



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



**DESARROLLO DE UN PROCESO ORIENTADO
A LA MEJORA DEL PERFIL NUTRICIONAL Y
DIGESTIBILIDAD DE HARINA DE LENTEJA**

GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL
TRABAJO FIN DE GRADO

ALUMNO: Marina I. Vela Gisbert

TUTOR/A: Ana María Andrés Grau

COTUTOR/A: Ana Belén Heredia Gutiérrez

DIRECTOR EXPERIMENTAL: Andrea Asensio Grau

Curso académico: 2019/2020

Valencia

Enero del 2020

DESARROLLO DE UN PROCESO ORIENTADO A LA MEJORA DEL PERFIL NUTRICIONAL Y DIGESTIBILIDAD DE HARINA DE LENTEJA.

Vela, M., Asensio-Grau, A.¹, Heredia, A.¹, Andrés, A.¹

RESUMEN

En los últimos años se ha mostrado un gran interés en el uso de fuentes de proteína vegetal, como alternativa a la de origen animal, no sólo por su precio sino también por contribuir a una mayor sostenibilidad ambiental. Las legumbres son un alimento con un alto valor nutricional y son esenciales para el seguimiento de una dieta equilibrada. Actualmente, la lenteja es una de las más consumidas ya que presenta un mayor contenido proteico frente a otras legumbres. No obstante, su digestibilidad está limitada por la presencia de factores anti nutricionales (FAN). Sin embargo, el procesamiento de los alimentos puede tener un gran impacto en la bioaccesibilidad de nutrientes, e incluso reducir el contenido de los FAN. Por ello, el objetivo de este trabajo es desarrollar un proceso orientado a mejorar el perfil nutricional y la digestibilidad de la harina de lentejas. El proceso que se plantea desarrollar está basado en operaciones de fermentación fúngica en estado sólido. Para evaluar el efecto de la fermentación en la digestibilidad de la harina de lentejas se utilizó un modelo de digestión *in vitro* estático. Se observó un incremento en proteína (18,5 %) y compuestos fenólicos (50%) y una disminución en carbohidratos (6%). En cuanto a la digestibilidad, el proceso de fermentación hidroliza parcialmente la proteína haciéndola más bioaccesible y en el caso de los carbohidratos, se observó un aumento de la fracción de almidón resistente, lo que en conjunto se traduciría en un menor índice glicémico de la harina fermentada.

PALABRAS CLAVE: legumbres, lenteja, *Pleurotus ostreatus*, fermentación, actividad antioxidante, polifenoles, digestión *in vitro*, proteólisis, glucólisis.

ABSTRACT

In recent years, a great interest has been shown in the use of vegetable protein sources, as an alternative to that of animal origin, not only for its price but also for contributing to greater environmental sustainability. Legumes are a food with a high nutritional value and are essential for following a balanced diet. Currently, lentil is one of the most consumed since it has a higher protein content compared to other legumes. However, its digestibility is limited by the presence of anti-nutritional factors (FAN). In this sense, food processing can have a great impact on the bioaccessibility of nutrients, and even reduce the content of FAN. Therefore, the objective of this work is to develop a process aimed at improving the nutritional profile and digestibility of lentil flour. The process consists of solid-state fungal fermentation. The effect of fermentation

¹ Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IU-IAD). Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia.

on lentil flour digestibility was evaluated using a static in vitro digestion model. As a result of fermentation, an increase of protein (18,5 %) and phenolic compounds (50 %), and also a decrease on carbohydrates (6 %) were observed. Regarding nutrients digestibility, the fermentation process partially hydrolysed the protein making it more bioaccessible. In case of carbohydrates, a raise on the resistant starch due to the fermentation resulting in a lentil flour with a lower glycemic index.

KEY WORDS: legumes, lentils, *Pleurotus ostreatus*, fermentation, antioxidant activity, polyphenols, in vitro digestion, proteolysis, glycolysis.

RESÚM

En els últims anys s'ha mostrat un gran interès en l'ús de fonts de proteïna vegetal, com a alternativa a la d'origen animal, no sols pel seu preu sinó també per contribuir a una major sostenibilitat ambiental. Els llegums són un aliment amb un alt valor nutricional i són essencials per al seguiment d'una una dieta equilibrada. Actualment, la llentilla és una de les més consumides ja que presenta un major contingut proteic enfront d'altres llegums. No obstant això, la seua digestibilitat està limitada per la presència de factors anti nutricionals (FAN). En aquest sentit, el processament dels aliments pot tindre un gran impacte en la bioaccessibilitat de nutrients, i fins i tot reduir el contingut dels FAN. Per això, l'objectiu d'aquest treball és desenvolupar un procés orientat a millorar el perfil nutricional i la digestibilitat de la farina de llentilles. El procés que es planteja desenvolupar està basat en operacions de fermentació fúngica en estat sòlid. Per a avaluar l'efecte de la fermentació en la digestibilitat de la farina de llentilles es va utilitzar un model de digestió in vitro estàtic. Es va observar un increment en proteïna (18,5%) i compostos fenòlics (50%) i una disminució en carbohidrats (6%). Respecte a la digestibilitat, el procés de fermentació va hidrolitzar parcialment la proteïna fent-la més bioaccessible i en el cas dels carbohidrats, es va observar un augment de la fracció de midó resistent, la qual cosa en conjunt es traduiria en un menor índex glicèmic de la farina fermentada.

PARAULES CLAU: llegums, lleties, *Pleurotus ostreatus*, fermentació, activitat antioxidant, polifenols, digestió in vitro, proteòlisi, glicòlisi

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	4
2.1 Objetivos	4
2.2 Plan de trabajo	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS	5
3.1 Materia prima e inóculo.....	5
3.2 Reactivos químicos o bioquímicos	5
3.3 Fermentación fúngica en estado sólido	5
3.3.1 Obtención del cultivo iniciador.....	5
3.3.2 Proceso fermentativo.....	6
3.4 Estudio, in vitro, de digestibilidad de las harinas de lenteja.....	7
3.5 Determinaciones analíticas	9
3.5.1 Contenido en humedad, proteína, grasa y fibra.....	9
3.5.2 Color.....	9
3.5.3 Capacidad de retención de agua (CRA).....	9
3.5.4 Índice de absorción de lípidos (IAL).....	10
3.5.5 Tamaño de partícula.....	10
3.5.6 Proteólisis.....	10
3.5.7 Glucólisis.....	10
3.5.8 Polifenoles.....	11
3.5.9 Actividad antioxidante.....	11
3.5.10 Análisis estadístico.....	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1 impacto de la fermentación en las características de la harina de lenteja.....	13
4.2 Impacto de la fermentación en la digestibilidad de la harina de lenteja.....	17
4.2.1 Impacto de la fermentación en la digestibilidad de las proteínas.....	17
4.2.2 Impacto de la fermentación en la digestibilidad de carbohidratos.....	19
4.2.3 Impacto de la fermentación en contenido de fenoles y la actividad antioxidante..	21
5. CONCLUSIONES	22
6. BIBLIOGRAFÍA	23

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición, para un volumen final de 1 L, de las disoluciones stock para posterior preparación de los fluidos digestivos.....	8
Tabla 2. Ejemplo de un experimento de digestión in vitro.....	8
Tabla 3. Índice de Absorción de Aceite (IAA) y Capacidad de Retención de Agua (CRA) en harina de lenteja antes (control) y después de la fermentación.....	15
Tabla 4. Coordenadas de color de las harinas de lenteja.....	16
Tabla 5. Composición nutricional de las harinas de lenteja.....	16
Tabla 6. Actividad antioxidante y contenido en polifenoles de las harinas de lenteja.....	17
Tabla 7. Fracciones de almidón digerible para la harina fermentada y la harina control.....	20
Tabla 8. Efecto de la fermentación en la actividad antioxidante y en el contenido total de polifenoles medidos en la fracción micelar del digerido después de la digestión gastrointestinal.....	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Placa Petri sembrada con <i>Pleurotus ostreatus</i> después de 7 días de incubación a 28 °C.	6
Figura 2. Caldo de cultivo inoculado con <i>Pleurotus ostreatus</i> tras 1 día (izquierda) y 14 días (derecha) de incubación a 28°C.....	6
Figura 3. Evolución del proceso fermentativo de las lentejas a diferentes tiempos de incubación a 28 °C. A: 5 días en la cámara de incubación, B: 7 días en la cámara de incubación y C:14 días en la cámara de incubación.....	7
Figura 4. Distribución del tamaño de partícula de la harina fermentada y la harina control.....	13
Figura 5. Cambios en el color de las harinas de lenteja. Izquierda: harina control. Derecha: harina fermentada.....	14
Figura 6. Extensión de la proteólisis (g de proteína soluble en TCA/ 100 g proteína en b.s.) de la harina control y de la harina fermentada a lo largo de la simulación in vitro de la digestión gastrointestinal.....	18
Figura 7. Extensión de la glucólisis (g glucosa libre/ g almidón inicial) de la harina control y de la harina fermentada durante la digestión in vitro gastrointestinal.....	20

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha incrementado la preocupación sobre el impacto medioambiental que produce la ganadería, lo que ha conllevado a que un mayor número de personas adopten una alimentación vegana. Así pues, existe un creciente interés en la búsqueda de fuentes alternativas a las proteínas de origen animal convencionales impulsado principalmente por la sostenibilidad ambiental y principios éticos. En este contexto, las proteínas de origen vegetal, y más concretamente las de las legumbres, se presentan como una fuente sostenible desde un punto de vista medioambiental. Su cultivo fomenta la agricultura sostenible al presentar baja demanda hídrica y contribuir a la mitigación del cambio climático por su capacidad para fijar el nitrógeno y mejorar la fertilidad del suelo y reducir la huella del carbono. Asimismo, son una fuente de proteína dietética de bajo coste y presentan una mayor aceptabilidad por ejemplo que las proteínas de insecto, al estar más arraigadas a nuestra cultura y hábitos culinarios.

Las legumbres son una parte fundamental de la dieta humana y destacan por sus proteínas de alto valor biológico ya que presentan aminoácidos esenciales, así como otros nutrientes necesarios para el organismo. El consumo de legumbres está asociado con la mejora de la salud cardiovascular (reducción de presión sanguínea, tejido adiposo y colesterol), disminución de obesidad (incrementa la saciedad), prevención de diabetes (regulación de las hormonas digestivas) y la mejora de la salud gastrointestinal (presencia de fibra insoluble) (Delgado-Andrade et al., 2016). Sin embargo, pese a los efectos saludables derivados de su consumo, se ha producido un abandono progresivo en los últimos años. Algunos inconvenientes que dificultan su consumo incluyen que requieren largos tiempos de cocinado, pueden causar flatulencia y en algunos casos, maldigestión (Bressani, 1993).

