

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I
DEL MEDI NATURAL



Mejora del perfil nutricional y funcional de lenteja Pardina mediante fermentación en estado sólido con *Pleurotus ostreatus*

TRABAJO FINAL DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: Esther Tercero Atencia

TUTORA: Ana Belén Heredia Gutiérrez

COTUTORA: Andrea Asensio Grau

COTUTORA: Ana María Andrés Grau

DIRECTORA EXPERIMENTAL: Janaina Sánchez García

Curso 2020-2021

València, Julio de 2021, Universitat Politècnica de València



MEJORA DEL PERFIL NUTRICIONAL Y FUNCIONAL DE LENTEJA PARDINA MEDIANTE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO CON *PLEUROTUS OSTREATUS*

RESUMEN

Las lentejas (*Lens culinaris*) es una de las legumbres más consumidas a nivel mundial, en parte debido a la calidad de su perfil nutricional, rico en proteínas, fibra, vitaminas y minerales. Además, tanto su cultivo como su consumo contribuyen a la sostenibilidad ambiental y suponen una fuente de proteínas alternativa a la de origen animal. A pesar de todo ello contienen antinutrientes que limitan la digestibilidad y absorción de nutrientes. En este sentido, la fermentación destaca por su capacidad de reducir el contenido en antinutrientes mediante biotransformación y mejora la bioaccesibilidad de proteínas y compuestos funcionales. Existen diferentes microorganismos utilizados en la fermentación y, entre ellos, el hongo comestible *Pleurotus ostreatus* es señalado por su capacidad de sintetizar aminoácidos esenciales y presentar unas propiedades organolépticas distinguidas.

Así pues, objetivo de este trabajo fue el de analizar la capacidad fermentativa en estado sólido del hongo *P. ostreatus* en lenteja Pardina en grano y harina. Para ello se estudió la cinética de crecimiento del hongo y se controlaron los parámetros químicos como el pH, acidez, sólidos solubles y actividad de agua a lo largo del proceso fermentativo. Además, se analizaron las propiedades nutricionales y funcionales del producto fermentado a distintos tiempos, como el contenido de proteína, polifenoles, antinutrientes (ácido fítico) y actividad antioxidante. Tras la fermentación se observó un impacto positivo en el contenido en proteína y una reducción de ácido fítico para ambos sustratos, a la vez que un impacto negativo en el contenido en antioxidantes y polifenoles. La fermentación en harina permitió potenciar en mayor medida el incremento en proteína, frente a la fermentación en grano. En definitiva, en harina el tiempo óptimo de fermentación que permitió alcanzar el mayor contenido en proteína y menor en antinutrientes fue de catorce días, mientras que en grano el mayor contenido en proteína y menor en antinutrientes se alcanzó a los cuatro y catorce días de fermentación, respectivamente.

Palabras clave: fermentación, lenteja, *Pleurotus ostreatus*, actividad antioxidante, polifenoles, antinutrientes, cinética de crecimiento.

Alumna: Esther Tercero Atencia

Tutora: Ana Belén Heredia Gutiérrez

Cotutora: Andrea Asensio Grau

Cotutora: Ana María Andrés Grau

Directora experimental: Janaina Sánchez García

ABSTRACT

Lentils (*Lens culinaris*) are one of the most consumed legumes worldwide, in part due to the quality of their nutritional profile, rich in protein, fiber, vitamins and minerals. In addition, both cultivation and consumption are environmentally sustainable and represent an alternative protein source against animal origin sources. Despite all this, they contain antinutrients that limit the digestibility and absorption of nutrients. In this sense, fermentation stands out for its ability to reduce the content of antinutrients through biotransformation and improve the bioaccessibility of proteins and functional compounds. There are different microorganisms used in fermentation and, among them, the edible fungus *Pleurotus ostreatus* highlights for its ability to synthesize essential amino acids and have distinguished organoleptic properties.

