

Efecto de la fermentación sobre la composición proximal y calidad proteica del *Dolichos lablab*

Effect of fermentation on proximate composition and protein quality of *Dolichos lablab*

S. Pérez y M. Granito

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

Resumen

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la fermentación natural e inducida sobre la composición proximal y calidad proteica de harinas y granos enteros de *Dolichos lablab*. Durante el proceso de fermentación se evaluó el pH, acidez titulable y se cuantificaron los microorganismos fermentativos y adulterantes que pudieran afectar el proceso de fermentación, se determinó la composición proximal, la digestibilidad proteica *in vitro* y la actividad de inhibición de tripsina (ATI) en los granos y harinas fermentados. Se observaron diferencias significativas en el pH y acidez al fermentar de forma natural o inducida a granos o harinas; en promedio la disminución del pH fue de 29% y el aumento de la acidez titulable fue de 34% en el caldo de fermentación. La población de coliformes, hongos y levaduras disminuyó significativamente, mientras que las bacterias ácido lácticas (BAL) aumentaron en forma progresiva durante las 48 h del bioproceso. En relación a la composición proximal la fermentación de los granos produjo una disminución del 4% en el contenido de cenizas, respecto al grano crudo, mientras que al fermentar harinas hubo una disminución en promedio del 15% en contenido de proteína, respecto al grano crudo. Por otro lado, la fermentación inducida de granos y harinas produjo un aumento de la calidad proteica del *D. lablab*, ya que se observó una disminución en la AIT del 27,4% y 40,5% respectivamente y aumento en la digestibilidad proteica en 8,4% y 14%, respectivamente.

Palabras clave: Fermentación, *Dolichos lablab*, calidad proteica, composición proximal, BAL.

Abstract

The aim of this work was to study the effect of natural and induced fermentation on proximate composition and protein quality of flours and whole grain of *Dolichos lablab*. During the fermentation process the pH and titratable acidity were assessed and fermentative and adulterant microorganisms that may affect the fermentation process, were quantified the proximate composition, protein digestibility *in vitro* and trypsin inhibitor activity (TIA) in grains and fermented flour. Significant differences were observed in the pH and acidity when grains or flours fermented of natural or induced form; in average the decrease of the pH was 29% and the titratable acidity increased 34% in the broth of fermentation. The population of coliforms, fungi and yeasts significantly decreased, while the acid lactic bacteria increased progressively within 48 h of fermentation processes. In relation to the proximal composition, the fermentation of grains produced a decrease of 4% in the content of ashes, with regard to the raw grain, whereas when flours fermented there was a decrease in average of 15% in content of protein, with regard to the raw grain. On the other hand, the induced fermentation of grains and flours produced increase of the protein quality of *D. lablab*, since a decrease was observed in the AIT of 27.4% and 40.5% respectively and in the protein digestibility increase in 8.4% and 14%, respectively.

Key words: fermentation, *Dolichos lablab*, protein quality, composition.

Introducción

Las leguminosas son importantes alimentos en todos los países tropicales y subtropicales. Contienen una alta proporción de carbohidratos (50% a 65%), bajo contenido de lípidos (0,8% a 2%) y son fuente de proteínas (17% a 25%), aunque por sus bajos niveles de metionina y cistina se recomienda ingerirlas en combinación con cereales (Sathe, 2002).

Las leguminosas son consideradas como alimentos funcionales, debido a que además de sus componentes nutritivos contienen otros componentes que son biológicamente activos porque proporcionan un beneficio adicional para la salud. Se reconoce que el consumo de leguminosas puede prevenir la diabetes, estados pre-diabéticos

Introduction

Legumes are important food in all tropical and subtropical countries. They have a high proportion of carbohydrates (50% to 65%), low content of lipids (0.8% to 2%) and are sources of proteins (17% to 25%), though by their low levels of methionine and cysteine are recommended to be eaten along to cereals (Sathe, 2002).

Legumes are considered as functional food, since besides of their nutritional components, they contain other components that are biological active because provide an additional benefit for the health. It is known that the consumption of legumes might prevent diabetes, pre-diabetic phase and obesity; also, they have anti-high

y la obesidad, además poseen propiedades anti-hipertensivas e hipocolesterolémicas (Kuthos *et al.*, 2003).

El consumo de leguminosas es una conducta alimenticia arraigada en Venezuela. Sin embargo, en los últimos años se ha registrado un descenso continuo de la producción de leguminosas de alto consumo como caraota (*Phaseolus vulgaris*), frijol (*Vigna sinenses*) y arvejas (*Pisum sativum*) (Quintana, 2001).

A fin contribuir con la seguridad agroalimentaria, el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) en 2001 inició proyectos para el rescate y conservación del germoplasma local de especies de leguminosas, con énfasis en las no tradicionales con alto rendimiento y alto potencial nutricional como el *Dolichos lablab* (Morros *et al.*, 2004).

El *Dolichos lablab* es una leguminosa considerada como una fuente potencial de proteína, que no ha sido explotada aún (Osman, 2007). Una ventaja clara de esta especie es que tiene un rango amplio de adaptación, no sólo a diversos pisos térmicos sino a diversas condiciones agroecológicas. Sin embargo, en los trópicos el *D. lablab* ha recibido poca atención, a pesar de su carácter perenne, posibilidad de producción continua durante el año, su valor nutricional y palatabilidad.

En Venezuela es un alimento marginal, pues su producción se destina principalmente al autoconsumo y sólo cuando hay pequeños excedentes el grano se comercializa en los mercados locales. El consumo y producción de *Dolichos lablab* ha sido

blood pressure properties and hypocholesterolaemic (Kuthos *et al.*, 2003).

The consumption of legumes is a tight conduct in Venezuela. However, in the last years it has registered a continuous decrease of the production of legumes, such as black beans (*Phaseolus vulgaris*), bean (*Vigna sinenses*) peas (*Pisum sativum*) (Quintana, 2001).

With the aim of contributing to the food security, the National Agriculture Research Center (INIA) in 2001 started researches for conserving the local germplasm of legumes species, emphasizing in the nontraditional with high yield and high nutritional potential as *Dolichos lablab* (Morros *et al.*, 2004).

Dolichos lablab is a legume considered as a potential source of protein that has not been exploited yet (Osman, 2007). A clear advantage of this specie is that it has a wide adaptation range, not only to diverse thermal soils but also to diverse agroecological conditions. However, in the tropics, *D. lablab* has received little attention even though of its perennial characteristics, possibility of continuous production during the year, nutritional value and taste.

In Venezuela, is a marginal food, because its production is mainly taken for the self-consumption and just when there are a few remnants the grain commercializes in the local market. The consumption and production of *Dolichos lablab* has been traditional in some states such as Lara, Yaracuy, Falcón and Táchira (Morros *et al.*, 2004).

