4,4 ± 0,0 <sup>a,b,B</sup>	4,8 ± 0,1 <sup>a,A</sup>	4,8 ± 0,2 <sup>3,A</sup>	0,16 ± 0,1 <sup>b,B</sup>	0,13 ± 0,0 <sup>c,B</sup>	0,14 ± 0,2 <sup>b,A</sup>
60	5,1 ± 0,1 <sup>c,B</sup>	5,3 ± 0,1 <sup>b,A</sup>	5,1 ± 0,1 <sup>3,A,B</sup>	0,17 ± 0,0 <sup>b,c,B</sup>	0,14 ± 0,1 <sup>c,A</sup>	0,15 ± 0,0 <sup>3,A</sup>

<sup>1</sup>Valores con diferentes letras minúsculas en una misma columna difieren significativamente (P<0,05)

<sup>2</sup>Valores con diferentes letras mayúsculas en una misma fila difieren significativamente (P<0,05)

significativamente ( $P > 0,05$ ) durante el tiempo de almacenamiento; con respecto a la acidez hubo un aumento significativo ( $P < 0,05$ ) y constante durante todo el período de almacenamiento.

Kim *et al.* (2008) encontraron en kimchi, un alimento vegetal fermentado de origen coreano, almacenado en empaques de aluminio laminado de polietileno de baja densidad (AL-LDPE) y previamente sometido a tratamiento térmico (60°C durante 30 min) un descenso del pH y aumento de la acidez durante el tiempo de almacenamiento (30 días a 35°C). Este resultado fue indicativo de la sobrevivencia y crecimiento de microorganismos posterior al tratamiento térmico.

Por otra parte Fleming *et al.* (1983) indicaron que los vegetales fermentados son microbiológicamente estables durante el almacenamiento, siempre y cuando todos los azúcares sean removidos al ser convertidos en ácidos, alcoholes y otros productos durante la fermentación primaria de las bacterias acidolácticas o levaduras. La fermentación incompleta de los azúcares durante el almacenamiento puede dar lugar a una fermentación secundaria efectuada por levaduras durante el almacenamiento. Al respecto es oportuno señalar que de acuerdo con los resultados obtenidos por Granito y Guerra (2005) al final del proceso de fermentación y cocción no se detectan los azúcares fermentables rafinosa, estaquirosa y sacarosa en *P. vulgaris*.

El estudio microbiológico realizado en el agua de almacenamiento, mostró crecimiento de mesófilos

and mildews and yeasts only after 45 storage days so, it is possible to suggest that estimated useful life of 45 days (table 4).

The more favorable temperature for microbial growth was 40°C, temperature closed to the optimum of growth for the most of micro organisms (37°C), however, growth of *Lactobacillus sp* was not observed at any of evaluated temperatures.

Since grains after fermentation were submitted to cooking, previous to its packaged and companion fiber was undetected at the beginning of the study, it can be concluded that microbiological growth observed was produced by external contamination during storage time, result of a non adequate closing of glasses bottles. It is possible to suggest for subsequent studies, one at vacuum package in where closing hermetic property be guaranteed.

In relation to the instrumental color of grains any significant change was not observed ( $P < 0.05$ ) to temperatures used during storage time in values A and B. However, at 45 and 60 days, to three temperatures a significant increase was detected ( $P < 0.05$ ) of luminosity, that could show safety and stability of product, a possible chemical pigments degradation, microbial activity effect or nutrients lost (Kilcast and Subramaniam, 2000, Lamia and Moktar, 2003, García *et al.*, 2008).

## Conclusions

The useful life estimated for fermented grains of *P. vulgaris* cooked, packed in glass recipients and

aerobios, coliformes totales y mohos y levaduras, sólo después de 45 días de almacenamiento por lo que se podría sugerir que la vida útil estimada es de 45 días (cuadro 4).

La temperatura más favorable para el crecimiento microbiano resultó 40°C, temperatura cercana al óptimo de crecimiento para la mayoría de los microorganismos (37°C), sin embargo, no se observó crecimiento de *Lactobacillus sp* a ninguna de las temperaturas evaluadas.