Entre las legumbres, las lentejas (*Lens culinaris*) se encuentran entre las más consumidas y ocupan el cuarto lugar en volumen de producción mundial (Longobardi et al., 2017). Al igual que la mayoría de las legumbres, a excepción de la soja, la lenteja es una rica fuente de proteínas, que tiene entre 21 y 31% (base seca) (Urbano et al., 2007). Las proteínas de las lentejas son principalmente proteínas de almacenamiento y se clasifican como albúminas, globulinas y glutelinas, de acuerdo con su comportamiento a la solubilidad en agua (Kiosseoglou y Paraskevopoulou, 2011). Las proteínas de las leguminosas son ricas en lisina, pero deficientes en aminoácidos que contienen azufre (cisteína, metionina y triptófano) (Eggum y Beame, 1983). También son fuentes de almidón, fibra dietética, ácidos grasos poliinsaturados, compuestos antioxidantes, vitaminas y minerales que incluyen ácido fólico, tiamina y riboflavina (Adsule et al., 1989; Jood et al. 1998; Repo-Carrasco-Valencia y Serna, 2011). Por lo tanto, son componentes importantes de una dieta saludable y particularmente relevantes para aquellos individuos que presentan necesidad de incrementar la ingesta de proteínas en su dieta, como pueda ser el caso de deportistas o personas de edad avanzada, entre otros colectivos. Sin embargo, su calidad nutricional está limitada por la presencia de factores antinutricionales (FAN) lábiles al calor y estables al calor que exhiben efectos fisiológicos indeseables (Pusztai et al., 2004). Los FAN son compuestos estructuralmente diferentes pero susceptibles de ser clasificados en dos categorías: proteínas (como lectinas e inhibidores de proteasas) y otros, fitatos, taninos o pro-antocianidinas, oligosacáridos, saponinas y alcaloides (Astiasarán y Martínez, 2000). Los inhibidores de tripsina son proteínas de bajo peso molecular capaces de unirse e inactivar la enzima digestiva, la tripsina, disminuyendo la digestibilidad de la proteína (Dave Oomah et al., 2011, Astiasarán y Martínez, 2000). El ácido fítico o fitatos reducen la biodisponibilidad de minerales (Reddy et al., 1988). Los taninos, a pesar de ser compuestos fenólicos, presentan un efecto negativo, ya que se unen a las proteínas a través de su enlace con el hidrógeno y las

interacciones hidrófobas, inhibiendo la acción de las enzimas digestivas (Quesada et al. 1995) y reduciendo así su calidad nutricional (Hahn et al., 1984). La presencia, distribución e impacto negativo de la ingestión de FAN en materias primas vegetales ha sido ampliamente estudiado (Grant, 1991). De hecho, es bien sabido que el procesamiento de alimentos puede tener un marcado efecto sobre la biodisponibilidad de nutrientes dado que los mismo pueden reducir el contenido y naturaleza de los FAN. Estos tratamientos pueden implicar la aplicación de calor (incluyendo tostado, secado, freír, hornear o hervir), ser de naturaleza mecánica como la molienda, o pueden implicar un remojo, germinación o fermentación microbiana. La molienda da como resultado una disminución del tamaño de partícula de las estructuras nativas de los alimentos sólidos y puede promover una mejora en la digestibilidad. La molienda facilita la permeabilidad de los alimentos a los fluidos digestivos y, por lo tanto, la hidrólisis de los macronutrientes por parte de las enzimas digestivas. En cuanto al remojo o la germinación de las legumbres, estos procesos inducen la hidrólisis de los fitatos para reducir los fosfatos de inositol y, por lo tanto, aumentan la biodisponibilidad de zinc, hierro y calcio, la solubilidad de los polifenoles y la digestión de carbohidratos (Martínez Villaluenga et al., 2010; Pajak et al., 2019). Por su parte la fermentación permite (i) enriquecer sustratos en compuestos funcionales, como péptidos bioactivos de bajo amargor, vitaminas o fenólicos; (ii) aumentar el contenido en proteínas mediante el crecimiento de proteína unicelular (biomasa) (Zannini et al., 2012) y su digestibilidad como consecuencia de la actividad metabólica del hongo (Bustos et al., 2017), así como (iii) disminuir el contenido en antinutrientes. La fermentación puede llevarse a cabo en estado líquido y sólido. Así, la fermentación en estado sólido consiste en el crecimiento microbiano y la formación de productos en partículas sólidas en ausencia (o casi ausencia) de agua, pero con la humedad suficiente del sustrato para permitir el crecimiento y metabolismo del microorganismo (Pandey, 2003).

La fermentación en estado sólido ofrece numerosas ventajas frente a la fermentación en estado líquido ya que es una técnica más simple y que implica un menor coste. Asimismo, esta técnica también permite una mayor productividad, una mejor oxigenación del medio y representa una aproximación más exacta al hábitat natural para multitud de microorganismos (Rodríguez y Sanromán). La fermentación en estado sólido ha sido aplicada anteriormente a frijoles (Espinosa-Páez et al., 2017; Worku, & Sahu, 2017), lentejas (Torino et al., 2013), guisantes (Ma et al., 2018), soja (Lee et al., 2019) o quinoa (Li et al., 2018; Starzyńska-Janiszewska et al., 2019), entre otras legumbres y cereales en el ámbito alimentario. De igual forma, La fermentación en estado sólido también se ha utilizado para la valorización de subproductos agro-industriales ricos en carbohidratos complejos no fermentables como la lignocelulosa (Vassilev y De Oliveira-Mendes, 2018). Por lo tanto, la fermentación en estado sólido podría aplicarse como parte de un proceso de múltiples etapas, incluidas las operaciones de la unidad de estabilización (como la molienda o el secado, entre otros), para obtener harinas prometedoras y confiables de las lentejas para productos funcionales ricos en proteínas basados en lentejas. La obtención de harinas de legumbres con un perfil nutricional y digestibilidad mejorados, permitiría ampliar la oferta de productos de funcionales ricos en proteínas no animales.

Existen diferentes microorganismos que se utilizan para la fermentación en estado sólido de alimentos: las bacterias, las levaduras y los hongos (Rodríguez y Sanromán., 2006). Es muy frecuente llevar a cabo la fermentación con especies de bacterias del género *Lactobacillus*. Algunos autores han estudiado el efecto de la fermentación en judías verdes utilizando la cepa *Lactobacillus cellobiosis* (Chen et al. 1983), pero la fermentación resultó en un producto final muy ácido. La cepa de levadura más conocida por su utilización en la fermentación de cerveza, vino y pan es la *Saccharomyces cerevisiae*. No obstante, esta también ha sido utilizada en la fermentación de granos de cacao (Visintin et al. 2017). Respecto a los hongos, los que se utilizan con más frecuencia para este fin son del género *Aspergillus*, por ejemplo, el *Aspergillus Oryzae* que se ha utilizado para la fermentación del sorgo y harina de guisantes (Kumitch et al. 2020) y

el *Rhizopus*, el *Rhizopus oligosporus* que se ha utilizado para la fermentación de granos de soja, semillas de mijo y cacahuets (Egounlety & Aworh.,2003). También existe un grupo de hongos que son comestibles y forman parte de la dieta humana como por ejemplo el *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus sajor-caju* y el *Lentinus edodes*, aunque estos no se utilizan frecuentemente en la fermentación de alimentos. El hongo *Pleurotus ostreatus*, es el más utilizado para la revalorización de subproductos de la industria agroalimentaria ya que puede utilizar como sustrato diversos materiales lignocelulósicos (Kulkarni et al 2020. ; Reddy et al. 2003) . Este hongo es una seta comestible de alto valor nutricional, ya que es bajo en calorías y grasas, pero posee ácidos grasos y aminoácidos esenciales, así como vitaminas y minerales (Agrahar-Murugkar y Subbulakshmi, 2005; Sanmee et al., 2003). De acuerdo con Jayakumar et al., 2009, el *Pleurotus ostreatus* también presenta compuestos bioactivos como compuestos fenólicos, y otros componentes como el ácido ascórbico, el α -tocoferol, el β -caroteno y compuestos flavonoides (rutina y crisina). Asimismo, el hongo *Pleurotus ostreatus* posee la capacidad de deslignificar el material vegetal del sustrato, facilitando su degradación (Tripathi y Yadav, 2015). Atendiendo a la capacidad fermentativa del hongo y a su composición nutricional se plantea su utilización como agente potenciador de las propiedades nutricionales y digestivas de legumbres.

Pese a los potenciales beneficios en cuanto a perfil nutricional y efectos sobre la salud derivados de la utilización de harinas fermentadas, el proceso de digestión será el que, eventualmente, determine el grado de digestibilidad y bioaccesibilidad de los componentes de las mismas. Actualmente, existen diferentes técnicas que permiten estudiar el comportamiento gastrointestinal de los alimentos, así como la influencia que tienen ciertos procesos, como la fermentación, en la digestibilidad de los macronutrientes de un alimento. Entre estos, los métodos de digestibilidad in vitro son los más utilizados ya que tienen la ventaja de ser rápidos, económicos y sin las restricciones éticas que conllevarían los estudios in vivo. (Minekus et al., 2014). Además, estos se caracterizan por ser muy eficaces a la hora de simular los procesos de digestión que ocurren en el cuerpo humano, imitando las condiciones fisiológicas in vivo y teniendo en cuenta distintos factores como las enzimas digestivas, el pH, el tiempo de digestión.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1 Objetivos

Actualmente, existe una demanda creciente por parte del mercado de fuentes de proteína alternativas a las de animales. Este interés está impulsado por la sostenibilidad ambiental, el bajo coste y la seguridad alimentaria.

En este contexto, el objetivo general del trabajo es el desarrollo de un proceso basado en la fermentación en estado sólido con *Pleurotus ostreatus* orientado a la mejora del perfil nutricional y digestibilidad de harina de lentejas, con vistas a obtener fuentes de proteína alternativas y sostenibles para el enriquecimiento proteico de alimentos, así como al desarrollo de alimentos con legumbres de digestibilidad mejorada.

Para la consecución de este objetivo general se plantean distintos objetivos específicos:

1. Evaluar el impacto de la fermentación en los macronutrientes de la harina de lentejas: proteínas, carbohidratos y lípidos.
2. Evaluar el impacto de la fermentación en las propiedades físicas de la harina de lentejas: color, tamaño de partícula, capacidad de retención de agua e índice de absorción de lípidos.
3. Evaluar el impacto de la fermentación en la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles de la harina de lentejas.
4. Evaluar el impacto de la fermentación en la digestibilidad de proteínas y carbohidratos en la harina de lentejas.
5. Evaluar el impacto de la fermentación en la bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes y polifenoles de la harina de lentejas.

2.2 Plan de trabajo

1. Estandarización del tratamiento de esterilización de las lentejas previa al proceso de fermentación en estado sólido.
2. Siembra e incubación del hongo para obtención del inóculo iniciador del proceso de fermentación.
3. Inoculación y fermentación en estado sólido de las lentejas.
4. Obtención de harinas de lenteja mediante secado y molienda de los sustratos fermentados.
5. Caracterización de las harinas de lenteja fermentada en cuanto a su contenido en humedad y de macronutrientes: proteínas, carbohidratos y lípidos; así como en cuanto a sus propiedades físicas: color, tamaño de partícula, capacidad de retención de agua e índice de absorción de lípidos.
6. Determinación de la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles en las harinas de lenteja fermentadas
7. Digestión in vitro de las harinas de lenteja con seguimiento de la digestibilidad de las proteínas y carbohidratos, así como de la bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes y polifenoles totales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materia prima

Para este estudio, se utilizó lenteja (*Lens culinaris*) de la variedad Castellana procedente de Canadá y adquirida en un supermercado de la ciudad de Valencia (España). La cepa *Pleurotus ostreatus* fue adquirida en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (20311/ Lote 18-10-2016) (Universidad de Valencia, Valencia, España).

3.2 Reactivos químicos o bioquímicos

Los reactivos empleados para formular el medio de cultivo fueron de extracto de levadura, de malta, glucosa y agar, todos ellos suministrados por Scharlau (Spain).

Para la realización de los fluidos digestivos, se emplearon los productos nombrados a continuación: pepsina obtenida de mucosa gástrica porcina (2500 U/ g proteína), extracto de bilis bovina, pancreatina bovina, KCl, KH_2PO_4 , NaHCO_3 , NaCl, $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ y CaCl_2 , todos ellos adquiridos en Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), y NaOH y HCl obtenidos en AppliChem Panreac (USA).