Dolichos lablab has from 22–31% of raw protein and 46-63% of total

tradicional en algunos estados como Lara, Yaracuy, Falcón y Táchira (Morros *et al.*, 2004).

El *Dolichos lablab* contiene entre un 22 -31% de proteína cruda, y un 46-63% de carbohidratos totales (Osman, 2007). Particularmente en China, esta leguminosa se consume en sopas con propósitos terapéuticos, reconociéndose su efecto en la disminución de los síntomas de la hidropesía y alivio de diarreas (Wong y Cheung, 1998). Chau y Cheung (1998) encontraron que el *Dolichos lablab* es fuente de proteínas, aminoácidos esenciales, fibra dietética y almidones. Wong y Cheung (1998) sugirieron el uso de la harina de esta leguminosa para disminuir la malnutrición proteico-calórica, debido a que la misma tiene mayor calidad proteica respecto a otras leguminosas de consumo común tales como *Phaseolus calcaratus* y *Phaseolus angularis*. Por otra parte, algunos estudios demuestran que tanto la fibra dietética (Cheung y Chau, 1998) como la proteína (Chau *et al.*, 1998) de esta leguminosa ejercen efecto hipocolesterolemizante.

El consumo de *Dolichos lablab*, al igual que la mayoría de las leguminosas, está limitado debido a la presencia de factores antinutricionales, tales como inhibidores de tripsina, taninos, ácido fítico, fenoles, flavonoides, entre otros, que son capaces de reducir la biodisponibilidad y la digestibilidad de nutrientes. Para poder utilizar efectivamente esta leguminosa para la alimentación humana es necesario inactivar o remover estos factores antinutricionales, para lo cual se pueden aplicar métodos de remojo, descascarado, germinación, fermenta-

carbohydrates (Osman, 2007). Particularly in China, this legume is consumed in soups with therapeutic purposes, with a known effect in the reduction of the hydropsy symptoms and diarrhea (Wong and Cheung, 1998). Chau and Cheung (1998) found that *Dolichos lablab* is a source of protein, essential amino acids, dietetic fiber and starches. Wong and Cheung (1998) suggested the use of flour of this legume to reduce the protein-caloric malnutrition, since it has better protein quality regarding the other legumes such as *Phaseolus calcaratus* and *Phaseolus angularis*. On the other hand, some researches show that both the dietary fiber (Cheung and Chau, 1998) as the protein (Chau *et al.*, 1998) of this legume has a hypocholesterolaemic effect.

The consumption of *Dolichos lablab*, as well as most of the legumes, is limited due to the presence of anti nutritional factors, such as inhibitors of trypsin, tannin, phytic acids, phenols, flavonoids, among others, are capable of reducing the bio-availability and digestibility of the nutrients. In order to use this legume effectively for the human alimentation is necessary to inactivate or remove these anti nutritional factors, for which can be applied soaking methods, peeling, germination, fermentation, cooking and irradiation. The fermentation of legumes produces the reduction of anti nutritional factors, increases the useful life and modifies the sensorial properties, which sometimes is translated to a better acceptance by the public. The changes occurred in the fermented seeds will depend on the fermentation conditions of the evaluated specie (Frarnworth, 2003).

ción, cocción e irradiación. La fermentación de leguminosas produce la disminución de factores antinutricionales, incrementa la vida útil y modifica las propiedades sensoriales, lo cual a veces se traduce en una mejor aceptabilidad por el público consumidor. Los cambios ocurridos en las semillas fermentadas dependerán de las condiciones de la fermentación de la especie evaluada (Frarnworth, 2003).

La fermentación de los alimentos puede ser espontánea o con adición de un cultivo iniciador (fermentación inducida). La fermentación espontánea o natural ocurre con la flora endógena del alimento, siendo a menudo la flora fermentativa bacterias ácido lácticas (BAL) y en menor proporción los hongos (Granito y Álvarez, 2006).

En el presente trabajo se aplicaron dos tipos de fermentación, natural e inducida, en harinas y granos enteros de *Dolichos lablab* a fin de estudiar su efecto sobre la composición proximal, nivel de inhibidores de tripsina y digestibilidad proteica.

Material y métodos

Muestras:

Se analizó la variedad MS-01-00-018 de *Dolichos lablab*, perteneciente al banco de germoplasma del INIA, Maracay, Venezuela.

Métodos analíticos:

Fermentación:

Higienización de los granos

Los granos fueron lavados e higienizados para reducir la carga microbiana acompañante inicial. Para el lavado se empleó agua destilada estéril en una relación grano:agua de 1:1 (m/v), la cual luego fue descartada.

The food fermentation can be spontaneous or with addition of an starter culture (induced fermentation). Spontaneous or natural fermentation occurs with the endogenous flora of the food, sometimes being the fermentative flora of lactic acid bacteria (BAL) and in less proportion molds (Granito and Álvarez, 2006).

In the current research were applied two types of fermentation, natural and induced, in flour and seeds of *Dolichos lablab*, with the aim of studying its effect on the proximal composition, inhibitor level of trypsin and protein digestibility.

Materials and methods

Samples:

The variety MS-01-00-018 of *Dolichos lablab* was analyzed, coming from the germplasm bank of INIA, Maracay, Venezuela.

Analytic methods:

Fermentation:

Hygienic of the seeds

The seeds were washed and sanitized to reduce the microbial component. To wash them, sterile distilled water was used in a relation grain:water of 1:1 (m/v), which was later discharge. Later, the seeds were put in a solution with lactic acid at 1%, and stir for 10 min, the solution was discharged and was soaked again with sterile distilled water.

Obtaining of raw flours

A portion of sanitized seeds was let dried at 30°C in a forced-convection stove for an hour, later, was grinded until 80 mesh in a grinder ANALIZER MC-11 and kept in polyethylene bags at -20°C until its usage.

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.

Obtención de las harinas crudas.

Una porción de los granos higienizados fue secada a 30°C en una estufa de convección forzada durante 1 hora, para posteriormente ser molida hasta 80 mesh en un molino ANALIZER MC-11 y conservada en bolsas de polietileno a -20°C hasta su utilización.

Fermentación Natural: Los granos y las harinas crudas e 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 (m/v), a 42°C bajo una agitación de 60rpm durante 48 horas (Granito *et al.*, 2003).

Fermentación ácido-láctica: Se procedió de la misma forma que para la fermentación natural, pero inoculando en el agua destilada 1% del cultivo YF-3331 (CHR Hansen) que contiene las bacterias *Streptococcus salivarius* sub *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* sub *bulgaricus*.