Dado que los granos luego de la fermentación fueron sometidos a cocción, previo a su envasado y en los mismos no se detectó flora acompa-

stored to environmental temperature was of 45 days. This procedure is a contribution to the increase on the *P. vulgaris* consumption because it offers grains ready to be consumed that not produce flatulence, besides of diversifying its use like ingredient in other type of preparations.

*End of english version*

ñante al inicio del estudio, se puede concluir que el crecimiento microbiológico observado fue producido por contaminación externa durante el tiempo de almacenamiento, resultado de un cierre no adecuado de los

#### Cuadro 4. Determinaciones microbiológicas del agua de almacenamiento de los granos procesados.

Table 4. Microbiological determinations on storage water of processed grains.

Tiempo (días)	Tem (°C)	Análisis (UFC/mL)			
		Mesófilos Aerobios **	Coliformes Totales **	Lactobacillus**	Mohos y Levaduras***
15	30	<10 est*	<10 est*	<10 est*	<10 est*
	35	<10 est*	<10 est*	<10 est*	<10 est*
	40	<10 est*	<10 est*	<10 est*	<10 est*
30	30	<10 est*	<10 est*	<10 est*	<10 est*
	35	<10 est*	<10 est*	<10 est*	<10 est*
	40	<10 est*	<10 est*	<10 est*	<10 est*
45	30	>1000 est*	<10 est*	<10 est*	<10 est*
	35	>1000 est*	<10 est*	<10 est*	<10 est*
	40	1,5x10 <sup>5</sup>	<10 est*	<10 est*	<10 est*
60	30	2,5x10 <sup>5</sup>	1,0x10 <sup>3</sup>	<10 est*	2,0x10 <sup>2</sup>
	35	3,7x10 <sup>5</sup>	1,3x10 <sup>3</sup>	<10 est*	1,0x10 <sup>2</sup>
	40	4,2x10 <sup>5</sup>	2,1x10 <sup>3</sup>	<10 est*	<10 est*

\*Estimado. \*\*Incubado a 37°C. \*\*\*Incubado a 25°C

Tem = Temperatura



envases de vidrio. En virtud de lo anterior se sugiere para estudios posteriores un envasado al vacío donde se garantice la hermeticidad del cierre.

En relación al color instrumental de los granos no se observó cambio significativo ( $P > 0,05$ ) a las temperaturas utilizadas durante el tiempo de almacenamiento en los valores de a y b. Sin embargo, a los 45 y 60 días, a las tres temperaturas se detectó un incremento significativo ( $P < 0,05$ ) de la luminosidad (cuadro 5), lo que podría indicar desde el punto de vista de la seguridad y estabilidad

del producto, una posible degradación química de pigmentos, efecto de actividad microbiana o pérdida de nutrientes (Kilcast y Subramaniam, 2000; Lamia y Moktar, 2003; García *et al.*, 2008).

## Conclusiones

La vida útil estimada para granos de *P. vulgaris* fermentados, cocidos, envasados en recipientes de vidrio y almacenados a temperatura ambiente fue de 45 días. Con este procedimiento se contribuye al incremen-