Para las determinaciones analíticas, se utilizaron los siguientes reactivos: CH_3OH , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, seroalbúmina bovina, ácido gálico, $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$ (Trolox), $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_6$ (DPPH), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_6$ (TPTZ), $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$, $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{S}_4$ (ABTS), $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, ácido tricloroacético (TCA), ácido dinitrosalicílico (DNS), glucosa, tartatro N-K e invertasa, todos ellos obtenidos de Sigma-Aldrich (Spain), además de EDTA y urea cristalina para análisis (ACS), adquiridos en AppliChem Panreac (USA). Amiloglucosidasa fue adquirida en Megazyme (E-AMGDF, Megazyme, Ireland).

3.3 Fermentación fúngica en estado sólido

3.3.1 Obtención del cultivo iniciador

Para la recuperación de la cepa *Pleurotus ostreatus*, se tomaron colonias aisladas del cultivo en placa facilitado por la CECT, éstas se sembraron en placas Petri con medio de cultivo compuesto por 0,4% de extracto de levadura, 0,1% de extracto de malta, 0,4% de glucosa y 1,5% de agar (Espinosa-Páez et al., 2017) y se incubaron durante 14 días a 28 °C (Selecta J.P. 200207). Una vez obtenido el micelio, se inoculó con un asa de siembra el medio líquido (0,4% de extracto de levadura, 0,1% de extracto de malta y 0,4% de glucosa) y de nuevo se incubó a 28 °C hasta obtener una cantidad final de biomasa seca de 100 mg en 100 mL de caldo. La biomasa se determinó de la siguiente manera: se pesaron tres placas Petri vacías con papel de filtro. A continuación, se filtró el contenido del matraz mediante un embudo provisto del filtro de papel correspondiente con el fin de separar el micelio de la fase líquida. Posteriormente, se colocó el filtro con el micelio obtenido en la placa Petri vacía y se introdujo en la estufa de secado durante 48 horas hasta eliminar toda el agua. Con la diferencia de peso seco y el de la placa con filtro vacío se estimó el peso seco de micelio obtenido tras 14 días de incubación del caldo de cultivo.

La **Figura 1**, muestra la placa Petri sembrada con el micelio del hongo tras 7 días de incubación a 28 °C. La **Figura 2** muestran el caldo de cultivo inoculado con el hongo tras 1 y 14 días de incubación.



Figura 1. Placa Petri sembrada con *Pleurotus ostreatus* después de 7 días de incubación a 28 °C.

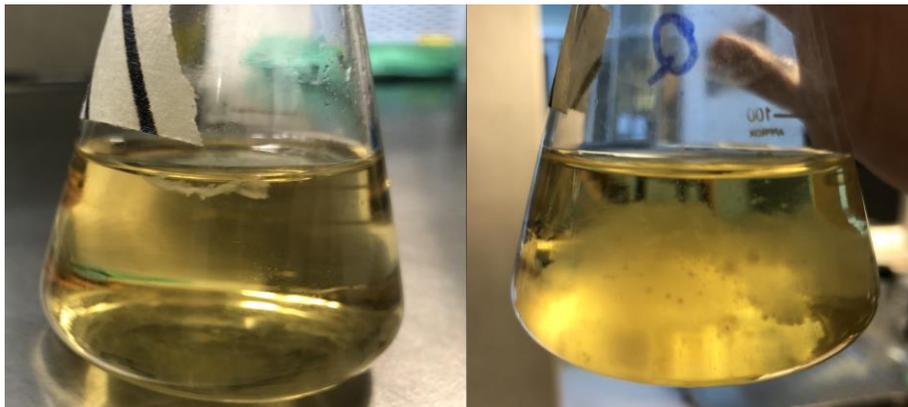


Figura 2. Caldo de cultivo inoculado con *Pleurotus ostreatus* tras 1 día (izquierda) y 14 días (derecha) de incubación a 28 °C.

3.3.2 Proceso fermentativo

Las lentejas se sometieron a una fermentación fúngica en estado sólido de acuerdo a Espinosa-Páez et al. (2017) con ligeras modificaciones. Así, las semillas de lenteja se autoclavarón en tarros de cristal a 121°C durante un tiempo de 20 min y relación lentejas: agua destilada (p:v) de 1:0,74.

Una vez esterilizadas las lentejas, éstas se inocularon con 8 mL de medio de cultivo líquido, previa homogeneización del mismo en vórtex (Heidolph, Reax top), y los frascos de vidrio se llevaron a incubación a 28 °C durante 14 días, tiempo durante el cual tuvo lugar la fermentación. Durante este periodo, se realizó un seguimiento visual de la evolución del sustrato (lentejas) y del crecimiento del hongo. La fermentación de cada bote se interrumpió cuando visualmente se verificó que las lentejas estaban totalmente cubiertas de micelio blanco. Se abrieron los botes y se dispusieron las lentejas fermentadas en bandejas metálicas y se procedió a su estabilización

por secado por aire caliente en una estufa (Selecta J.P. 200207) durante 48 horas. Una vez deshidratadas, se procedió a la molienda durante 1 minuto, a velocidad máxima en Termomix (modelo Tm.31).

En la **Figura 3** se puede observar la evolución del proceso fermentativo.

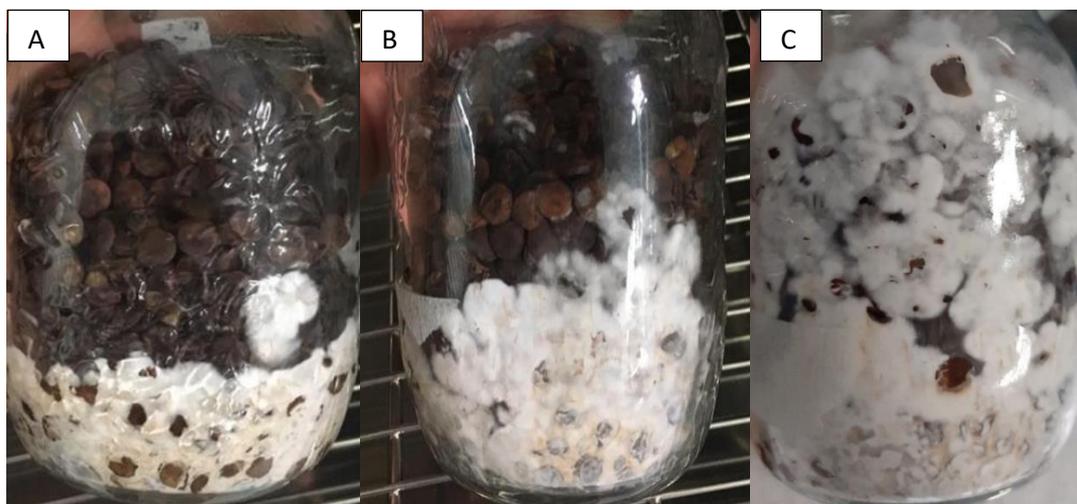


Figura 3. Evolución del proceso fermentativo de las lentejas a diferentes tiempos de incubación a 28 °C. A: 5 días en la cámara de incubación, B: 7 días en la cámara de incubación y C: 14 días en la cámara de incubación.

3.4 Proceso de digestión *in vitro*

La digestión *in vitro* de la harina fermentada y la harina control se llevaron a cabo utilizando un sistema de digestión estático de acuerdo con el protocolo internacional INFOGEST Cost Action (Minekus et al., 2014). La digestión *in vitro* consistió en simular las tres etapas de digestión: oral, etapa gástrica e intestinal. Para llevar a cabo la digestión gastrointestinal se prepararon las disoluciones stock para formular los fluidos digestivos simulados (salival, gástrico e intestinal) (**Tabla 1**). Las disoluciones stock se prepararon semanalmente y a partir de las mismas se prepararon a diario según lo especificado en la **Tabla 2** y añadiendo las enzimas necesarias para cada etapa, así como las sales biliares en la etapa intestinal. Se describe a continuación los detalles de la simulación de cada una de las etapas:

- a) **Etapa oral:** La etapa oral se llevó a cabo mezclando 5 gramos de cada harina, control y fermentada, con 5 mL de fluido salivar procedente de individuos sanos, bajo su consentimiento. Las mezclas, que constituyen el bolo oral, se homogeneizaron en el vortex (Heidolph, Reax top) durante 30 segundos y se esperó 3 minutos antes de proceder a la etapa gástrica.
- b) **Etapa gástrica:** La etapa gástrica se llevó a cabo mezclando los 10 mL del bolo oral de cada muestra con 10 mL de SGF (fluido gástrico), se midió el pH y se rectificó con HCl (1M) hasta llegar a $\text{pH } 2,8 \pm 0,1$. La concentración de pepsina del SGF fue de 2000 U/mL. A continuación, la mezcla se mantuvo durante 2 horas en una cámara

termostáticamente controlada (Selecta, España) a 37 ° C acoplada a un agitador (Intelli-Mixer RM 2, Elmi Ltd., Báltico y Rusia) a una velocidad de 55 rpm y movimientos rotatorios. El pH fue medido cada 30 minutos y reajustado cuando fue necesario.

- c) **Etapas intestinal:** La etapa intestinal se llevó a cabo después de los 120 minutos de etapa gástrica, mezclando los 20 mL del quimo gástrico con 20 mL de SIF (fluido intestinal). A continuación, se ajustó el pH a $7,0 \pm 0,1$ con NaOH 1M. La concentración de pancreatina fue 100 U/mL y de sales biliares fue de 10 mM.

Después de la digestión, las muestras digeridas se introdujeron en un congelador (Akralab, LTF40SD) a -20 °C para su posterior análisis. Se realizaron tres ensayos de digestión para una de las harinas.

Tabla 1. Composición, para un volumen final de 1 L, de las disoluciones stock para posterior preparación de los fluidos digestivos.

Reactivos	SGS pH 3 (mL)	SIS pH 7 (mL)
KCl	13,8	13,6
KH ₂ PO ₄	1,8	1,6
NaHCO ₃	25	95
NaCl	23,6	18,3
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,8	2,2
(NH ₄) ₂ CO ₃	1	-
Ajuste de pH		
NaOH (1N)	-	-
HCl (6N)	2,6	1,4
H ₂ O	931,4	867,9

SGS: stock gástrico simulado, SIS: stock intestinal simulado.

Tabla 2. Ejemplo de un experimento de digestión in vitro.

	Etapa de Digestión			
	Oral (FSS)	Gástrica (FGS)	Intestinal (FIS)	
Alimento o digerido	5 g alimento	10 mL bolo alimenticio	20 mL quimo	
Disolución stock (SSS, SGS, SIS) (mL)	*	7,5	11	
CaCl ₂ (H ₂ O) (0,3 M) (mL)	-	0,005	0,04	
Enzimas	Amilasa salivar	Pepsina Porcina	Pancreatina Bovina	Sales biliares
Actividad enzimática (U/mL) o concentración biliar (mM) en el total digerido (volumen final (mL) en cada etapa de la digestión).	-	2.000 U/mL	100 U/mL	10 mM
Volumen de solución enzimática/ solución de sales biliares añadida (mL)	-	2	5	2,5
Agua (mL)	-	0,295	1,31	
HCl (1 N) para ajustar el pH (mL)	-	0,2	-	
NaOH (1N) para ajustar el pH (mL)	-	-	0,15	
Volumen final (mL)	10	20	40	

* Se añadieron 5 ml de saliva de un individuo sano.

3.5 Determinaciones analíticas

3.5.1 Contenido en humedad, proteína y grasa

Para determinar el contenido en humedad de la harina de lenteja control y de la harina fermentada se utilizó el método oficial AOAC (2000). Para ello, se introdujeron las harinas en la estufa a 60 °C durante 48 horas y posteriormente en la estufa a vacío a 60 °C durante 48 horas hasta alcanzar peso constante. El contenido en humedad se calculó por la variación de masas de las harinas antes y después del secado. El contenido en proteínas de las harinas de lenteja se determinó mediante el método Kjeldahl según AOAC (2000). El contenido en lípidos de las harinas de lenteja se determinó por el método de Soxhlet (AOAC, 2000) que consiste en una extracción de la grasa de la muestra con éter de petróleo. El contenido en carbohidratos se estimó por balances teniendo en cuenta el contenido en proteína, grasa y cenizas.