Análisis microbiológicos: Se cuantificaron los microorganismos fermentativos y adulterantes que pudiesen afectar los procesos de fermentación. Los mismos se cuantificaron cada 8 horas hasta completar las 48h del bioproceso. Se empleó la metodología del compendio APHA (1992) para el análisis de: aerobios mesófilos (Plate

Natural fermentation: the sanitized seeds and flours raw were put in a micro fermentator New Brunswick Scientific Co. Inc, Edison New Cork, U.S.A. model BIOFLO 2000, which had sterile distilled water in a proportion grain:water of 1:4 (m/v) at 42°C agitating it at 60rpm for 48 hours (Granito *et al.*, 2003).

Acid-lactic fermentation: was done the same way of the natural fermentation, but inoculating in the distilled water 1% of the cultura YF-3331 (CHR Hansen) with the bacteria *Streptococcus salivarius* sub *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* sub *bulgaricus*.

Microbiological analysis: the fermentative and adulterant microorganisms that might be affecting the fermentation processes were quantified. The same were quantified every eight hours until completing 48h of the bio process. The compendium methodology APHA (1992) was employed for the analysis of: mesophilic aerobic (Plate Count Agar, Himedia M091), total coliforms (Violet Red Bile Agar, Himedia M049), lactobacillus (Lactobacilli MRS Agar, Himedia M641) and molds and yeasts (Potato Dextrose Agar, Himedia M096), for this, dilutions from 10⁻¹ to 10⁻⁷. were prepared.

Chemical and physical analysis

pH: the pH in the fermentation broth was measured with the potentiometric method (AOAC, 1990) and a potentiometer Coleman, model 39.

Titrateable acidity: the titrateable acidity was quantified in the fermentation broth according to the COVENIN 1787:1981 norm. The

Count Agar, Himedia M091), coliformes totales (Violet Red Bile Agar, Himedia M049), lactobacilos (Lactobacilli MRS Agar, Himedia M641) y mohos y levaduras (Potato Dextrose Agar, Himedia M096), para ello se prepararon diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-7} .

Análisis químicos y físicos:

pH: Se midió el pH en el caldo de fermentación mediante el método potenciométrico (AOAC, 1990) y un potenciómetro COLEMAN, Modelo 39.

Acidez titulable: La acidez titulable fue cuantificada en el caldo de fermentación según la norma COVENIN 1787:1981. Los resultados se reportaron como porcentaje de ácido láctico.

Las determinaciones de pH y acidez titulable se realizaron cada 8 horas hasta completar las 48 h de la fermentación.

Composición proximal

La humedad, proteínas, grasas y cenizas fueron cuantificadas a través de los métodos de la AOAC (1990) 925.09, 960.52, 920.39, 923.03, respectivamente.

Digestibilidad proteica *in vitro*

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 10min, según Hsu *et al.*, (1977).

Inhibidores de tripsina

La actividad de inhibición de tripsina se determinó con el método de Kakade *et al.* (1974). Utilizando hidrocloreuro de N-benzoil-DL-arginina-P-nitroanilida (BAPA) y

results were reported as percentage of lactic acid.

The determination of pH and titratable acidity were done every 8 hours until completing 48h of fermentation.

Proximal composition

Humidity, proteins fats, ashes were quantified through the AOAC (1990) methods 925.09, 960.52, 920.39, and 923.03 respectively.

Protein digestibility *in vitro*

The *in vitro* digestibility was determined using a multi enzymatic system of trypsin, chimotrypsin and peptidase, and the degree of enzymatic hydrolysis was determined by the pH falling method after 10 min, according Hsu *et al.*, (1977).

Trypsin inhibitors

The inhibitor activity of trypsin was determined with the method of Kakade *et al.* (1974) using hydrochloride of N-benzoyl, DL-arginine-P-nitroanilide (BAPA) and trypsin type III coming from the bovine pancreas. The inhibition activity of trypsin (AIT) was expressed in UIT mg of the sample⁻¹.

The proximal composition, protein *in vitro* digestibility and inhibitors of trypsin were determined before and after 48 hours of the bioprocessing.

Statistical analysis

All the results were expressed as the media of three determinations and the standard deviations. ANOVA and Duncan test were applied, using the Statgraphic software Statistical Graphics 4.0, for Windows.

Results and discussion

Table 1 shows the variation of pH and the titratable acidity during the

tripsina tipo III proveniente de páncreas de bovino. La actividad de inhibición de tripsina (AIT) se expresó en UIT mg de muestra⁻¹.

La composición proximal, digestibilidad proteica *in vitro* e inhibidores de tripsina se determinaron antes y después de las 48 horas del bioprocesamiento.

Análisis estadísticos

Todos los resultados fueron expresados como la media de tres determinaciones y su desviación estándar. Se aplicó ANOVA de una vía y prueba de Duncan, empleando el programa Statgraphic Statistical Graphics 4.0 para Windows.

Resultados y discusión

El cuadro 1 muestra la variación del pH y de la acidez titulable durante los procesos de fermentación de los granos y harinas de *Dolichos lablab*. En general, se observó una disminución significativa del pH en el caldo de fermentación. El descenso del pH en los granos sometidos a fermentación natural (GFN) y granos sometidos a fermentación inducida (GFI) al cabo de 48 horas de fermentación fue del 27% y 30%, respectivamente.

Para las harinas de *D. lablab*, se encontró una tendencia similar a la observada en la fermentación de granos, al cabo de 48 horas de procesamiento en el caldo de fermentación de la harina sometida a fermentación natural (HFN) se produjo un descenso del 28% en el pH, mientras que en el caldo de fermentación de la harina sometida a fermentación inducida (HFI) se produjo una disminución del pH del 30%.

fermentation processes of the seeds and flours of *Dolichos lablab*. In general, it was observed a significant reduction of pH in the fermentation broth. The descend of pH in the seeds submitted to the natural fermentation (GFN) and seeds submitted to induced fermentation (GFI) after 48 hours of fermentation was of 27% and 30% respectively.

For *D. lablab* flours, was found a similar tendency to the one observed in the fermentation of seeds, after 48 hours of processing in the fermentation broth of the flour submitted to natural fermentation (HFN) a descend of 28% in the pH happened, while, in the fermentation broth of the flour submitted to induced fermentation (HFI) occurred a reduction of the pH of 30%.

It must be said that the highest descend of the pH was observed in the induced fermentation, where the population of BAL is higher due to the inoculation.

The fermentation is usually associated to the reduction of pH and the increment of the titratable acidity of the food, due to the production of organic acids that are inherent to the process (Porres *et al.*, 2003).

Granito and Alvarez (2006) found that the predominant floras during the natural fermentation of *Phaseolus vulgaris* are the BAL. According to Ragaee *et al.* (1985) the reduction of pH is due to the production of lactic acid during the fermentation.

Regarding the titratable acidity, 48 hours after the fermentation, both natural (GFN) and induced (GFI) of seeds, were observed significant differences ($P < 0.05$) in the content of

Cuadro 1. Variación del pH y acidez titulable durante la fermentación natural e inducida de granos enteros y harina de *Dolichos lablab*.