Thus, the objective of this work was to analyze the fermentative capacity in solid state of the *P. ostreatus* fungus in Pardina lentils in grain and flour over 14 days. The fungus growth kinetics and chemical parameters such as pH, acidity, soluble solids and water activity were studied throughout the fermentation process. In addition, the nutritional and functional properties of the fermented product were analyzed at different times, such as the content of protein, polyphenols, antinutrients (phytic acid) and antioxidant activity. After fermentation there was a positive impact on the protein content and a reduction in phytic acid for both substrates, as well as a negative impact on the antioxidant and polyphenol content. Fermentation in flour will further enhance the increase in protein, compared to fermentation in grain. Finally, highest protein and lowest antinutrient content were obtained in flour after fourteen days of fermentation, while in grain the highest protein and lowest antinutrient content was reached at fourth and fourteenth days respectively

Keywords: fermentation, lentil, *Pleurotus ostreatus*, antioxidant activity, polyphenols, antinutrients, growth kinetics.

Alumna: Esther Tercero Atencia

Tutora: Ana Belén Heredia Gutiérrez

Cotutora: Andrea Asensio Grau

Cotutora: Ana María Andrés Grau

Directora experimental: Janaina Sánchez García

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, a mis padres, por esas conversaciones interminables a las mil de la madrugada, por ser mi apoyo eterno, cariño, amor y guía, por hacerme quién soy y, sobre todo, por estar. Sois fundamentales. También a mi hermano, a mi osito, por todos esos abrazos silenciosos cuando más los he necesitado. A los amigos 'de siempre' y a aquellos que han aparecido a lo largo de estos cuatro años, por todos los buenos momentos y las risas. Y gracias a ella, por ser ella.

No me puedo olvidar de todos los que me han acompañado estos últimos meses, de Jani, Andrea y de mis tutoras, las 'Anas', por todo lo que me habéis enseñado, por la paciencia y la confianza que habéis depositado en mí. Tampoco puedo dejar de mencionar a Paula, gran compañera de estrés, a la que le deseo lo mejor. Gracias a todo el equipo, por formar parte de mi crecimiento personal y académico y por hacer posible este trabajo.

Habéis sido esenciales en todo esto. Os quiero.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Leguminosas como fuente proteica sostenible	1
1.1.2 Lentejas en el marco alimentario actual	2
1.2 Métodos de procesamiento de legumbres y su potencial impacto	2
1.2.1 Fermentación: Fermentación en estado sólido y variables que influyen en el proceso.....	2
1.2.2 Microorganismos en la fermentación en estado sólido.....	4
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	6
2.1 Objetivos	6
2.2 Plan de trabajo	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1 Materia prima	7
3.2 Reactivos químicos y bioquímicos	7
3.3 Fermentación fúngica en estado sólido	7
3.3.1 Diseño experimental	7
3.3.2 Preparación del inóculo.....	8
3.3.3 Preparación del sustrato	9
3.3.4. Inoculación del sustrato	9
3.4 Determinaciones analíticas	10
3.4.1 Caracterización composicional del sustrato en términos de en humedad, proteína, grasa, carbohidratos y cenizas	10
3.4.2 Contenido en sólidos solubles (°Brix).....	10
3.4.3 Almidón	10
3.4.4 Actividad de agua	12
3.4.5 Tasa respiratoria.....	12
3.4.6 Determinación del pH	12
3.4.7 Acidez titulable.....	12
3.4.8 Determinación de biomasa	13
3.4.9 Actividad antioxidante	14
3.4.10 Polifenoles totales.....	15
3.4.12 Contenido proteico	16
3.4 Análisis estadístico	16
4.1 Caracterización de la materia prima de partida	17
4.2 Cinética de crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i>	18