3.5.2 Color

Se evaluó la diferencia en el color (ΔE) entre las harinas a partir de las coordenadas en el espacio CIELAB. Las muestras de harina se introdujeron en las cubetas en un colorímetro (CR-400, Konika Minolta Sensing, Japón) y se midieron las coordenadas en el espacio CIELAB (a^* , b^* , L^*). Las medidas se realizaron por triplicado tanto en la harina control como en la fermentada. A partir de las coordenadas se estimó la diferencia global de color entre las harinas (ΔE) (Gilabert, 2002) mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta a^* + \Delta b^* + \Delta L^*} \quad \text{Ecuación 1}$$

3.5.3 Capacidad de retención de agua (CRA)

La capacidad de retención de agua (CRA) es un indicador del volumen de agua que la matriz del alimento puede retener. Para poder estimar el CRA se colocó 1 g de muestra en un tubo de centrífuga y se añadió agua en exceso (6 mL). Posteriormente, se homogenizó durante 1 minuto con el vórtex (Heidolph, Reax top) y se centrifugaron los tubos a 3200 rpm a 24 °C y durante 30 minutos. Por último, se midió el volumen de agua no retenida. Para el cálculo de CRA se empleó la siguiente ecuación (Bermúdez, 1994; Granito et al., 2009):

$$CRA = \frac{V_{\text{agua retenida}}}{m_{\text{muestra}}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde $V_{\text{agua retenida}}$ es el volumen de agua que retiene la muestra (mL) y m_{muestra} es la masa de la muestra que retiene dicha cantidad de agua (g).

3.5.4 Índice de absorción de lípidos (IAL)

El índice de absorción de lípidos (IAL) muestra el volumen de aceite que la matriz del alimento es capaz de absorber. Para poder calcular el IAL se pesó 1 g de harina en tubos falcon-15 y se agregó aceite en exceso (6 mL). A continuación, se agitó durante 1 minuto con el vórtex (Heidolph, Reax top) y se centrifugó a 3200 revoluciones por minuto, a 24°C y durante 30 minutos. Después, se midió el volumen de aceite no absorbido. Por último, se calculó el IAL mediante la siguiente ecuación (Bermúdez, 1994; Granito et al., 2009).

$$IAL = \frac{V_{\text{aceite absorbido}}}{m_{\text{muestra}}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde $V_{\text{aceite absorbido}}$ es el volumen de aceite que absorbe la muestra (mL) y m_{muestra} es la masa de la muestra que retiene dicha cantidad de aceite (g).

3.5.5 Tamaño de partícula

El tamaño de las partículas de las muestras de harina se determinó mediante un difractor láser modelo Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K), conectado a una unidad de manipulación de muestra Scirocco 2000 para vía seca. Esta técnica permite determinar la distribución de tamaños de partícula, representando el volumen que ocupa un determinado conjunto de partículas de un mismo tamaño con respecto al volumen del conjunto de partículas de los demás tamaños que componen la muestra.

3.5.6 Proteólisis

La proteólisis se determinó como proteína soluble en ácido tricloroacético (TCA) (Lamothe et al., 2014). Para ello, durante la digestión gástrica e intestinal de las harinas (control y fermentada) se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (0, 30, 60, 90 y 120 minutos) en las que se añadió una disolución de TCA hasta obtener una concentración final del 12% (p/p). A continuación, las muestras se agitaron con el vortex (Heidolph, Reax top), y se dejaron reposar durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 8000 rpm durante 15 minutos (Eppendorf, MiniSpin plus), se diluyeron en tampón (50 mM EDTA y 8 M Urea, a pH 10), y se midió la absorbancia de las mismas por espectrofotometría ultravioleta (Thermo scientific, modelo Helios Zeta UV/Vis) a una longitud de onda de 280 nm. Para la cuantificación de la proteína soluble en TCA, se realizó una recta de calibrado a partir de albúmina sérica bovina (BSA).

3.5.7 Glucólisis

Los azúcares liberados durante la digestión se determinaron como monosacáridos a partir del método colorimétrico del ácido dinitrosalicílico (DNS) después de una digestión secundaria con invertasa + amiloglucosidasa (Armellini et al., 2019). Durante la digestión gastrointestinal de las dos harinas (fermentada y control), se tomaron alícuotas de 1 mL a distintos tiempos de la etapa intestinal (0, 20 y 120 min) y se mezclaron con 4 mL de etanol durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, las muestras se centrifugaron a 1000 g-force durante 10 minutos a 20 °C. Se tomaron

50 µL de sobrenadante junto con 250 µL de una solución enzimática (amiloglucosidasa al 1% e invertasa al 1%) y 750 µL de una disolución de DNS (1% de glucosa, 1% de NaOH 1 M, 5% de DNS) en tubos de vidrio. Para que se lleve a cabo la reacción colorimétrica por parte del DNS los tubos se calentaron a 100 °C durante 15 minutos. Entonces, las muestras se enfriaron, se diluyeron en 5 mL de agua destilada y se midieron por espectrofotometría (Thermo scientific, modelo Helios Zeta UV/Vis) a una longitud de onda de 530 nm. La cuantificación de los azúcares liberados durante la digestión se realizó a partir de una recta patrón de glucosa.

El almidón de digestión rápida (ADR) se determinó a los 20 minutos de digestión intestinal, mientras que el almidón de digestión lenta (ADL) correspondió a los azúcares liberados después de 120 minutos de digestión intestinal. El almidón resistente a la digestión (ARD) es el almidón que no ha sido liberado en forma de glucosa y este se estimó como la diferencia entre la glucosa que forma el almidón total de la muestra y la glucosa liberada durante la digestión. Para ello, se determinó el almidón total de las dos harinas previamente a la digestión mediante una hidrólisis enzimática. Una muestra de 100 mg de harina se gelatinizó con 2 mL de dimetil sulfoxide a 100 °C durante 10 minutos y se digirió con 8 ml de tampón acetato con 0,1 mL de amiloglucosidasa durante 30 minutos a 37 °C (Mishra et al., 2007).

3.5.8 Polifenoles totales

Los polifenoles totales se cuantificaron en las dos muestras de harinas (fermentada y control) previamente y posteriormente a la digestión. Para ello, se realizó una extracción con metanol al 80% en proporción 1:10 (p/v) para las muestras de harinas. Para analizar los compuestos fenólicos tras la digestión gastrointestinal de las harinas, una vez termina la digestión se tomó una alícuota de la fracción líquida del digerido (a partir de ahora fracción bioaccesible o bioabsorbible), donde se encuentran los compuestos fenólicos liberados y se realizó una extracción con metanol al 80 % en una proporción de 1:20 (p/v). Durante la extracción las muestras se mantuvieron con el disolvente (metanol al 80 %) en agitación durante 2 horas a 55 rpm a 25°C (agitador Intelli-Mixer RM-2). A continuación, se centrifugaron durante 20 minutos a 14 g-fuerza y a una temperatura de 20°C. Por último, se recuperó el sobrenadante y se analizaron los polifenoles totales mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu de acuerdo con Chang et al., 2006. Para ello, se introdujeron 125 µL de extracto metanólico o agua, en el caso del blanco, en una cubeta, y se añadieron 0,5 ml de agua bidestilada y 125 µL de reactivo Folin-Ciocalteu. Después de 5 minutos de espera, se añadieron 1,25 mL de carbonato sódico al 7% (p/v), 1 mL de agua bidestilada y se dejó en reposo durante 30 minutos. Pasado el tiempo, se midió la absorbancia a 760 nm por espectrofotometría visible (espectrofotómetro UV-visible, Thermo Electron Corporation, USA). Para la cuantificación de los polifenoles totales se utilizó el ácido gálico como patrón de la recta.

3.5.9 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se determinó en las dos muestras de harinas (fermentada y control) previamente y posteriormente a la digestión en la fracción bioabsorbible. La extracción de los compuestos antioxidantes se realizó de la misma manera que para la determinación de polifenoles (3.5.8).

La actividad antioxidante se determinó en el extracto metanólico mediante tres métodos (Thaipong et al., 2006) que se describen a continuación:

a) FRAP

El método FRAP consiste en reducir el Fe^{3+} presente en el TPTZ a Fe^{2+} , cuanto mayor es la actividad antioxidante de la muestra, mayor es la cantidad de Fe^{3+} que se reduce. El complejo reducido presenta una coloración azul intensa que presenta su máxima absorción a 593 nm. Para la formación del radical libre Fe^{3+} se realizó una disolución 300 mM de tampón acetato, 10 mM de TPTZ (2, 4, 6- tripyridyl-s-triazina) y 20 mM de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ en proporción 10:1:1 respectivamente, y se mantuvo a 37 °C previamente a su uso.

Para realizar la determinación, se añadió en una cubeta 75 μ L de extracto y 2,925 mL del reactivo FRAP. Se mantuvo en reposo y oscuridad durante 30 minutos y se midió la absorbancia por espectrofotometría (Thermo scientific, modelo Helios Zeta UV/Vis) a 593 nm. Para poder cuantificar la actividad antioxidante se utilizó trolox, un análogo de la vitamina E.

b) DPPH

El ensayo DPPH consiste en la reducción del radical DPPH a DPPH-H. La solución DPPH de trabajo se realizó diariamente y para ello se preparó una disolución de DPPH en metanol al 80 % (0,035 g/L).

Para realizar la medida, se introdujeron en la cubeta espectrofotométrica 2,92 mL de DPPH y 75 μ L de extracto metanólico. A continuación, las muestras se mantuvieron en oscuridad durante 24 horas y posteriormente se midió la absorbancia a 515 nm por espectrofotometría (Thermo scientific, modelo Helios Zeta UV/Vis). Para la cuantificación de la actividad antioxidante se utilizó trolox como patrón de la recta.

c) ABTS

Este ensayo consiste en reducir el radical ABTS⁺ a partir de los compuestos antioxidantes de la muestra. Para la formación del radical ABTS⁺ se preparó una disolución de ABTS 7,4 mM y persulfato potásico 2,6 mM en proporción 1:1 y se mantuvo en oscuridad y a temperatura ambiente durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, se diluyeron 2 mL de la solución ABTS en 80 ml de metanol para obtener una absorbancia por espectrofotometría de $1,1 \pm 0,02$ a 734 nm.

Para realizar la medida, en una cubeta espectrofotométrica se añadieron 50 μ L de extracto metanólico y 2,85 mL de la solución ABTS, se dejó en reposo y oscuridad durante 2 horas y se midió la absorbancia a 734 nm por espectrofotometría (Thermo scientific, modelo Helios Zeta UV/Vis). Para la cuantificación de la actividad antioxidante se utilizó trolox como patrón de la recta.

3.5.10 Análisis estadístico

Con el fin de estudiar las posibles diferencias significativas entre las muestras se realizaron análisis de la varianza unifactoriales (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$). Para llevar a cabo los análisis se utilizó el programa Statgraphics Centurion XV. Todas las determinaciones analíticas se realizaron al menos por triplicado.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Impacto de la fermentación en las características de la harina de lenteja.