**Cuadro 5. Determinaciones de color de los granos fermentados durante el almacenamiento.**

**Table 5. Color determinations of bioprocessed during storage.**

Color	Tiempo (días)	30°C	35°C	40 °C
L	0	69,0 ± 0,1 <sup>a,A</sup>	69,0 ± 0,1 <sup>a,A</sup>	69,0 ± 0,1 <sup>a,A</sup>
	15	68,7 ± 1,7 <sup>a,A</sup>	67,6 ± 3,1 <sup>a,A</sup>	64,4 ± 1,6 <sup>a,A</sup>
	30	68,9 ± 0,5 <sup>a,A</sup>	66,6 ± 2,3 <sup>a,A</sup>	64,3 ± 2,4 <sup>a,A</sup>
	45	78,3 ± 1,1 <sup>b,A</sup>	77,3 ± 1,8 <sup>b,A</sup>	79,5 ± 2,1 <sup>b,A</sup>
	60	88,3 ± 2,1 <sup>c,A</sup>	84,7 ± 1,3 <sup>b,A</sup>	81,1 ± 2,2 <sup>b,A</sup>
a	0	4,1 ± 0,3 <sup>a,A</sup>	4,1 ± 0,3 <sup>a,A</sup>	4,1 ± 0,3 <sup>a,A</sup>
	15	4,0 ± 0,4 <sup>a,A</sup>	4,7 ± 0,4 <sup>a,A</sup>	5,4 ± 0,6 <sup>a,A</sup>
	30	4,0 ± 0,5 <sup>a,A</sup>	4,5 ± 0,1 <sup>a,A</sup>	4,6 ± 0,2 <sup>a,A</sup>
	45	5,1 ± 0,5 <sup>a,A</sup>	4,7 ± 0,6 <sup>a,A</sup>	4,9 ± 0,8 <sup>a,A</sup>
	60	5,2 ± 0,3 <sup>a,A</sup>	5,2 ± 0,5 <sup>a,A</sup>	6,4 ± 0,6 <sup>a,A</sup>
b	0	14,7 ± 0,1 <sup>a,A</sup>	14,7 ± 0,1 <sup>a,A</sup>	14,7 ± 0,1 <sup>a,A</sup>
	15	15,6 ± 0,6 <sup>a,A</sup>	15,0 ± 0,7 <sup>a,A</sup>	14,7 ± 1,0 <sup>a,A</sup>
	30	15,2 ± 0,1 <sup>a,A</sup>	15,2 ± 0,5 <sup>a,A</sup>	14,6 ± 0,7 <sup>a,A</sup>
	45	18,6 ± 1,2 <sup>a,A</sup>	17,2 ± 0,8 <sup>a,A</sup>	17,7 ± 0,6 <sup>a,A</sup>
	60	20,6 ± 0,3 <sup>a,A</sup>	19,2 ± 1,1 <sup>a,A</sup>	19,8 ± 0,3 <sup>a,A</sup>

Valores con diferentes letras minúsculas en una misma columna difieren significativamente ( $P < 0,05$ )

Valores con diferentes letras mayúsculas en una misma fila difieren significativamente ( $P < 0,05$ )

to en la ingesta de *P. vulgaris*, al proveer al consumidor granos listos para el consumo que no producen flatulencia, además de diversificar su uso como ingrediente en otro tipo de preparaciones.

## Literatura citada

- APHA. Compendium of methods for microbiological examination of foods. 1992. 3° Edición. The American Public Health Association. Washington, DC.
- Association of Official Analytical Chemists. 1990. 15th edición. AOAC, Washington, DC.
- Bressani, R. 2002. Factors influencing nutritive value in food grain legumes: *Mucuna* compared to other grain legumes. p: 164-188. En: Food and feed from *Mucuna*: Current user and the way forward. Proceedings of an International Workshop 2002. Honduras.
- Champ, M. 2002 Grain legumes and health-a workshop in 2001. *Grain Legumes*. 35:13-14.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). 1981. Productos de cereales y leguminosas. Determinación de acidez. Muestreo. COVENIN # 1787:1981. Ministerio de Fomento. Caracas.
- Desphande, S. 1992. Food legumes in human nutrition: a personal perspective. *Food Sci. Nutr.* 32(4):333-363.
- Fleming, H., R. McFeeters y R. Thompson. 1983. Test for susceptibility of fermented vegetables to secondary fermentation. *J. Food Sci.* 48:982-983.
- García, P., A. López y A. Garrido. 2008. Study of the shelf life of ripe olives using an accelerated test approach. *J. Food Eng.* 84:569-575.
- Ghavidel, R. y J. Prakash. 2007. The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, in vitro iron and calcium bioavailability and in vitro starch and protein digestibility of some legume seeds. *LWT.* 40:1292-1299.
- Granito, M. y L. Trujillo. 2004. Uso de *Phaseolus vulgaris* y *Vigna sinensis* como extensores de una bebida láctea fermentada. *Arch. Latin. Nutric.* 54 (1):23-31.
- Granito, M. y G. Alvarez. 2006. Lactic acid fermentation of black beans (*Phaseolus vulgaris*): microbiological and chemical characterization. *J. Sci. Food Agric.* 86:1164-1171.
- Granito, M. y J. Guinand. 2005. Chemical and sensorial characterization of cream spreads developed from fermented flours of *Phaseolus vulgaris*. INTRADFOOD 2005. Valencia, España. 1467-1470 p.
- Granito, M. y M. Guerra. 2005. *Phaseolus vulgaris* bioprocada: una nueva alternativa al consumo de leguminosas. *Acta Cient. Venez.* 55: 50-60.
- Granito, M., C. Michel, J. Frías, M. Champ y M. Guerra. 2005. Influence of fermentation on the nutritional value of two varieties of *Vigna sinensis*. *Eur. Food Res. Tech.* 220:176-181.
- Granito, M., J. Frías, R. Doblado, M. Guerra, M. Champ y C. Vidal-Valverde. 2001a. Nutritional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*). *Eur. Food Res. Tech.* 214: 226-231.
- Granito, M., J. Frías, R. Doblado, M. Guerra, M. Champ y C. Vidal-Valverde. 2002. Nutritional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*). *Euro. Food Res. Tech.* 214: 226-231.
- Granito, M., M. Champ, A. David, C. Bonnet y M. Guerra. 2001b. Identification of gas-producing components in different varieties of *Phaseolus vulgaris* by *in vitro*

- fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 81:1-8.
- Granito, M., M. Champ, M. Guerra y J. Frías. 2003. Effect of natural and controlled fermentation on flatulence-producing compounds of beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Sci. Food Agric.* 83: 1004-1009.
- Granito, M., Y. Brito y A. Torres. 2007. Chemical composition, antioxidant capacity and functionality of raw and processed *P. lunatus*. *J. Sci. Food Agric.* 87:2801-2809.
- Hsu, H., D. Vavak, L. Satterlee y G. Miller. 1977. Multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J. Food Sci.* 42(5): 1269-1273.
- Instituto Nacional de Nutrición (INN). 1999. Tabla de Composición de Alimentos. N° 52. Serie cuadernos azules. Editorial Texto C.A. Caracas, Venezuela.
- Instituto Nacional de Nutrición (INN). 2000a. Valores de referencia de energía y nutrientes para la población venezolana. N° 53. Serie Cuadernos azules. Editorial Texto C.A. Caracas, Venezuela.
- Instituto Nacional de Nutrición (INN). 2000b. División de Nutrición en Salud Pública. Encuesta de Seguimiento al Consumo de Alimentos (ESCA). Resultados 1996-1997. Datos no publicados. Caracas, Venezuela.
- Jay, J. 2000. Food and Modern Microbiology. p. 113-119. 6° edición. Aspen, Maryland.
- Kilcast, D. y P. Subramaniam. 2000. Introduction. p. 1-19. En: Kilcast, D., P. Subramaniam (Eds). *The stability and shelf-life of food*. CRC Press. Cambridge.
- Kim, J., J. Park, J. Lee, W. Kim, Y. Chung y M. Hyun. 2008. The combined effects of N<sub>2</sub>-packaging, heating and gamma irradiation on the shelf-stability of *Kimchi*, Korean fermented vegetable. *Food control.* 19:56-61.
- Lajolo, F., F. Finardi y E. Menezes. 1991. Amylase inhibitors in *Phaseolus vulgaris* beans. *Food Technol.* 9:119-121.
- Lamia, A. y H. Moktar. 2003. Fermentative decolorization of olive mill wastewater by *Lactobacillus plantarum*. *Process Biochem.* 39:59-65.
- Latham, M. 2002. Nutrición humana en el mundo en desarrollo. p. 109-118. Colección FAO: Alimentación y nutrición N° 29. Roma.
- Messina, M. 1999. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am. J. Clin. Nutr.* 70(3):439S-450S.
- Pereira, M., D. Jacobs, J. Pins, S. Raatz, M. Gross, J. Slavin y E. Seaquist. 2002. Effect of whole grains on insulin sensitivity in overweight hyperinsulinemic adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 75:848-855.
- Proskey, L., N. Asp, E. Schweiser, J. Devries y Y. Furda. 1992. Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods and food product. Interlaboratory study. *J Assoc Off Anal Chem* 75:1017-1023.
- Rondón, E., E. Pacheco y F. Ortega. 2004. Estimación de vida útil de un análogo comercial de mayonesa utilizando el factor de aceleración Q<sub>10</sub>. *Rev. Fac. Agron.* 21: 68-83.
- Zamora, A. y M. Fields. 1979. Nutritive quality of fermented cowpeas (*Vigna sinensis*) and chickpeas (*Cicer arietinum*). *J. Food. Sci.* 44: 234-236.