4.3 Impacto de la fermentación en las propiedades fisico-químicas del sustrato	22
5. CONCLUSIONES	27
6. REFERENCIAS	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización composicional del sustrato de partida: lenteja Pardina en grano y harina.	17
Tabla 2. Valores de pH, acidez titulable, sólidos solubles y actividad de agua en ambos sustratos durante la fermentación.	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales diferencias entre la fermentación en estado sólido (SSF) y fermentación en sumergido (SmF). Adaptado de Garrido-Galand et al. (2021).	3
Figura 2. Plan de trabajo para llevar a cabo los objetivos planteados.	8
Figura 3. Placa de cultivo iniciador (inóculo) de <i>Pleurotus ostreatus</i> tras 14 días de incubación a 28°C.	9
Figura 4. Recipiente con granos de lenteja inoculadas con <i>P. ostreatus</i> tras 12 días de fermentación.	9
Figura 5. Tasa de respiración (TR) de O ₂ y CO ₂ en términos de consumo o producción, respectivamente, estimados en granos de lenteja inoculados (a) y en harina de lenteja inoculada (b) durante el proceso fermentativo. Se representa también la evolución de la atmósfera del espacio de cabeza (%CO ₂ y %O ₂) en granos de lenteja inoculados (c) y harina de lenteja inoculada (d).	18
Figura 6. Coeficiente de respiración (RQ) en harina de lenteja inoculada y grano inoculado durante el proceso fermentativo	19
Figura 7. Variación neta de almidón total (%) en harina de lenteja (a) y lenteja en grano a lo largo de la fermentación en estado sólido con <i>P. ostreatus</i>	20
Figura 8. Variación neta de biomasa (a) y de proteína (b) (%) en el sustrato (lenteja en grano o harina) a lo largo de la fermentación en estado sólido con <i>P. ostreatus</i>	21
Figura 9. Efectos de la fermentación con <i>P. ostreatus</i> sobre el contenido en antioxidantes en grano de lenteja (a) y en harina de lenteja (b), expresado como mg de Trolox (estándar) por gramo de muestra.	24
Figura 10. Efectos de la fermentación con <i>P. ostreatus</i> sobre el contenido en polifenoles en grano de lenteja y harina de lenteja, expresado como mg de ácido gálico (estándar) por gramo de muestra fermentada	25
Figura 11. Efectos de la fermentación con <i>P. ostreatus</i> sobre el contenido en ácido fítico en grano de lenteja y en harina de lenteja, expresado como mg de ácido fítico por gramo de sustrato fermentado	26

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Leguminosas como fuente proteica sostenible.

Las legumbres son uno de los alimentos más consumidos a nivel mundial, sirviendo parte esencial de la dieta Mediterránea y de países en vías de desarrollo (Clemente y Jiménez-López, 2020). Entre otros, lentejas, garbanzos, alubias o guisantes, resultan una fuente rica en proteínas, carbohidratos complejos tales como fibra insoluble, siendo considerados de bajo índice glicémico. (Bouchenak y Lamri-Senhadji, 2013; Dhull *et al.*, 2020). Así mismo destacan por su contenido en compuestos bioactivos tales como vitaminas del grupo B, minerales como potasio o magnesio, y polifenoles que le confieren actividad antioxidante. (Becerra-Tomás *et al.*, 2019; Khazaei *et al.*, 2019). Sin embargo, también contiene antinutrientes tales como saponinas o fitatos que limitan su valor nutricional (Margier *et al.*, 2018).

Más allá de su perfil nutricional, se ha estudiado ampliamente su impacto sobre la salud. Así, la incorporación de legumbres a la dieta se asocia con una reducción del riesgo de padecer enfermedades coronarias y cardiovasculares (Becerra-Tomás *et al.*, 2019; Bouchenak y Lamri-Senhadji, 2013) y de factores asociados, como son la presión sanguínea, la obesidad, dislipidemia y el desarrollo de diabetes de tipo II (Becerra-Tomás *et al.*, 2019; Clemente y Jimenez-Lopez, 2020). Por último, su consumo también parece mejorar los niveles de colesterol y la función colónica (Margier *et al.*, 2018).