La **Figura 4** muestra los resultados de análisis del tamaño de partícula de la harina fermentada y de la harina control. El impacto de la fermentación en este parámetro se traduce en una ligera disminución, aunque estadísticamente significativa, del tamaño de partícula. Este cambio está probablemente relacionado con la degradación/ consumo del sustrato (lenteja) por parte del hongo utilizado en la fermentación, así como con los cambios microestructurales que pueden sufrir los gránulos de almidón como consecuencia de la fermentación. Los cambios en la microestructura del almidón durante los procesos de fermentación parecen estar asociados a los valores de pH que se alcanzan durante este proceso, pudiendo causar la solubilización y precipitación de proteínas en la superficie de los gránulos de almidón (Sotomayor, C et al. 1999; Frias et al.1996).

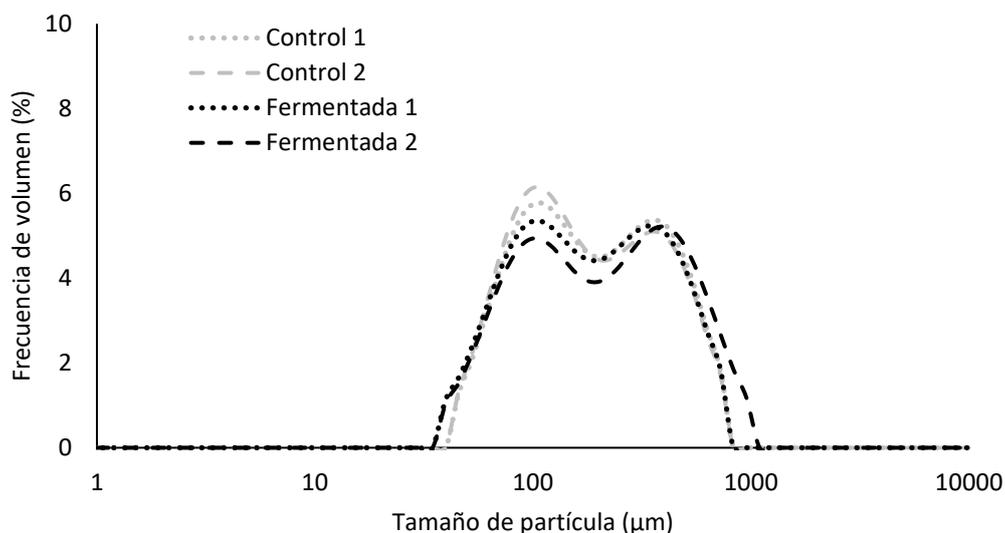


Figura 4. Distribución del tamaño de partícula de la harina fermentada y la harina control.

*Control 1 y 2 corresponden a la réplica 1 y 2 de la harina control dónde se han realizado múltiples repeticiones de cada réplica. Fermentada 1 y 2 corresponden a la réplica 1 y 2 de la harina fermentada dónde se han realizado múltiples repeticiones de cada réplica.

Los cambios de tamaño de partícula pueden implicar asimismo cambios en otras características, como por ejemplo en la capacidad de absorción de aceite (IAA) o en la capacidad de retención de agua (CRA), siendo estos parámetros tecnológicos de gran interés de cara al uso de estas harinas en el desarrollo de alimentos funcionales. En la **Tabla 3** se muestran los resultados de ambos parámetros, donde se puede apreciar que, a pesar de las diferencias en el tamaño de partícula, no se observan diferencias significativas en su capacidad de absorción de aceite y en su capacidad de retención de agua. Por tanto, puede decirse que la fermentación en estado sólido con *Pleurotus ostreatus* no implica cambios sustanciales en estas propiedades tecnológicas de la harina de lentejas al menos en las condiciones de fermentación utilizadas en este estudio.

Tabla 3. Índice de Absorción de Aceite (IAA) y Capacidad de Retención de Agua (CRA) en harina de lenteja antes (control) y después de la fermentación.

Muestra	IAA (ml aceite/g harina)	CRA (ml de agua / g harina)
Harina control	1,31 ± 0,02(a)	1,93 ± 0,17(a)
Harina fermentada	1,230 ± 0,114(a)	1,84 ± 0,07(a)

*(a-b): Existen diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto a las propiedades físicas (I.A.L y C.R.A) entre las dos harinas.

Sin embargo, la fermentación produjo cambios importantes en el color tal y como puede observarse tanto visualmente (**Figura 5**) como al medir las coordenadas de color (**Tabla 4**). La harina fermentada presenta un color más oscuro con un valor de ΔE de $8,2 \pm 0,9$ por lo que puede decirse que es un cambio de color fácilmente apreciable por el ojo humano (Mathias-Rettig y Ah-hen, 2014). Este oscurecimiento ha sido también observado tras la fermentación en estado sólido para la obtención de harina de tempeh de garbanzo (Reyes-Moreno *et al.*, 2004) atribuyéndolo al cambio de color del micelio como consecuencia del secado (Suarez *et al.*, 2009).



Figura 5. Cambios en el color de las harinas de lenteja. Izquierda: harina control. Derecha: harina fermentada

Los hongos, al carecer de película protectora, son vulnerables a cambios físicos, microbianos y daños mecánicos (González P. *et al.* 2011). En este sentido, tanto la molienda como el proceso de secado son etapas que sin duda afectan a las propiedades del mismo. Los cambios de color

observados tienen que ver seguramente con estas etapas en las que se desencadenan reacciones de pardeamiento enzimático responsables del oscurecimiento observado en las harinas fermentadas (Suárez, et al 2009). Los cambios de color del micelio a causa del pardeamiento enzimático, dependen de numerosos factores como la concentración de la enzima, compuestos fenólicos, pH, temperatura, oxígeno disponible y actividad de agua, por lo que estos aspectos se identifican como parámetros a controlar en futuros estudios de cara al control y modulación de las propiedades de las nuevas harinas obtenidas.

Tabla 4. Coordenadas de color de las harinas de lenteja

Muestra	L*	a*	b*	ΔE^*
Harina control	60,2 ± 1,5(b)	5,4 ± 0,4(a)	14,9 ± 0,8(a)	8,2 ± 0,9
Harina fermentada	52,5 ± 0,9(a)	7,05 ± 0,15(b)	16,7 ± 0,3(b)	

*(a-b): Existen diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto a los distintos parámetros de color entre las dos harinas.

Adicionalmente a los cambios fisicoquímicos comentados anteriormente, los procesos de fermentación en estado sólido implican cambios de composición como consecuencia del consumo de sustrato y del crecimiento del microorganismo en cuestión. La **Tabla 5** muestra la composición nutricional de la harina de lenteja antes y después del proceso de fermentación. Las diferencias de humedad de ambos tipos de harina se deben a que ambas fueron sometidas a las mismas condiciones de secado a pesar de la humedad de partida era más alta en las muestras fermentadas como consecuencia del inóculo añadido por lo que en estudios futuros y para una mejor comparación, las harinas deberían llevarse al mismo nivel de humedad final y poder evaluar el impacto de la humedad final en las propiedades y vida útil de la harina fermentada. Se observan diferencias significativas en el contenido en proteína y carbohidratos, con un aumento neto entorno al 18,5 % en el caso de la proteína y una disminución en torno al 6 % en el caso de los carbohidratos, mientras que no se observan cambios en el contenido en grasa.

Tabla 5. Composición nutricional de las harinas de lenteja.

	Harina control	Harina fermentada
Proteína (g proteína/g harina b.s.)	0,233 ± 0,004(a)	0,276 ± 0,007(b)
Lípidos (g lípidos/ g harina b.s.)	0,0246 ± 0,0007(a)	0,02309 ± 0,00102(a)
Carbohidratos (g carbohidrato/ g harina b.s.)	0,74 ± 0,006(b)	0,6973 ± 0,0113(a)
Humedad (g agua/g harina b.s)	0,018 ± 0,004(a)	0,033 ± 0,008(b)
Cenizas (g cenizas/g harina b.s)	0,00282 ± 0,00005(a)	0,0031 ± 0,0005(a)
Energía (kcal/g harina b.s)	6,5	7,5

*(a-b): Existen diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto a los distintos macronutrientes entre las dos harinas.

El incremento de proteína en la harina fermentada se atribuye a la bioconversión a proteína micelial de algunos de los carbohidratos del sustrato colonizado por el hongo en crecimiento (Iyayi, 2004; Adamovic et al. 1998; Kutlu et al. 2000). Además, parece ser que el carácter acidófilo de las especies de *Pleurotus* y su capacidad para reducir el pH mediante la liberación de ácidos orgánicos evita la pérdida de nitrógeno a través de la volatilización del amoníaco (Haddadin, MS. et al. 1999; Cohen, R et al. 2002). Por otro lado, cabe resaltar que las proteínas del micelio de los hongos comestibles son ricas en aminoácidos esenciales y las enzimas fúngicas extracelulares producidas por el hongo en crecimiento durante el proceso de bioconversión también son de naturaleza proteica, por lo que la harina fermentada además de incrementar su fracción proteica lo hace con proteínas de mayor valor biológico (Alofe et al., 1998; Manzi et al., 1999; Kadari, 1999).

La **Tabla 6** muestra los cambios en cuanto a contenido en polifenoles totales y actividad antioxidante de las harinas de lenteja producidos por el proceso de fermentación. Si bien las variaciones netas de proteínas y carbohidratos comentadas anteriormente no son muy notables, el incremento neto de compuestos fenólicos es sustancial (53%) repercutiendo también en la capacidad antioxidante de la harina fermentada. El *Pleurotus ostreatus* es un hongo comestible que aporta gran cantidad de compuestos fenólicos por lo que su crecimiento y proliferación utilizando la lenteja como sustrato justifica el incremento de estos compuestos en la harina fermentada (Mishra et al., 2013). Adicionalmente, según Espinosa Páez et al. 2017 este hongo es basidiomiceto y excreta distintos tipos de lacasas (fenol-oxidasas), que utiliza para degradar la lignina y obtener nutrientes del sustrato. Estas lacasas catalizan reacciones de oxidación y pueden polimerizar, despolimerizar o transformar gran cantidad de compuestos fenólicos. Según estos autores, otras causas del aumento de polifenoles pueden ser la hidrólisis de fenoles enlazados y la desaminación de aminoácidos aromáticos y precursores de fenilalanina y tirosina de ácidos fenólicos. Este aumento de contenido en polifenoles justifica el aumento de actividad antioxidante observado. Dado que la actividad antioxidante se llevó a cabo según tres métodos analíticos (FRAP, DPPH, y ABTS) se realizaron correlaciones de Pearson para estudiar la relación entre los tres métodos y el contenido de polifenoles de las harinas. La tabla 6 muestra los resultados de esta correlación en la que se observa una correlación lineal (0,8446 ($p < 0,05$)) entre el contenido de polifenoles totales y el método FRAP, por lo que este método resultaría ser el más indicado para medir la actividad antioxidante en la harina de lenteja. Estas correlaciones resultan útiles para determinar la naturaleza de los compuestos antioxidantes presentes en la muestra; según la literatura, el método FRAP es útil para reducir diferentes antioxidantes no enzimáticos como vitamina C (ácido ascórbico) y ácido úrico, entre otros, pero no detecta antioxidantes que contienen grupos SH, como por ejemplo el glutatión, ácido lipóico y algunos aminoácidos (Cao et al., 1998; Fernández Pachón et al., 2006; Mora H., 2009).

Tabla 6. Actividad antioxidante y contenido en polifenoles de las harinas de lenteja.

	Harina control	Harina fermentada
Polifenoles (mg ácido gálico/ g harina b.s.)	2,09 ± 0,02(a)	3,2 ± 0,06(b)
FRAP (mg trolox/ g harina b.s.)	1,53 ± 0,14(a)	1,82 ± 0,07(b)
ABTS (mg trolox/ g harina b.s.)	2,504 ± 0,008(a)	2,6 ± 0,3(a)
DPPH (mg trolox/ g harina b.s.)	4,6 ± 0,2(a)	4,45 ± 0,18(a)

*(a-b): Existen diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto a polifenoles y actividad antioxidante (FRAP, ABTS y DPPH) entre las dos harinas.