Table 1. Variation of pH and titratable acidity during the natural and induced fermentation of entire grains and flour of *Dolichos lablab*.

	Tiempo	GFN	GFI	HFN	HFI
pH	0	6,40 ^{d,1} ±0,01	6,40 ^{d,1} ±0,01	6,40 ^{d,1} ±0,01	6,40 ^{e,1} ±0,01
	8	5,70 ^{c,3} ±0,03	5,00 ^{c,1} ±0,01	5,30 ^{c,2} ±0,01	5,00 ^{d,1} ±0,02
	24	5,00 ^{b,2} ±0,01	4,60 ^{b,1} ±0,01	5,00 ^{b,2} ±0,01	4,60 ^{c,1} ±0,01
	36	4,70 ^{a,2} ±0,03	4,50 ^{a,1} ±0,01	4,70 ^{a,2} ±0,03	4,50 ^{b,1} ±0,01
	48	4,70 ^{a,4} ±0,03	4,50 ^{a,2} ±0,01	4,60 ^{a,3} ±0,05	4,30 ^{a,1} ±0,01
Acidez titulable	0	0,02 ^{a,1} ±0,01	0,02 ^{a,1} ±0,01	0,02 ^{a,1} ±0,01	0,02 ^{a,1} ±0,01
	8	0,06 ^{b,1} ±0,01	0,06 ^{b,1} ±0,01	0,08 ^{b,12} ±0,02	0,10 ^{b,2} ±0,01
	24	0,08 ^{c,1} ±0,01	0,09 ^{c,12} ±0,01	0,10 ^{b,23} ±0,01	0,12 ^{bc,3} ±0,02
	36	0,11 ^{d,1} ±0,01	0,12 ^{d,1} ±0,01	0,12 ^{b,1} ±0,02	0,13 ^{c,1} ±0,02
	48	0,11 ^{d,1} ±0,01	0,15 ^{e,2} ±0,01	0,16 ^{c,2} ±0,01	0,21 ^{d,3} ±0,02

GFN: granos sometidos a fermentación natural, GFI: granos sometidos a fermentación inducida, HFN: harinas sometidas a fermentación natural, HFI: harinas sometidas a fermentación inducida. **Valores en una misma fila con letras diferentes presentaron diferencias significativas P<0,05

Es de hacer notar que el mayor descenso de pH se observó en la fermentación inducida, donde la población de BAL es mayor debido a la inoculación.

La fermentación usualmente se asocia con la disminución del pH y el aumento de la acidez titulable del alimento, debido a la producción de ácidos orgánicos que son inherentes al proceso (Porres *et al.*, 2003).

Granito y Alvarez (2006) encontraron que la flora predominante durante la fermentación natural de *Phaseolus vulgaris* son las BAL. De acuerdo a Ragae *et al.* (1985) la disminución del pH es debido a la producción de ácido láctico durante la fermentación.

Con respecto a la acidez titulable, después de 48 horas de fermentación tanto natural (GFN) como inducida (GFI) de granos, se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en el contenido de ácido titulado. GFI mostró una acidez titulable 36% superior a GFN. Así mismo, para las harinas luego de 48 horas de fermentación la acidez titulable de HFI fue 31% superior a la cuantificada en HFN. Tal tendencia puede ser atribuida a diferencias en las especies de microorganismos, así como a diferencias en la densidad de las poblaciones microbianas, presentes en ambos procesos.

Granito *et al.*, (2003) cuantificaron el pH del caldo de fermentación de granos *P. vulgaris* y encontraron al cabo de 48h de proceso natural e inducido una reducción del 34,6% y 30,1%, respectivamente, por su parte la acidez titulable luego de 48h de fermentación para el proceso natural fue

titratable acid. GFI showed a titratable acidity 36% superior to GFN. Likewise, for flours after 48 hours of fermentation, the titratable acidity of HFI was 31% superior to the quantified in HFN. Such tendency might be attributed in the density of microbial populations presented in both processes.

Granito *et al.* (2003) quantified the pH of the fermentation broth of seeds *P. vulgaris* and found after 48 hours of natural and induced process a reduction of 34.6% and 30.1% respectively, on the other hand, the titratable acidity after 48 hours of fermentation for the natural process was of 18.3% higher than the induced. The differences with this research might be due to the use of different species; likewise, the difference in the precedence of seeds might imply differences in the present endogenous flora.

Martín-Cabrejas *et al.* (2004) and Porres *et al.* (2003) when fermenting flours of *P. vulgaris* found lower pH and higher titratable acidity in the induced fermentation than in the fermentation with endogenous flora, which attributed to the differences in the type of bacterial population and their differences of development and production of organic acids.

On the other hand, it is important to mention that significant differences were observed ($P < 0.05$) in the titratable acidity when applying the same type of fermentation on different granulometry of the sample. The titratable acidity of HFN was 45.5% higher than GFN, and the titratable acidity of HFI was 40% higher than GFI. The lower size of the

18,3% mayor que para el inducido. Las diferencias con este estudio pueden ser debidas al uso de diferentes especies, así mismo la diferencia en la procedencia de los granos podría implicar deferenencias en la flora endógena presente.

Martín-Cabrejas *et al.* (2004) y Porres *et al.* (2003) al fermentar harinas de *P. vulgaris* encontraron menor pH y mayor acidez titulable en la fermentación inducida que en la fermentación con flora endógena, lo cual atribuyeron a las diferencias en el tipo de población bacteriana y sus diferencias de desarrollo y producción de ácidos orgánicos.

Por otra parte, es importante destacar que se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la acidez titulable al aplicar el mismo tipo de fermentación sobre diferentes granulometrías de la muestra. La acidez titulable de HFN fue 45,5% mayor que la de GFN y la acidez titulable de HFI fue 40% mayor que la de GFI. El menor tamaño de partícula de la muestra pareciera aumentar la disponibilidad del sustrato a la acción microbiana y esto posiblemente favorece una mayor producción de metabolitos.

Desarrollo de la microflora en el proceso de fermentación.