Por otro lado, las leguminosas son relevantes en el contexto agrícola y de seguridad alimentaria, pues presentan beneficios ambientales y económicos asociados a su habilidad de fijar el nitrógeno (Khazaei *et al.*, 2019). Ello facilita el reemplazo de fertilizantes sintéticos y ayuda a paliar la emisión de gases de efecto invernadero. Sirve de ejemplo el estudio llevado a cabo por Nemecek *et al.* (2008), en el que evalúan el impacto de las leguminosas al incorporarlas en un sistema de rotación de cultivos en cuatro regiones (Alemania, España, Francia y Suiza). A modo de resumen, señalan su capacidad para reducir la demanda energética, formación de ozono, acidificación edáfica y toxicidad ecológica, además de servir como atenuante del calentamiento global.

Centrando la atención en el consumo sostenible, hay que señalar que, actualmente, la ingesta de productos cárnicos y sus derivados suponen la mayor parte del aporte proteico (33,14%), seguido por cereales, leche y otros productos lácteos (Garrido-Galand *et al.*, 2021). Estas cifras, unidas al incremento de la población mundial, han alertado a organizaciones como la FAO (Food and Agriculture Organization). Las previsiones estiman que en 2050 se necesitará una producción de carne de hasta 200 millones de toneladas para satisfacer los requerimientos nutricionales, resultando insostenible medioambientalmente (FAO, 2009; Garrido-Galand *et al.*, 2021). Son muchas las alternativas proteicas que están desarrollándose, como es el caso de la carne *in vitro* o la proteína de insecto. No obstante, ambas opciones plantean problemas de aplicación y controversia social (Hocquette, 2016; Montowska *et al.* 2019). Las legumbres en este contexto se consideran una rica fuente de proteínas alternativas a la de origen animal (Bonnet *et al.*, 2020; Khazaei *et al.*, 2019), con el valor añadido de que su producción es significativamente más sostenible. Todo ello ha contribuido a revalorizar el papel de las legumbres y productos derivados en la industria alimentaria como alternativa al consumo de carne (Clemente y Jiménez-López, 2020).

1.1.2 Lentejas en el marco alimentario actual.

Dentro de la gran variedad de legumbres, las lentejas (*Lens culinaris*) son una de las más populares, junto a las habas, guisantes y garbanzos, en parte debido a su tiempo reducido de cocinado y bajo coste (Khazaei *et al.*, 2019). Su cultivo cada vez es más frecuente, abarcando 70 países en todo el mundo, y su consumo se extiende a más de 100 países (Magro *et al.* 2019). De hecho, en los últimos 50 años su presencia en campo ha supuesto un incremento del 515%. (Khazaei *et al.*, 2019).

Nutricionalmente, destacan principalmente por su contenido en proteínas, en micronutrientes esenciales y antioxidantes (Khazaei *et al.*, 2019). La presencia de compuestos fenólicos y proteínas precursoras de péptidos bioactivos, conocidos bajo la terminología de moléculas bioactivas, las dotan de una actividad antioxidante y antidiabética especialmente interesante (Magro *et al.* 2019), sobre todo para el desarrollo y formulación de nuevos alimentos.

Como ya se ha mencionado, y a pesar de presentar un perfil nutricional de calidad, las lentejas también contienen antinutrientes (fitatos, polifenoles como los taninos o inhibidores de proteasas gástricas) que limitan la digestibilidad y absorción de nutrientes (Nkhata *et al.*, 2018; Asensio-Grau *et al.*, 2020). Los fitatos afectan principalmente a la biodisponibilidad de los minerales, al igual que sucede con los taninos (Bouchenak y Lamri-Senhadjji, 2013; Khazaei *et al.*, 2019). A su vez, estos últimos reaccionan con aminoácidos como la lisina o metionina y limitan su disponibilidad para la digestión. Por otro lado, los inhibidores de proteasas alteran irreversiblemente las proteasas gástricas (e.g. tripsina), lo que conduce a una disminución en la digestión y absorción de aminoácidos (Khazaei *et al.*, 2019). No obstante, cabe destacar que a pesar de que las lentejas presentan un contenido elevado en taninos y fitatos, los inhibidores de proteasas son significativamente más bajos que en algunas otras leguminosas (Elkowicz y Sosulski, 1982; Shi *et al.*, 2017).