4.2 Impacto de la fermentación en la digestibilidad de la harina de lenteja.

Así como en la sección anterior de resultados, únicamente se ha analizado la influencia de la fermentación en las características de las harinas de lenteja, en este apartado se aborda el estudio del impacto de la fermentación en la digestibilidad de los macronutrientes de las harinas, en concreto proteínas y carbohidratos, así como el efecto de la fermentación en la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles en las harinas después de la digestión gastrointestinal.

4.2.1 Impacto de la fermentación en la digestibilidad de las proteínas.

La determinación de proteína soluble en TCA permite evaluar la cantidad de proteína digerida y por tanto absorbible por la pared intestinal del duodeno. Esta determinación se llevó a cabo antes del proceso de digestión gastrointestinal (tiempo 0 en la **Figura 7**) arrojando que el proceso de fermentación con *Pleurotus* no solo incrementa el contenido en proteína de la harina, sino que además se trata de una proteína más bioaccesible por encontrarse parcialmente hidrolizada. En la **Figura 7** se representa la evolución de la fracción soluble en TCA a lo largo de las distintas etapas de la digestión gastrointestinal, expresada en gramos de proteína soluble en TCA en 100 gramos de proteína inicial. Estos resultados permiten hacer un seguimiento de la proteólisis, proceso mediante el cual las proteínas son hidrolizadas por las enzimas digestivas y son absorbibles en el intestino delgado en forma de moléculas más sencillas, como pueden ser los péptidos. La digestión de las proteínas comienza en el estómago, con la intervención de su componente ácido, que tiene dos funciones, favorecer la desnaturalización de las proteínas y activar la pepsina de su forma zimógeno. La pepsina desdobla proteínas y péptidos, en sitios específicos de la unión peptídica, como el grupo carboxilo de algunos aminoácidos. Cuando la proteína, parcialmente fraccionada, pasa al intestino delgado, las enzimas pancreáticas tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasas A y B son las responsables de continuar su digestión. Finalmente, la hidrólisis final de los péptidos producidos por las enzimas pancreáticas tiene lugar en la superficie de las membranas de las microvellosidades de las células de la mucosa intestinal. En el seguimiento de la fracción soluble en TCA a lo largo de la digestión (**Figura 6**) no se observan

apenas diferencias de actividad hidrolítica por parte de las enzimas proteolíticas, gástricas e intestinales, con cada uno de los sustratos (harina control y harina fermentada) ya que las diferencias en cada punto se mantienen prácticamente constantes a lo largo de toda la simulación de la digestión. No obstante, y entendiendo que estos son resultados preliminares que se deben confirmar, se observa un ligero aumento de la extensión de la proteólisis en la harina fermentada (en torno a un 3%).

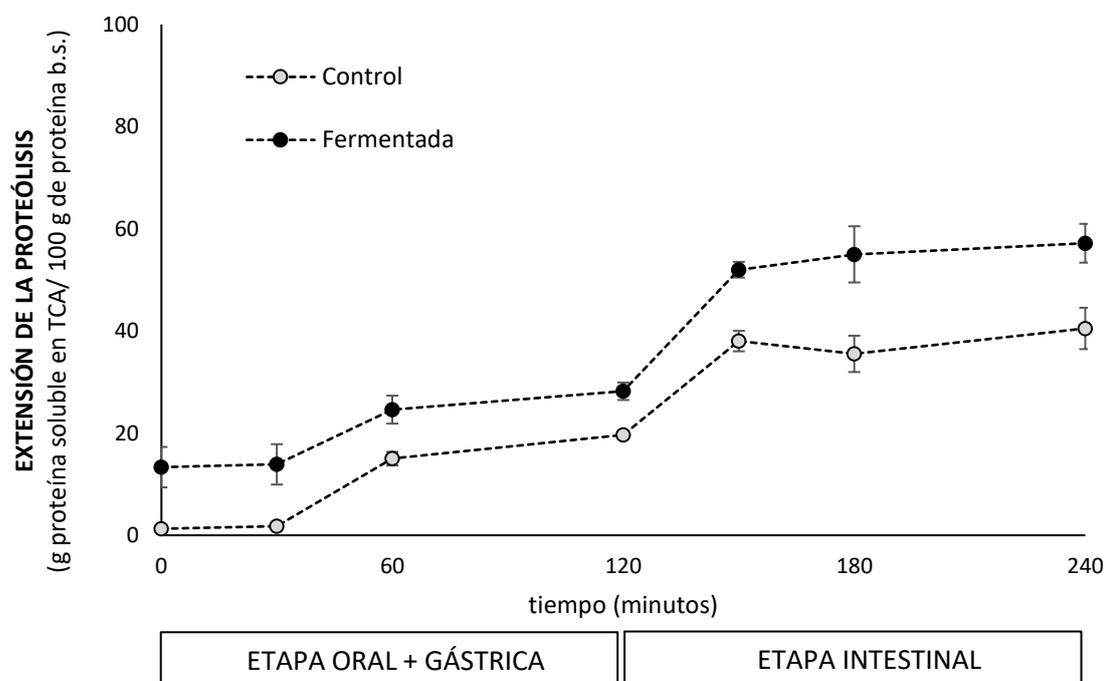


Figura 6. Extensión de la proteólisis (g de proteína soluble en TCA/ 100 g proteína en b.s.) de la harina control y de la harina fermentada a lo largo de la simulación in vitro de la digestión gastrointestinal.

*Existen diferencias significativas ($p < 0.05$) para la extensión de la proteólisis entre la harina fermentada y la harina control.

Según reportan algunos autores, los aumentos del contenido proteico en los sustratos fermentados en estado sólido a menudo se asocian con una mejora en la digestibilidad de las proteínas como consecuencia de la eliminación de compuestos antinutricionales como el ácido fítico (Di Lena, G et al. 1997) y los taninos (Alemawor F, et al. 2009). Asimismo, en un estudio de fermentación de harina de sorgo se atribuye la mejora de la digestibilidad de las proteínas a la disminución de la actividad inhibidora de tripsina y a la disminución del contenido de taninos producidos por la fermentación (Magdi A. Osman, 2004). El objetivo del presente trabajo arroja por tanto resultados preliminares que requieren de estudios de mayor calado en el que se analicen además los cambios en la concentración de antinutrientes que podrían influir en la digestibilidad de las proteínas de la lenteja.

4.2.2 Impacto de la fermentación en la digestibilidad de carbohidratos.

Otro de los macronutrientes de interés de las lentejas son sus carbohidratos que requieren de una compleja transformación durante la digestión oro-gastro-intestinal para su absorción. Brevemente, el bolo alimenticio resultado de la trituración en la fase oral con la participación de la saliva, enzimas, etc. pasa por el esófago hasta el estómago, donde se inactivará la amilasa salival (pH óptimo 6.8–7.2) como consecuencia del pH ácido del estómago (1-3). En la fase gástrica se detiene por tanto la digestión de los carbohidratos que pasarán al lumen del intestino delgado (duodeno), donde tendrá lugar la mayor parte de la digestión y absorción de estos nutrientes. En el intestino delgado se encuentran libres las enzimas alfa amilasa pancreática, la cual tiene la misma función hidrolítica que su contraparte salival y cortar enlaces alfa 1-4 glucosídicos. Esta enzima proviene del páncreas que, gracias a su acción exocrina, libera enzimas (incluida la amilasa) hacia el intestino delgado. Constituyendo al epitelio del intestino delgado se encuentran los enterocitos también denominados células absorbentes, y participan tanto en la digestión como en la absorción de nutrientes. En el lumen de estas células están las denominadas enzimas del borde de cepillo: la maltasa, que hidroliza maltosa (dos glucosas unidas a través de enlace glucosídico); la sacarasa/isomaltasa, que hidroliza enlaces alfa, 1-4 y alfa, 1-6 (esta enzima permitirá cortar los puntos de ramificación que no pueden hidrolizar las enzimas que sólo cortan enlaces alfa, 1-4); la lactasa que hidroliza la lactosa a glucosa y galactosa; y, la trealasa, que hidroliza la trehalosa (dos glucosas) e hidroliza los enlaces alfa, 1-1. El almidón resistente a la digestión alcanzará el colon, lugar donde sufrirá fermentación a través del microbiota produciendo ácidos grasos de cadena corta, los cuales pueden ser absorbidos por el epitelio.

El modelo de digestión in vitro utilizado en este estudio, es un modelo simplificado que únicamente permite evaluar la acción hidrolítica de la amilasa salival y la amilasa pancreática pero cuyos resultados permiten evaluar el impacto de la fermentación en la digestibilidad de los carbohidratos y comparar ambos sustratos. En la **Figura 7** se representa la digestibilidad del almidón de las harinas control y fermentada, expresado en g de glucosa libre por gramo de almidón, en las distintas etapas de la digestión gastrointestinal. Se observa un aumento gradual de la concentración de glucosa libre a lo largo de la digestión, lo que pone de manifiesto la actividad de las enzimas digestivas utilizadas en la simulación. Por otro lado, se observa una menor extensión de la glucólisis en la harina fermentada.

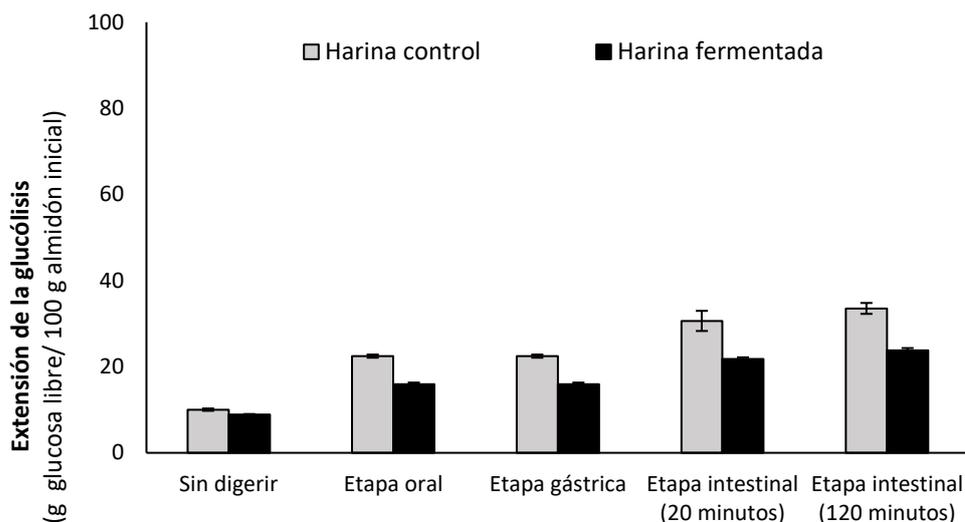


Figura 7. Extensión de la glucólisis (g glucosa libre/ g almidón inicial) de la harina control y de la harina fermentada durante la digestión in vitro gastrointestinal.

*Existen diferencias significativas ($p < 0.05$) para la extensión de la glucólisis entre la harina fermentada y la harina control.

Estos resultados permiten evaluar las distintas fracciones del almidón; se denomina almidón de digestión rápida a la fracción de almidón hidrolizadas después de 20 minutos de la etapa intestinal. Así mismo, se denomina almidón de digestión lenta a la fracción digerida a los 120 minutos de la etapa intestinal. La fracción de almidón que no es posible digerir se le denomina almidón resistente que proseguirá a la fase colónica como se ha comentado anteriormente. Una digestión lenta del almidón se corresponde con un menor índice glicémico, lo que está relacionado con una menor concentración de glucosa en sangre después de su ingesta y por tanto mucho más saludable (Bohn et al., 2017). En la **Tabla 7** se muestran los resultados de las distintas fracciones de almidón que constituyen cada harina de lenteja. Se puede observar una disminución significativa en la fracción de almidón de digestión rápida para la harina fermentada, probablemente por su consumo como fuente de energía para el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* durante la fermentación; esto justifica el aumento significativo de la fracción de almidón resistente, lo que en conjunto se traduciría en un menor índice glicémico de la harina fermentada.