Las figuras 1 y 2 muestran la microflora cuantificada durante los procesos de fermentación aplicados al *Dolichos lablab*. Al cabo de 48 h de fermentación natural e inducida de granos y harinas, la población de coliformes disminuyó en un 99%. Esta tendencia podría ser atribuida a las condiciones de pH y acidez del medio de fermentación, generado por la actividad de las BAL, las cuales eran des-

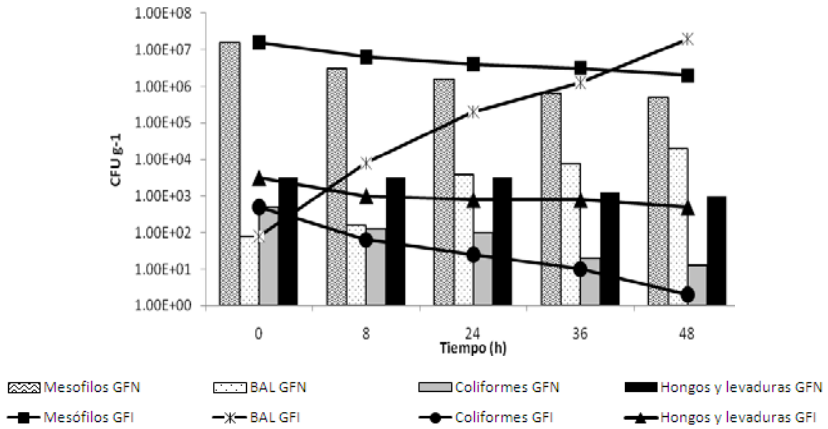
sample's particle seems to increase the availability of the substrate to the microbial action, and this might favor a higher production of metabolites.

Development of the microflora in the fermentation process

Figures 1 and 2 show the quantified microflora during the fermentation processes applied to *Dolichos lablab*. After 48 hours of natural and induced fermentation of the seeds and flours, the coliform population reduced in 99%. This tendency might be attributed to the conditions of pH and acidity of the fermentation culture, generated by the activity of BAL, which were favorable for the development of coliforms. Granito and Álvarez (2006) when fermenting seeds of *P. vulgaris* with *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei* for 48 hours observed that the population of coliforms reduced in 98%.

The population of lactic acid bacteria during the fermentation processes increased progressively. The natural and induced fermentation of seeds reached a final population of 10^4 CFU g^{-1} and 10^7 CFU g^{-1} , respectively. Fermenting the flours, the final population of BAL was of 10^5 CFU g^{-1} and 10^9 CFU g^{-1} for HFN and HFI, respectively.

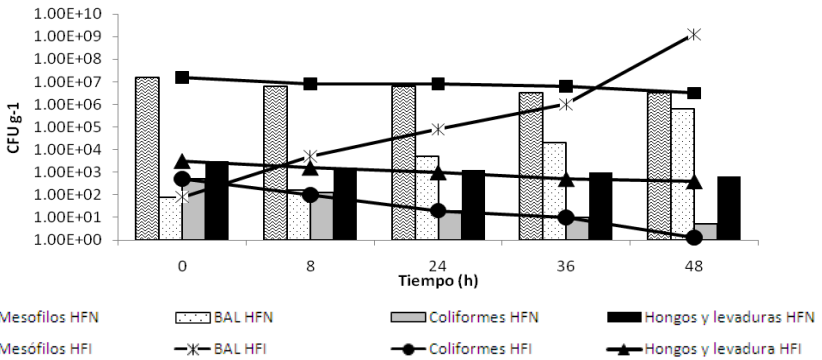
The differences observed among the processes of natural and induced fermentation are reasonable, considering that on each process the population of bacteria that originated the fermentation were different; the natural fermentation occurred with the endogenous flora, while the induced flora took place by the intentional incorporation of a starter culture,



GFN: granos sometidos a fermentación natural, GFI: granos sometidos a fermentación inducida

Figura 1. Población de microorganismos durante la fermentación de granos de *Dolichos lablab*.

Figure 1. Population of microorganisms during the fermentation of *Dolichos lablab* seeds.



HFN: harinas sometidas a fermentación natural, HFI: harinas sometidas a fermentación inducida.

Figura 2. Población de microorganismos durante la fermentación de harinas de *Dolichos lablab*.

Figure 2. Population of microorganisms during the fermentation of *Dolichos lablab* flours.

favorables para el desarrollo de las coliformes. Granito y Álvarez (2006) al fermentar granos enteros de *P. vulgaris* con *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei* durante 48h observaron que la población de coliformes disminuyó un 98%.

La población de bacterias ácido lácticas durante los procesos de fermentación aumentó progresivamente. La fermentación natural e inducida de granos se alcanzó una población final de 10^4 CFU g^{-1} y de 10^7 CFU g^{-1} , respectivamente. Al fermentar las harinas, la población final de BAL fue de 10^5 CFU g^{-1} y 10^9 CFU g^{-1} para HFN y HFI, respectivamente.

Las diferencias observadas entre los procesos de fermentación natural e inducida son razonables, tomando en cuenta que en cada proceso la población de bacterias que dieron lugar a la fermentación fueron diferentes; la fermentación natural ocurrió con la flora endógena, mientras que la fermentación inducida tuvo lugar por la incorporación intencional de un cultivo iniciador, el cual consistía de una mezcla de bacterias ácido lácticas (*Streptococcus salivarius* sub *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* sub *bulgaricus*).

Cuando las bacterias ácido lácticas se encuentran presentes en la flora endógena de la materia prima y las condiciones tales de temperatura, a_w , concentración de oxígeno y pH son favorables para el crecimiento de microorganismos, se produce competencia entre las especies bacterianas. El crecimiento de las BAL produce disminución del pH como consecuencia de la producción de ácido; esto aunado a la producción de otros metabolitos

which consisted on a mix of lactic acid bacteria (*Streptococcus salivarius* sub *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* sub *bulgaricus*).

When the lactic acid bacteria are present in the endogenous flora of the raw matter and the conditions such as temperature, a_w , oxygen's concentration and pH are favorable for the growth of microorganisms; a competence among the bacteria species is produced. The growth of BAL produces a reduction of the pH as a consequence of the acid's production; this plus the production of metabolites such as hydrogen peroxide; diacetyl and bacteriocins generate a hostile environment for the development of pathogen and damaged microorganisms (Albano *et al.*, 2009). On the metabolites produced by BAL are the bacteriocins, which are proteins or antimicrobial peptides synthesized in the ribosome of the BAL; the producer cell also synthesizes a molecule that immunizes against the own bacteriocins. These peptides attacks the cellular membrane from other bacteria avoiding their production (Albano *et al.*, 2009).

BAL, specifically the genres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* and *Carnobacterium* are used in the bio-preservation as bio-protector cultures, and has highlighted by being microorganisms that through the production of lactic acid and other metabolites attack the growth of unwanted bacteria and might help in the preservation of food (Schnürer, 2005).

In relation to the population of molds and yeast, it decreased during

como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas genera un ambiente hostil para el desarrollo de microorganismos patógenos y de deterioro (Albano *et al.*, 2009). Dentro de los metabolitos producidos por las BAL se encuentran las bacteriocinas que son proteínas o péptidos antimicrobianos sintetizados en el ribosoma de las BAL; la célula productora sintetiza además una molécula que la inmuniza contra la propia bacteriocina. Estos péptidos atacan la membrana celular de otras bacterias evitando su reproducción (Albano *et al.*, 2009).