1.2 Métodos de procesado de legumbres y su potencial impacto.

Se ha estudiado como el procesado de las legumbres puede reducir el impacto negativo de los antinutrientes y ayudar a mejorar su digestibilidad (Muzquiz *et al.*, 2012, Shi *et al.*, 2017). Muchas de estas moléculas son termosensibles, como los inhibidores de proteasas, mientras que otros, como los taninos, saponinas o fitatos, pueden reducirse mediante remojado, germinación o incluso la fermentación (Muzquiz *et al.*, 2012).

1.2.1 Fermentación: Fermentación en estado sólido y variables que influyen en el proceso.

La fermentación, definida como un proceso biológico a partir del cual los microorganismos transforman el sustrato en otros productos, plantea beneficios a diferentes niveles. Destaca por reducir el contenido en antinutrientes de la matriz del alimento mediante biotransformación, gracias a la acción del propio microorganismo y sus enzimas (Nkhata *et al.*, 2018). Estas enzimas causan reacciones y cambios que mejoran el contenido nutricional, textura, sabor y aromas del producto final al favorecer la hidrólisis de macromoléculas complejas (grasas, carbohidratos y proteínas) en compuestos de bajo peso molecular (Gupta *et al.* 2018) y por tanto susceptibles

de ser bioabsorbidos por la pared intestinal. A día de hoy son conocidos los efectos positivos de los fermentados sobre la disponibilidad y absorción de nutrientes, vitaminas y minerales, unido a los potenciales efectos beneficiosos sobre la salud (Şanlıer *et al.*, 2019). Se han descrito impactos positivos en la reducción del nivel del colesterol en sangre, mejora del sistema inmune, reducción del riesgo de padecer diabetes, alergias o aterosclerosis, entre otras condiciones (Nkhata *et al.*, 2018). Es igualmente importante su influencia sobre la seguridad alimentaria, pues previene el crecimiento de microorganismos patogénicos (Xiang *et al.* 2019). De hecho, históricamente la fermentación de alimentos ha sido ampliamente utilizada para extender la vida media de los mismos y mejorar sus propiedades organolépticas.

Dentro del conjunto de procesos de fermentación, destaca la fermentación en estado sólido (SSF) sobre la alternativa en estado líquido (método en sumergido, SmF). En el método en sumergido, los microorganismos crecen en un medio nutritivo líquido, con un alto contenido en agua libre y concentración de oxígeno, siendo los nutrientes rápidamente consumidos (Liu y Kokare, 2017; Subramaniyam y Vimala, 2012). Por el contrario, la SSF se desarrolla en ausencia de agua libre y el microorganismo contacta directamente con el oxígeno gaseoso (Raghavarao *et al.*, 2003) (**Figura 1**). Si bien la SmF presenta ventajas en cuanto al mejor control de los parámetros de fermentación (e.g. temperatura, humedad, pH o aireación), al mantenimiento de la humedad del microorganismo y la amplia variedad de organismos capaces de fermentar en estas condiciones (Garrido-Galand *et al.* 2021), la SSF aporta otras perspectivas clave. En este sentido, la SSF se señala como una técnica que permite fermentar sustratos económicos (e.g. residuos agro-industriales) y muy variados. Además, alcanza concentraciones de producto final mayores, con una tasa de conversión de entre 20 - 30% del sustrato (frente al 5% asociado a la SmF). Dado que no emplea grandes cantidades de agua, supone un bajo impacto ambiental, reduce el riesgo de contaminación con otros microorganismos y tiene menor coste de producción y mantenimiento (Asensio-Grau *et al.*, 2020; Raghavarao *et al.*, 2003).