Tabla 7. Fracciones de almidón digerible para la harina fermentada y la harina control.

Muestra	ADR (%)	ADL (%)	ARD (%)
Harina control	29 ± 2 (b)	4,10 ± 0,98 (b)	66,5 ± 0,8 (a)
Harina fermentada	21,8 ± 0,5 (a)	2,0 ± 0,3 (a)	76,2 ± 0,8 (b)

ADR: Almidón de digestión rápida expresado como porcentaje del almidón total, ADL: Almidón de digestión lenta expresado como porcentaje del almidón total y ARD: Almidón resistente a la digestión expresado como porcentaje del almidón total.

*Diferentes letras (a-b) significa que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la harina control y la harina fermentada

4.2.3 Efecto de la fermentación en el contenido de polifenoles y en la actividad antioxidante.

El incremento de polifenoles y de la actividad antioxidante como consecuencia de la fermentación con *Pleurotus* será positivo en tanto en cuanto dichos compuestos y su actividad superen el proceso de digestión y puedan ser absorbidos por la pared del intestino delgado. Se denomina bioaccesibilidad a la fracción de un compuesto liberada de la matriz alimentaria con la que se ingiere y convertida a la forma reconocible y/o accesible para su absorción.

En la **Tabla 8** se muestran los cambios de concentración de polifenoles totales y los cambios de actividad antioxidante de las harinas de lenteja después de someterlas a un proceso in vitro de digestión gastrointestinal. Si se comparan estos resultados con los obtenidos en la **Tabla 7**, es decir, antes de la digestión, se observa un aumento sustancial en la concentración de polifenoles en la fase micelar del digerido y por ende un aumento de la actividad antioxidante. Estos resultados ponen de manifiesto que la matriz alimentaria en la que se encuentran estos compuestos ejerce papel muy importante en la extractabilidad de estos compuestos y también un papel protector de su degradación durante el proceso de digestión. La mayoría de los polifenoles están asociados a compuestos de alto peso molecular en la matriz alimentaria, como proteínas y carbohidratos, lo que dificulta o imposibilita su extracción antes de la digestión (Akillioglu-Karakaya,2010). Así pues, la hidrólisis de proteínas y almidón, así como las condiciones ácidas del medio promueven la liberación y solubilización de polifenoles (Pérez-Jiménez J. et al.2005). Por otro lado, en los resultados obtenidos en este estudio se observa que las diferencias entre harinas en lo que se refiere a contenido en polifenoles de los digeridos es menor que las diferencias observadas en las harinas sin digerir en las que se observaba un incremento significativo de estos compuestos como consecuencia del proceso de fermentación. Además, y a pesar de ser mayor la concentración de polifenoles en el digerido de la harina fermentada, la actividad antioxidante es menor o igual (dependiendo del método) lo que estaría evidenciando una mayor labilidad a la digestión de los compuestos polifenólicos generados por la fermentación.

Tabla 8. Efecto de la fermentación en la actividad antioxidante y en el contenido total de polifenoles medidos en la fracción micelar del digerido después de la digestión gastrointestinal.

*(a-b): Existen diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto al contenido de polifenoles y actividad antioxidante

	Polifenoles totales (mg AG/g harina b.s.)	FRAP (mg TE/ g harina b.s.)	ABTS (mg TE/ g harina b.s.)	DPPH (mg TE/ g harina b.s.)
H. Control	7,11 ± 0.07(a)	3,63 ± 0.05(b)	5,61 ± 0.54(a)	6 ± 0.3(b)
H. Fermentada	7,73 ± 0.16(b)	2,35 ± 0.07(a)	5,6 ± 0.3(a)	4.7 ± 0.4(a)

(FRAP, ABTS y DPPH) entre las dos harinas después de la digestión gastrointestinal.

5. CONCLUSIONES

1. La fermentación en estado sólido con *Pleurotus ostreatus* no implica cambios sustanciales en el Índice de Absorción de aceite y Capacidad de retención de agua de la harina de lenteja, al menos en las condiciones de fermentación utilizadas en este estudio.
2. La harina fermentada de lenteja presentó un color más oscuro como resultado de las reacciones de pardeamiento enzimático que se desencadenan en las etapas de secado y molienda.
3. Se observaron diferencias significativas en el contenido en proteína y carbohidratos de las harinas fermentadas, con un aumento neto del 18,5 % en el caso de la proteína y una disminución del 6 % en el caso de los carbohidratos. Además, este incremento de la fracción proteica corresponde a proteínas de mayor valor biológico.
4. El proceso de fermentación con *Pleurotus* no solo incrementa el contenido en proteína de la harina, sino que además se trata de una proteína más bioaccesible por encontrarse parcialmente hidrolizada.
5. En cuanto a la digestibilidad de carbohidratos, se observó una menor extensión de la glucólisis en la harina fermentada, una disminución en la fracción de almidón de digestión rápida y un aumento de la fracción de almidón resistente, lo que en conjunto se traduciría en un menor índice glicémico de la harina fermentada.
6. El incremento neto de compuestos fenólicos que provoca la fermentación en estado sólido de las lentejas es sustancial y del orden del 50%, repercutiendo también en la capacidad antioxidante de la harina fermentada.
7. Los resultados de digestión revelaron que la matriz alimentaria en la que se encuentran estos compuestos ejerce papel muy importante en su extractabilidad y también como protección frente su degradación durante el proceso de digestión. Esto se traduce en una mayor concentración de polifenoles en el digerido de la harina fermentada, pero igual o menor actividad antioxidante, evidenciando una mayor labilidad a la digestión de los compuestos polifenólicos generados durante la fermentación.

Finalmente, y a modo de conclusión general:

El presente trabajo avala por tanto la aplicación de la fermentación con *Pleurotus ostreatus* en lenteja para la obtención de una harina con propiedades nutricionales y digestivas mejores a las de su homónimo sin fermentar. El producto desarrollado podría tener un elevado potencial en la elaboración de alimentos funcionales, como sustituto de otras materias primas de características y coste similares, o como ingrediente funcional como alternativa a proteínas de origen animal.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ADAMOVIĆ, M., GRUBIĆ, G., MILENKOVIĆ, I., JOVANOVIĆ, R., PROTIĆ, R., SRETENOVIĆ, L. & STOICEVIĆ, L.J. (1998) The biodegradation of wheat straw by *Pleurotus ostreatus* mushrooms and its use in cattle feeding. *Animal Feed Science and Technology* 71, 357–362.
- ADSULE, R. N., KADAM, S. S., & LEUNG, H. K. (1989). Lentil. In S. S. Kadam (Ed.). *Handbook of world legumes: Nutritional chemistry, processing technology, and utilization* (Vol. II, pp. 133–152). Florida: CRC Press Inc.
- AGRAHAR-MURUGKAR, D., SUBBULAKSHMI, G. (2005). Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the Khasi hills of Meghalaya. *Food Chemistry*. 89: 599-603
- ALEMAWOR, F.; DZOGBEFIA, VP.; ODDOYE, EOK.; OLDHAM, JH. (2009) Effect of *Pleurotus ostreatus* fermentation on cocoa pod husk composition: influence of fermentation period and Mn²⁺ supplementation on the fermentation process. *Afr J Biotechnol*;8:1950–8
- ALOFFE, FV; ODU, EA; ILLOH, HC. (1998) Mushrooms, Man and Nature- Edible Wild Mushrooms on Decaying Wood in Obafemi Awolowo University campus. *Niger. Field* 63: 3-18.
- AOAC, 2000. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. 15th Edition.
- ARMELLINI, R., PEINADO, I., ASENSIO-GRAU, A., PITTIA, P., SCAMPICCHIO, M., HEREDIA, A., & ANDRES, A. (2019). In vitro starch digestibility and fate of crocins in pasta enriched with saffron extract. *Food chemistry*, 283, 155-163.
- ASTIASARÁN, I.; MARTÍNEZ, J.A. *Alimentos Composición y Propiedades*, 2nd ed.; McGraw Hill—Interamericana: Madrid, Spain, 2000; pp. 135–168, ISBN 84-486-0305-2
- BERMÚDEZ, S. (1994). Preparación y determinación de propiedades funcionales de concentrados proteicos de haba (*Vicia faba*). *Revista Colombiana de Química*, 23(1), 4-8
- BOHN, T., CARRIERE, F., DAY, L., DEGLAIRE, A., EGGER, L., FREITAS, D., DUPONT, D. (2017). Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8398,1 –23
- BRESSANI, R. (1993) Grain quality of common beans. *Food Rev Int* 9: 237-297.
- BUSTOS, M.; VIGNOLA, M.; PÉREZ, G.; LEÓN, A. (2017) *In vitro* digestion kinetics and bioaccessibility of starch in cereal food products. *Journal of Cereal Science* 77: 243-250
- CAO, G.; PRIOR, R. L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical chemistry*, 1998, vol. 44, no 6, p. 1309-1315.
- CHANG, C. H., LIN, H. Y., CHANG, C. Y., & LIU, Y. C. (2006). Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *Journal of Food Engineering*, 77(3), 478-485.
- CHEN, K.-H.; McFEETERS, R. F.; FLEMING, H. P. 1983. Complete Heterolactic Acid Fermentation of Green Beans by *Lactobacillus cellobiosis*. *Food Science* 48, 3: 967-971
- COHEN R, PERSKY L, HADAR Y. (2002) Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl Microbiol Biotechnol*; 58:582–94

DAVE OOMAH, B.; CASPAR, F.; MALCOLMSON, L.; BELLIDO, A. 2011 Phenolics and antioxidant activity of lentil and pea hulls. *Food Research International*. 44, 1: 436-441

DELGADO-ANDRADE, C., OLÍAS, R., JIMÉNEZ-LÓPEZ, J. C., & CLEMENTE, A. (2016). Aspectos de las legumbres nutricionales y beneficiosos para la salud humana. *arbor*, 192(779), 313.

DI LENA, G.; PATRONI, E.; QUAGLIA, GB. Improving the nutritional value of wheat bran by a white-rot fungus. *Int J Food Sci Technol* 1997;32:513–9.

EGGUM, B.O., & BEAME, R.M. (1983). The Nutritive Value of Seed Proteins. In: Gottschalk, W., Muller, P. H. (Eds.). *Seed Protein Biochemistry, Genetics and Nutritive Value*. Kluwer Academic Publisher, Netherlands, pp 449-531.

EGOUNLETY, M., & AWORH, O. C. (2003). Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms). *Journal of food engineering*, 56(2-3), 249-254.

ESPINOSA-PÁEZ, E.; ALANIS-GUZMÁN, M.G.; HERNÁNDEZ-LUNA, C.E.; BÁEZ-GONZÁLEZ, J.G.; AMAYA-GUERRA C.A.; ANDRÉS-GRAU, A.M., (2017). Increasing Antioxidant Activity and Protein Digestibility in *Phaseolus vulgaris* and *Avena sativa* by Fermentation with the *Pleurotus ostreatus* Fungus. *Molecules*, 22(12), pii: E2275.

FERNANDEZ PACHON, M.; VILLAÑO, D.; TRONCOSO, A. M.; GARCÍA PARRILLA, M. Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 2006, vol. 56, no 2, p. 110-122.