Las BAL, específicamente los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Carnobacterium* son usadas en la biopreservación como cultivos bioprotectores y se han destacado por ser microorganismos que mediante la producción de ácido láctico y otros metabolitos contrarrestan el crecimiento de bacterias no deseadas y pueden ayudar en la preservación de los alimentos. (Schnürer, 2005)

En relación a la población de hongos y levaduras, esta decreció durante el tiempo de fermentación. Para GFN y GFI se redujo la población de hongos y levaduras en un 68% y 84%, respectivamente. Por otra parte, para HFN y HFI la reducción fue del 80% y 87%. Aun cuando en la literatura la evidencia de la actividad antifúngica de las BAL se ha ilustrado con base en su efecto de inhibición, se sabe que las BAL son capaces de producir compuestos antifúngicos de baja masa molecular como ácidos fenil-lácticos, dipéptidos cíclicos, ácidos grasos de cadena corta, peróxido de hidrógeno,

the fermentation. For GFN and GFI the population of molds and yeast reduced in 68% and 84% respectively. On the other hand, for HFN and HFI, the reduction was of 80% and 87%. Even when in the literature the evidence of the antifungal activity of BAL has been illustrated based on the inhibition effect, it is known that BAL are capable of producing antifungal compounds of low molecular rate such as phenil-lactic acids, cyclic dipeptide, short chain fatty acid, hydrogen peroxide, among others, which are capable of having synergistic effects among them. However, their action mechanism is not clearly known (Schnürer and Magnusson, 2005)

Proximal composition of fermented *Dolichos lablab*

In table 2 is shown the effect of the natural and induced fermentation on the proximal composition of seeds and *Dolichos lablab* flours. Significant differences were not observed .

($P < 0.05$) in the proximal composition of GFN and GFI, except in the proteins' content, which reduced in 4% in relation to the raw grain (GC).

In relation to the fermentation of flours, there were significant differences ($P < 0.05$) in the content of raw protein between HFN and HFI. The processing of flours produced a reduction in the content of proteins in relation to the raw grain; such reduction was of 16% and 14% for HFN and HFI, respectively. Granito *et al.* (2002) found a reduction of 12% in the protein content of *Phaseolus vulgaris* fermented naturally, while Porres *et al.* (2003) reported a reduction of 36% in the content of soluble nitrogen when fermenting flours of *P. vulgaris* for 48 hours.

entre otros, los cuales son capaces de ejercer efectos sinérgico entre ellos. Sin embargo, su mecanismo de acción no se conoce claramente. (Schnürer y Magnusson, 2005)

Composición proximal de *Dolichos lablab* fermentado.

En el cuadro 2 se muestra el efecto de la fermentación natural e inducida sobre la composición proximal de granos y harinas de *Dolichos lablab*. No se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la composición proximal de GFN y GFI, excepto en el contenido de proteínas, el cual disminuyó en 4% respecto al grano crudo (GC).

Con relación a la fermentación de harinas, hubo diferencias significativas ($P < 0,05$) en el contenido de proteína cruda entre HFN y HFI. El procesamiento de las harinas produjo disminución del contenido de proteínas respecto al grano crudo, tal disminución fue del 16% y 14% para HFN y

In the fermentation broth of GFN and GFI was quantified 2.8% and 4.9% of proteins, respectively, while, in the fermentation broth of HFN and HFI was found 10.1% and 12.9% of the protein, respectively. This indicates that the reduction in the protein's content in seeds and in fermented flours might be attributed in part to the solubilization of the proteins in the fermentation broth.

Rodríguez-Burguer *et al.*, (1998) found that when fermenting flours of *Phaseolus vulgaris* con *Rhizopus oligosporus* 15% of the protein dissolves in the fermentation broth. Likewise, the reduction of the proteins' content after the fermentation might be due to its metabolism by hands of the microorganisms involve in the bioprocess (Gibbs *et al.*, 2004).

Regarding the ashes' content, there were not significant differences between GFN and GFI, however, when comparing them to the raw seeds, was

Cuadro 2. Efecto de la fermentación natural e inducida sobre la composición proximal de granos y harinas de *Dolichos lablab*.

Table 2. Effect of the natural and induced fermentation on the proximal composition of seeds and flours of *Dolichos lablab*.

Muestra	% Proteína cruda	% Grasa cruda	% Cenizas
GC*	28,66 ± 0,04 ^{e**}	0,77 ± 0,01 ^a	4,20 ± 0,01 ^e
GFN	27,51 ± 0,03 ^c	0,78 ± 0,01 ^a	3,82 ± 0,01 ^c
GFI	27,41 ± 0,07 ^c	0,77 ± 0,01 ^a	3,83 ± 0,02 ^c
HFN	24,06 ± 0,02 ^b	0,76 ± 0,01 ^a	3,47 ± 0,04 ^a
HFI	24,58 ± 0,03 ^a	0,77 ± 0,02 ^a	3,59 ± 0,02 ^b

**GC: granos crudos, GFN: granos sometidos a fermentación natural, GFI: granos sometidos a fermentación inducida, HFN: harinas sometidas a fermentación natural, HFI: harinas sometidas a fermentación inducida. **Valores en una misma fila con letras diferentes presentaron diferencias significativas $P < 0,05$.

HFI, respectivamente. Granito *et al.*, (2002) encontraron una reducción del 12% en el contenido de proteína de *Phaseolus vulgaris* fermentada de forma natural, mientras que Porres *et al.* (2003) reportaron una disminución de 36% en el contenido de nitrógeno soluble al fermentar harinas de *P. vulgaris* durante 48 horas.

En el caldo de fermentación de GFN y GFI se cuantificó un 2,8% y 4,9% de proteínas, respectivamente, mientras que en el caldo de fermentación de HFN y HFI se encontró un 10,1% y 12,9% de proteína, respectivamente. Esto indica que la disminución del contenido de proteínas tanto en granos como en harinas fermentadas podría ser atribuida en parte a la solubilización de las proteínas en el caldo de fermentación.

Rodríguez-Burguer *et al.* (1998) encontraron que al fermentar harinas de *Phaseolus vulgaris* con *Rhizopus oligosporus* el 15% de la proteína se solubilizaba en el caldo de fermentación. Así mismo, la disminución del contenido de proteínas luego de la fermentación podría deberse a su metabolización por parte de los microorganismos involucrados en el bioproceso (Gibbs *et al.*, 2004).

Con respecto al contenido de cenizas, no se encontraron diferencias significativas entre GFN y GFI, sin embargo al compararlas con los granos crudos se observó que hubo una disminución del 10%. En relación a las harinas se encontró en HFI un 3,5% más de cenizas respecto a HFN. En comparación con GC las muestras HFN y HFI presentaron una disminución del contenido de cenizas del 17% y 14%, respectivamente.

observed a reduction of 10%. In relation to the flours, in HFI was found 3.5% more ashes respect to HFN. In comparison to GC, samples of HFN and HFI presented a reduction of the ashes' content of 17% and 14% respectively.