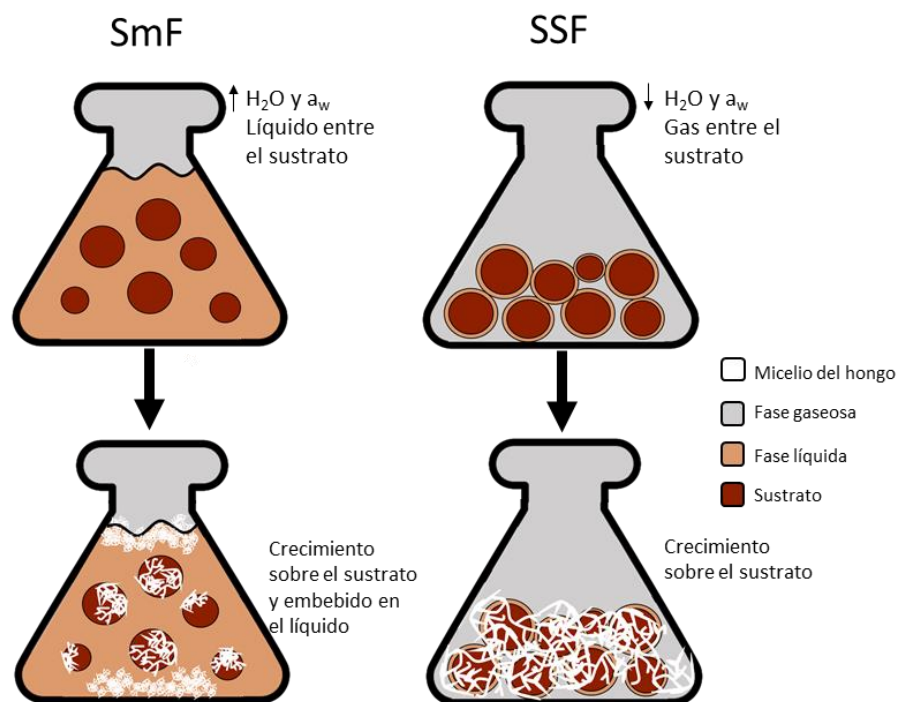


Figura 1. Principales diferencias entre la fermentación en estado sólido (SSF) y fermentación en sumergido (SmF). Adaptado de Garrido-Galand *et al.* (2021).

Además de la humedad y agua libre disponible en el medio, la estructura del propio sustrato afecta a la evolución de la fermentación (Garrido-Galand *et al.* 2021). Una mayor disgregación del sustrato y menor tamaño de partícula deja a disposición del microorganismo una mayor área de superficie donde desarrollarse y, por tanto, mejora la accesibilidad a los nutrientes disponibles (Krishna, 2005; Pandey *et al.*, 2000). A pesar de ello, un exceso de área superficial podría conllevar un incremento de la actividad enzimática sobre compuestos bioactivos como pueden ser los antioxidantes, causando su degradación y pérdida en el producto final (Garrido-Galand *et al.* 2021). Además, partículas demasiado pequeñas pueden aglomerar y frenar el crecimiento y la fermentación (Pandey *et al.*, 2000). Por el contrario, un tamaño de partícula superior supone una mejor aireación, pero limita la superficie disponible (Couto y Sanromán, 2006).

Las condiciones óptimas de temperatura, humedad, gases disponibles y pH, entre otros, junto al método de inoculación, son parámetros que han de establecerse previo inicio de la fermentación propiamente dicha (Pandey, 2003). Para ello, tanto el tipo de sustrato como el microorganismo empleado son relevantes (Garrido-Galand *et al.*, 2021; Nkhata *et al.*, 2018). Por este motivo son necesarios estudios previos que ayuden a establecer las condiciones óptimas de fermentación y lograr optimizar la respuesta metabólica, para que en última instancia puedan obtenerse resultados extrapolables a un entorno industrial y aplicado. A modo de ejemplo puede servir el trabajo realizado por Mora-Uzeta *et al.* (2020), donde se estudiaron el tiempo y la temperatura óptimos (96,2 h y 37,6) de SSF sobre *Phaseolus acutifolius* (frijol) inoculado con *Rhizopus oligosporus*, con el fin de maximizar el contenido en proteína, compuestos fenólicos y la actividad antioxidante.