FRIAS, J., C. VIDAL-VALVERDE, H. KOZLOWSKA, J. TABERA, J. HONKE, AND C.L. HEDLEY: Natural fermentation of lentils. Influence of time, flour concentration, and temperature on the kinetics of monosaccharides, disaccharide, and α -galactosides. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1996a), 579–584

GILBERT, E.J. 2002. *Medida del color*. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Valencia

GONZÁLEZ P., LUZ ESTHER; GIRALDO GIRALDO, GERMÁN A.; DUQUE, ALBA L.. Periodo de cosecha y método de conservación del hongo comestible *pleurotus ostreatus* (jacq.) p. kumm.

GRANITO, G.J.; PÉREZ, D. Y SUHEY, P. (2009). Valor nutricional y propiedades funcionales de *Phaseolus Vulgaris* procesada: un ingrediente potencial para alimentos. *Interciencia*, 34(2), 64-70

GRANT, G. (1991). Lectins. In J. P. F. D’Mello, C. M. Duffus, & J. H. Duffus (Eds.), *Toxic substances in crop plants* (pp. 49–67). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.

GUL AKILLIOGLU, H; KARAKAYA, S. 2010. Changes in Total Phenols, Total Flavonoids, and Antioxidant Activities of Common Beans and Pinto Beans after Soaking, Cooking, and in vitro Digestion Process. *Food Sci. Biotechnol.* 19(3): 633-639

HADDADIN MS, ABDULRAHIM SM, AL-KHAWALDEH GY, ROBINSON RK. (1999) Solid state fermentation of waste pomace from olive processing. *J Chem Technol Biotechnol* 74:613–8

HAHN, D. H.; ROONEY, L. W.; EARP, C. F. (1984). Tannins and phenols of sorghum. *Cereal Foods World*, 29, 776–779.

- IYAYI, EA. (2004). Changes in the cellulose, Sugar and crude protein contents of agro-industrial by-products fermented with *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium* sp. *Afr. J. Biotechnol.* **3**: 186-188
- JOOD, S., BISHNOI, S., & SHARMA, A. (1998). Chemical analysis and physicochemical properties of chickpea and lentil cultivars. *Nahrung*, *42*(2), 71–74.
- KADARI M (1999). Changes in Intracellular and Extracellular Enzyme Activities of *Lentinus subnudus* during Sporophore Development. *Biosci. Res. Comm.* **11**: 127-30.
- KIOSSEOGLOU, V., & PARASKEVOPOULOU, A. (2011). Functional and physicochemical properties of pulse proteins. In: *Pulse Foods: Processing, Quality and Nutraceutical Applications*. (edited by B.K.Tiwari, A. Gowen & B. McKenna) Pp. 57–90. Cambridge, MA: Academic Press
- KULKARNI, S.; NENE, S.; JOSHI, K. 2020. A comparative study of production of hydrophobin like proteins (HYD-LPs) in submerged liquid and solid state fermentation from white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.**23**:101440
- KUMITCH, H. M., STONE, A., NOSWORTHY, M. G., NICKERSON, M. T., HOUSE, J. D., KORBER, D. R., & TANAKA, T. (2020). Effect of fermentation time on the nutritional properties of pea protein-enriched flour fermented by *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. *Cereal Chemistry*.**97**,1: 104-113
- KUTLU, H.R., GÖRGÜLÜ, M., BAYKAL, L. & ÖZCAN, N. (2000) Effects of *Pleurotus florida* inoculation or urea treatment on feeding value of wheat straw. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science* **24**, 169–175
- LAMOTHE, S.; AZIMY, N.; BAZINET, L; COUILLARD, C.; BRITTEN, M. 2014. Interaction of green tea polyphenols with dairy matrices in a simulated gastrointestinal environment. *Food & function*, **5**(10):2621-2631
- LEE, J. H.; HWANG, C. E.; SON, K. S.; CHO, K.M. (2019). Comparisons of nutritional constituents in soybeans during solid state fermentation times and screening for their glucosidase enzymes and antioxidant properties. *Food Chemistry*, **272**(30), 362-371
- LI, S.; CHEN, C.; JI, YU.; LIN, J.; CHEN, X.; QI, B. (2018). Improvement of nutritional value, bioactivity and volatile constituents of quinoa seeds by fermentation with *Lactobacillus casei*. *Journal of Cereal Science*, **84**, 83-89.
- LONGOBARDI, F., INNAMORATO, V., DI GIOIA, A., VENTRELLA, A. & AGOSTIANO, A. (2017). Geographical origin discrimination of lentils (*Lens culinaris* Medik.) using ¹H NMR finger printing and multivariate statistical analyses. *Food Chemistry*, **237**, 743-748.
- MA, Z.; BOYE, J.; HU, X. (2018). Nutritional quality and techno-functional changes in raw, germinated and fermented yellow field pea (*Pisum sativum* L.) upon pasteurization. *LWT*, **92**, 147-154
- MAGDI A. OSMAN. (2004) Changes in sorghum enzyme inhibitors, phytic acid, tannins and in vitro protein digestibility occurring during Khamir (local bread) fermentation. *Food Chemistry* **88**. 129–134
- MANZI, P; AGUZZI, A; VIVANTI, V; PACCI, M; PIZZOFRERATO, L. (1999) Mushroom as a Source of Functional Ingredients. In: Lásztity R, Pfannhauser W, Simon-Sarkadi L, Tömösközi S (eds). *Proceedings of EURO FOOD CHEM: 10th European Conference on Functional Foods - A new challenge for the food chemists*, Budapest, Hungary, 22-24 September 1999. NRC

- MARTÍNEZ VILLALUENGA, C.; TORRES, A.; FRÍAS, J.; VIDAL VALVERDE, C. (2010) Semolina supplementation with processed lupin and pigeon pea flours improve protein quality of pasta. *LWT - Food Science and Technology*. 43,4: 617-622.
- MATHIAS-RETTIG, K, AH-HEN, K. 2014. El color en los alimentos un criterio de calidad medible. / *Agro Sur* 42(2): 57-66
- MINEKUS, M., ALMINGER, M., ALVITO, P., BALLANCE, S., BOHN, T., BOURLIEU, C., BRODKORB, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – An international consensus. *Food & Function*, 5(5), 1113–1124
- MISHRA, K.K.; PAL, R.S. ARUNKUMAR, R.; CHANDRASHEKARA, C.; JAIN, S.K.; BHATT, J.C. (2013) Antioxidant properties of different edible mushroom species and increased bioconversion efficiency of *Pleurotus eryngii* using locally available casing materials. *Food Chemistry* 138 (2013) 1557–1563
- MISHRA, S.; MONRO, J.; HEDDERLEY, D. (2008). Effect of processing on slowly digestible starch and resistant starch in potato. *Starch-Stärke*, 60(9), 500-507.
- MORA H, ÁNGELA C. Caracterización del estrés oxidativo en ratas Wistar diabéticas por estreptozotocina. *Vitae*, 2009, vol. 16, no 3, p. 311-319.
- PAJAK, P.; SOCHA, R.; BRONIEK, J.; KRÓLIKOWSKA, K.; FORTUNA, T. (2019) Antioxidant properties, phenolic and mineral composition of germinated chia, golden flax, evening primrose, phacelia and fenugreek. *Food Chemistry*. 275: 69-76
- PANDEY, A. 2003. Solid state fermentation. *Biochem Eng J*; 13:81–4.
- PEREZ-JIMENEZ J, SAURA-CALIXTO F. Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. *J. Agr. Food Chem*. 53: 5036-5040 (2005)
- PUSZTAI, A., BARDOCZ, S., & MARTÍN-CABREJAS, M. A. (2004). The mode of action of ANFs on the gastrointestinal tract and its microflora. In *Proceedings of the fourth international workshop on antinutritional factors in legume seeds and oilseeds* (pp. 87–100) Wageningen: EAAP
- QUESADA, C.; BARTOLOMÉ, B.; NIETO, O.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; HERNÁNDEZ, T.; ESTRELLA, I. (1996) Phenolic inhibitors of α -amylase and trypsin enzymes by extracts from pears, lentils, and cocoa *J Food Protect* 59: 185 -192
- REDDY, G.; BABU, P.; KOMARIAH, P.; ROY, K.; KOTHARI, I. 2003. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) *Process Biochemistry* 38, 10: 1457-1462
- REDDY, N. R.; SATHE, S. K.; PIERSON, M. D. (1988). Removal of phytate from great northern beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and its combined density fraction. *Journal of Food Science*, 53, 107–110.
- REPO-CARRASCO-VALENCIA, R ; SERNA, L Quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd.) as a source of dietary fiber and other functional components. 2011. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 31(1): 225-230
- REYES-MORENO, C.; CUEVAS-RODRÍGUEZ, E.O.; MILÁN-CARRILLO, J.; CÁRDENAS-VALENZUELA, O.G.; BARRÓN-HOYOS, J. 2004. Solid state fermentation process for producing chickpea (*Cicer arietinum* L) tempeh flour. Physicochemical and nutritional characteristics of the product. *J Sci Food Agric* 84: 271–278

- RODRÍGUEZ, S.; SANROMÁN, M. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry— A review. *Journal of Food Engineering* 76, 3: 291-302
- SANMEE, R., DELL, B., LUMYONG, P., IZUMORI, K., LUMYONG, S. (2003). Nutritive value of popular wild edible mushrooms from northern Thailand. *Food Chemistry*, 84: 527-532.
- SOTOMAYOR, C; FRÍAS, J; FORMAL, J; SADOWSKA, J; URBANO, G; VIDALVALVERDE, C. 1999. Lentil starch content and its microscopical structure as influenced by natural fermentation. *Starch/Stärke* 51:152–156
- STARZYŃSKA-JANISZEWSKA, A.; STODOLAK, B.; GÓMEZ- CARAVACA, A., M., MICKOWSKA, B., MARTIN-GARCIA, B., BYCZYŃSKI, L. (2019). Mould starter selection for extended solid-state fermentation of quinoa. *LWT - Food Science and Technology Journal*, 99, 231-237
- SUÁREZ, A.B. ANDREU, S.L. COLMAN, A. M. CLAUSEN, S.E. FEINGOLD. 2009. Pardeamiento enzimático: caracterización fenotípica, bioquímica y molecular en variedades de papa nativas de la Argentina. *Revista Latinoamericana de la Papa*. 15(1): 66-71
- T. JAYAKUMAR, P.A. THOMAS, P. GERALDINE. (2009). In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10: 228-234
- THAIPONG, K., BOONPRAKOB, U., CROSBY, K., CISNEROS-ZEVALLOS, L., & BYRNE, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, 19(6-7), 669-675
- TORINO, M. I.; LIMÓN, R. I.; MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; MÄKINEN, S.; PIHLANTO, A.; VIDALVALVERDE, C.; FRIAS, J. (2013). Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chemistry*, 136, 1030–1037.
- TRIPATHI, J.P.; YADAV, J.S. (2015) Optimisation of solid substrate fermentation of wheat straw into animal feed by *Pleurotus ostreatus*: A pilot effort. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 662–667
- VASSILEV, N.; OLIVEIRA MENDES, G. (2018). Solid-State Fermentation and Plant-Beneficial Microorganism. Chapter: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering in Plant-Growth Promoting Fungus. Elsevier.
- VISINTIN, S.; RAMOS, L.; BATISTA, N.; DOLCI, P.; SCHWAN, F.; COCOLIN, L. 2017. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* starter cultures on cocoa beans fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 257:31-40
- WORKU, A.; SAHU, O. (2017). Significance of fermentation process on biochemical properties of *Phaseolus vulgaris* (red beans), *Biotechnology Reports*, 16, 5-11
- ZANNINI, E.; PONTONIO, E.; WATERS, D.M. ; ARENDT, E.K. (2012). Application of microbial fermentations for production of gluten-free products and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93 (2012), 473-485.