From the previous results is seen a possible relation between the size of the sample and solubilization of the compounds that constitute the ashes. The reduction on the ashes' content with the formation of seeds and flours might be attributed to the solubilization of the compounds that form part of these. Such argument is based on the fact that ashes are composed by oxides, sulphates, phosphates and chlorides, much of which are soluble in water. Porres *et al.* (2003) attribute the reduction in 6% of the ashes' content of *P. vulgaris* fermented flour to this solubilization process.

The fermentation effect on the inhibition activity of trypsin is shown in table 3. Generally, was observed that the fermentation produced a reduction of AIT, in the raw seeds, the GFN and GFI processes, showed a reduction of 13.0% and 27.4% respectively.

In relation to flours, HFN and HFI had an inhibition activity of trypsin 17.8% and 40.5% lower than the quantified in the raw seeds. Tabera *et al.*, (1995) found that after 48 hours of natural fermentation of *Lens culinaris* is produced a reduction of AIT of 46-63%, depending on the proportion water-seeds used for the bioproces.

The reduction of these antinutritional compounds might be

De los resultados anteriores se evidencia una posible relación entre el tamaño de la muestra y la solubilización de los compuestos constituyentes de las cenizas. La disminución en el contenido de cenizas con la fermentación de granos y harinas se podría atribuir a la solubilización de los compuestos que forman parte de estas. Tal argumento se basa en el hecho que las cenizas se componen de óxidos, sulfatos, fosfatos y cloruros muchos de los cuales son solubles en agua. Porres *et al.* (2003) atribuyen la disminución en 6% del contenido de cenizas de harina de *P. vulgaris* fermentadas a este proceso de solubilización.

El efecto de la fermentación sobre la actividad de inhibición de tripsina se muestra en el cuadro 3. En general se observó que la fermentación produjo reducción de la AIT, respecto al grano crudo los procesos GFN y GFI mostraron una reducción del 13,0% y 27,4%, respectivamente.

Cuadro 3. Digestibilidad *in vitro* e inhibidores de tripsina en *Dolichos lablab* fermentado.

Table 3. In vitro digestibility and trypsin inhibitors in fermented *Dolichos lablab*.

Tratamiento	TIA	% Digestibilidad proteica <i>in vitro</i>
GC*	31,16± 0,01 ^{e**}	82,27±0,14 ^a
GFN	27,12± 0,01 ^d	87,13±0,01 ^b
GFI	22,43±0,02 ^b	89,16±0,02 ^c
HFN	25,61±0,01 ^c	90,45±0,01 ^d
HFI	18,53±0,02 ^a	93,45±0,03 ^e

GC: granos crudos, GFN: granos sometidos a fermentación natural, GFI: granos sometidos a fermentación inducida, HFN: harinas sometidas a fermentación natural, HFI: harinas sometidas a fermentación inducida. **Valores en una misma fila con letras diferentes presentaron diferencias significativas $P < 0,05$.

attributed to the solubilization of proteins with inhibitors activity of trypsin in the fermentation broth. do Prado *et al.* (1980) studied the solubility of the fraction of soy proteins with activity of trypsin inhibitors and found that these are soluble to pH 4.5, to which, the hypothesis that the fraction of proteins that the trypsin inhibitors was dissolved in the fermentation broth gets stronger, because in all cases the final pH of the bioprocess was equal to inferior to 4.5.

As a consequence to the reduction of the inhibitor activity of trypsin, was observed an increment on the in vitro protein digestibility of fermented *Dolichos lablab*, compare to the one of the raw seeds, GFN and GFI increased their protein digestibility in 5.9% and 8.4% respectively.

Fermenting the flours, the increment of the in vitro protein digestibility respect to the raw seeds was of 10% and 14% in HFN and HFI, respectively. Paredes-Lopez *et al.*,

En relación a las harinas, HFN y HFI tuvieron una actividad de inhibición de tripsina 17,8% y 40,5% menor que la cuantificada en el grano crudo. Tabera *et al.* (1995) encontraron que al cabo de 48 horas de fermentación natural de *Lens culinaris* se produce una disminución de la AIT del 46-63%, esto dependiendo de la proporción agua - grano utilizada para el bioproceso.

La reducción de estos compuestos antinutricionales puede atribuirse a solubilización de proteínas con actividad de inhibidores de tripsina en el caldo de fermentación. do Prado *et al.*, (1980) estudiaron la solubilidad de la fracción de proteínas de soya con actividad de inhibidores de tripsina y encontraron que estas son solubles a pH 4,5; con lo cual, la hipótesis que la fracción de proteínas que contenía a los inhibidores de tripsina se encontraba solubilizada en el caldo de fermentación se refuerza, pues en todos los casos el pH final del bioproceso fue igual o inferior a 4,5.

Como consecuencia de la reducción de la actividad de inhibición de tripsina se observó aumento de la digestibilidad proteica *in vitro* del *Dolichos lablab* fermentado, en comparación con la del grano crudo. GFN y GFI incrementaron su digestibilidad proteica en 5,9% y 8,4%, respectivamente.

Al fermentar las harinas el aumento de la digestibilidad proteica *in vitro* respecto a la de los granos crudos fue del 10% y 14% en HFN y HFI, respectivamente. Paredes-Lopez *et al.* (1990) y Angulo-Bejarano *et al.* (2008) reportaron que el incremento de la digestibilidad proteica *in vitro*

(1990) and Angulo-Bejarano *et al.*, (2008) reported that the increment of the *in vitro* protein digestibility is consequence of the elimination of antinutritional factors, such as, the hydrolysis of phytic acid and the reduction of proteins inhibitors.

The popularity of the fermented legumes in the occidental world is due to desirable changes that produces the fermentation in the texture, organopeltic characteristics and in the increment of *in vitro* protein digestibility. Chavan *et al.* (1986) found and increment in the content of soluble protein and free aminoacids after the fermentation of *Vigna radiata* which would make it easier to digest. Regae *et al.* (1985) reported that the natural fermentation of *Lens culinaris* during 4 days at 32°C carries to the increment of the total content of aminoacids and *in vitro* digestibility.

Conclusions

Fermentation of flours and seeds of *D. lablab* produced a significant reduction in the content of ashes and proteins. Likewise, desirable changes were observed in this legume, since there was a significant reduction of the inhibition activity of trypsin, consequently, an increment in the protein digestibility.

End of english version

es consecuencia de la eliminación de factores antinutricionales como por ejemplo la hidrólisis de ácido fítico y la reducción de inhibidores de proteinasa.

La popularidad de las leguminosas fermentadas en el mundo occidental se debe a los cambios deseables que produce la fermentación, en la textura, características organolépticas y en el incremento de la digestibilidad proteica *in vitro*. Chavan *et al.* (1986) encontraron un aumento en el contenido de proteína soluble y de aminoácidos libres luego de la fermentación de *Vigna radiata* lo que la haría más digerible. Ragaee *et al.* (1985) reportaron que la fermentación natural de *Lens culinaris* durante 4 días a 32°C conduce al aumento del contenido total de aminoácidos y de la digestibilidad *in vitro*.

Conclusiones

La fermentación de harinas y granos de *D. lablab* produjo disminución significativa en el contenido de cenizas y proteínas. Así mismo, se observaron cambios deseables en esta leguminosa, debido a que hubo una disminución significativa de la actividad de inhibición de tripsina y como consecuencia de ello aumento de la digestibilidad proteica.

Literatura citada

- Albano, H., C. Pinho, D. Leite, J. Barbosa, J. Silva, L. Carneiro, R. Magalhães, T. Hogg y P. Teixeira. 2009. Evaluation of a bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for "Alheira", a fermented meat sausage. *Food Control*. 20(8):764-770.
- Angulo-Bejarano, P., N. Verdugo-Montoya, E. Cuevas-Rodríguez, J. Milán-Carrillo, R. Mora-Escobedo, J. Lopez-Valenzuela, J. Garzón-Tiznado and C. Reyes-Moreno. 2008. Tempeh flour from chickpea (*Cicer arietinum* L.) nutritional and physicochemical properties. *Food Chem.* 106(1):106-112.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis. Washington: Association of official analytical chemist.
- APHA, 1992. Métodos estándares para el examen de agua y aguas residuales, 18^a edición, American Public Health Association, Washington, DC.
- Chau, C. y C. Cheung. 1998. Functional properties of flours prepared from three chinese indigenous legume seed. *Food Chem.* 61:429-433.
- Chau, C., P. Cheung y Y. Wong. 1998. Hypocholesterolemic effects of protein concentrates from three chinese legumes seed. *J. Agric. Food Chem.* 46:3698-3701.
- Chavan, J., S. Kadam y D. Salunkhe. 1986. Biochemistry and technology of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 5(2):107-158.
- Cheung, P. y C. Chau. 1998. Changes in the dietary fiber (resistant starch and nonstarch polysaccharides) content of cooked flours prepared from three chinese indigenous legume seeds. *J. Agric. Food Chem.* 46(1):262-265.
- COVENIN Comisión Venezolana de Normas Industriales. 1981. Productos de cereales y leguminosas. Determinación de acidez. COVENIN N° 1787:1981. Ministerio de Fomento. Caracas.
- do Prado, V., P. Antunes y V. Sgarbieri. 1980. Antinutrient occurrence and some physicochemical properties of the protein fractions of five Brazilian soybean varieties. *Arch. Latinoam. Nutr.* 30(4): 551-563.
- Frarnworth, E. 2003. Handbook of fermented functional foods. En *Functional foods and nutraceutical series*. Boca Ratón: CRC Press 306-333 p.
- Gibbs, B., A. Zougman, R. Masse y C. Mulligan. 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Res. Int.* 37:123-31.

- Granito, M. y G. Álvarez. 2006. Lactic acid fermentation of black beans (*Phaseolus vulgaris*): microbiological and chemical characterization. *J. Sci. Food Agric.* 86: 1164-1171.
- Granito, M., C. Martine, J. Frías y M. Guerra, 2003. Effect of natural and controlled fermentation on flatus producing compounds of beans *Phaseolus vulgaris*. *J. Sci. Food Agric.* 2003. 83:1004-1009.
- Granito, M., M. Guerra, J. Frías, R. Doblado, M. Champ y V. Valverde. 2002. Nutritional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*). *Eur. Food Res. Tech.* 214:226-23.
- Hsu, H., D. Vavak, L. Satterlee y G. Miller. 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J. Food Sci.* 42(5):1269-1273.
- Kakade, M., J. Rackis, J. McGhee y G. Puski. 1974. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chem.* 51:376-382.
- Martín-Cabrejas, M., B. Sanfiz, E. Mollá Adria, R. Esteban y F. López-Andréu. 2004. Effect of Fermentation and Autoclaving on Dietary Fiber Fractions and Antinutritional Factors of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 52 (2):261–266.
- Morros, M.E., D. Pérez y P. Rodríguez. 2004. La chivata, una especie leguminosa subutilizada. *Leisa Rev. Agroecol.* 20(1):23-34.
- Osman, M. 2007. Changes in nutrient composition, trypsin inhibitor, phytate, tannins and protein digestibility of *Dolichos lablab* Seeds [*Lablab Purpureus* (L) Sweet] occurring during germination. *J. Food Technol.* 5(4):294-299.
- Paredes-López, O., G.I. Harry and J. Gonzalez-Castañeda. 1990. Sensory Evaluation of Tempeh Produced by Fermentation of Common Beans. *J. Food. Sci.* 55(1):123-126.
- Porres, J.M., P. Aranda, M. Lopez-Jurado y G. Urbano. 2003. Effect of natural and controlled fermentation on chemical composition and nutrient dialyzability from beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 51(17):5144-5149.
- Quintana, E. 2001. Las leguminosas en la alimentación venezolana durante cinco décadas (1945-1997). *Rev. Esp. Nutr. Comunitaria.* 7(3-4): 70-77.
- Ragaei, S.M., A.A. El-Banna and A.A. Damir. 1985. Natural lactic acid fermentation of lentils. *Alex Sci. Exch.* 7(2): 217-224.
- Ramakrishna, V., P. Jhansi Rani and P. Ramakrishna Rao. 2006. Antinutritional factors during germination in Indian Bean (*Dolichos lablab* L.) seeds. *World J. of Dairy & Food Sci.* 1(1):6-11.
- Rodríguez-Burger, A.P., A. Mason y S. Nielsen. 1998. Use of fermented black beans combined with rice to develop a nutritious weaning food. *J. Agric. Food Chem.* 46(12):4806-4813.
- Sathe, S. 2002. Dry bean protein functionality. *Crit. Rev. Biotech.* 22(2):175-223.
- Schnürer, J. y J. Magnusson. 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Tech.* 16:70-78.
- Tabera, J., J. Frías, I. Estrella, R. Villa y C. Vidal-Valverde. 1995. Natural fermentation of lentil. Influence of time, concentration and temperature on protein content, trypsin inhibitor activity and phenolic compound content. *Z Lebensm. Unters. Forsch.* 201: 587-591.
- Wong, K. y P. Cheung. 1998. Nutritional assessment of three chinese indigenous legumes in growing rats. *Nutr. Res.* 18(9): 1573-1580.