En definitiva, la fermentación en su modalidad de estado sólido ha supuesto un importante avance en la producción de alimentos enriquecidos en proteínas a partir de sustratos ricos en carbohidratos (Raghavarao *et al.*, 2003). Ya se ha estudiado el efecto positivo de la SSF sobre el perfil nutricional de legumbres como garbanzos (Xiao *et al.*, 2014), alubias (Espinosa-páez *et al.*, 2017) e incluso lentejas, tanto en grano (Dhull *et al.*, 2020) como en harina (Magro *et al.*, 2019). Asimismo, se han descrito otros potenciales beneficios de este bioproceso, sobre todo a nivel industrial. Se puede destacar como ejemplo su aplicación en la revalorización de subproductos industriales, como es el caso de la obtención de etanol a partir de residuos lignocelulósicos (Gupta *et al.*, 2018; Raghavarao *et al.*, 2003).

1.2.2 Microorganismos en la fermentación en estado sólido.

Los microorganismos empleados en la SSF de alimentos son bacterias, levaduras y hongos (Couto y Sanromán, 2006). Las bacterias, principalmente del género *Lactobacillus*, actúan reduciendo biomoléculas naturalmente presentes en legumbres. Por ejemplo, la fermentación con *L. casei* y *L. plantarum* en frijoles resultó en una reducción del contenido en fitatos, inhibidores de proteasas y polifenoles (Sindhu y Khetarpaul, 2001). Algunas especies se ha visto que son capaces de hidrolizar taninos, como es el caso de *L. plantarum*, *L. Paraplantarum* o *L. pentosus* (Licandro *et al.*, 2020; Osawa *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2009; Vaquero *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha estudiado el efecto de la levadura (*Sacharomyces cerevisiae*) en legumbres como el frijol (Agte *et al.*, 1999) o sorjo (Day y Morawicki, 2016), a fines de evaluar su efecto en el contenido proteico y digestibilidad. Los hongos son ampliamente utilizados para este

cometido, siendo aquellos del género *Aspergillus* y *Rhizopus* los más comúnmente encontrados en la bibliografía. Por ejemplo, se ha visto que la fermentación de soja con *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus oryzae* aumenta la cantidad de ácidos fenólicos y flavonoides (Dueñas *et al.*, 2012). Otro estudio desarrollado por Egounletu y Aworth (2003) evalúa la fermentación con *Rhizopus oligosporus* en soja, mijo y frijol; mientras que otros grupos de investigación emplean *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger* sobre harina de guisante (Kumitch *et al.*, 2020) o lenteja (Magro *et al.*, 2019) para incrementar su valor nutricional.

De entre los organismos disponibles para el desarrollo de la fermentación, los hongos son considerados una de las fuentes de alto valor nutricional, dadas sus propiedades y contenido en carbohidratos, aminoácidos esenciales, fibra, vitaminas y minerales (Espinosa-Páez *et al.*, 2017). Además, también destacan por sus potenciales beneficios medicinales y farmacológicos (Atlı *et al.*, 2019). En este sentido se pueden señalar los géneros *Ganoderma*, *Lentinula*, *Trametes*, *Cordyceps*, *Hericium* y *Pleurotus* (Atlı *et al.*, 2019). A su vez, las especies incluidas dentro del género *Pleurotus*, comestibles y catalogadas como Generally Recognised As Safe (GRAS), son señaladas por su capacidad de sintetizar aminoácidos esenciales, a la vez que desarrollan unas propiedades organolépticas distinguidas (Espinosa-Páez *et al.*, 2017).

La especie *Pleurotus ostreatus* (seta de ostra) es considerada de las más cultivadas y producidas a nivel mundial. Se trata de un hongo capaz de crecer en sustratos lignocelulósicos, lo que lo hace especialmente indicado para la degradación de este tipo de sustratos. No obstante, su uso también se ha extendido a fermentación de alimentos, sobre todo debido a la presencia de metabolitos bioactivos como polisacáridos, esteroides, antioxidantes y lectinas (Atlı *et al.*, 2019; Espinosa-Páez *et al.*; 2021) en su cuerpo fructífero, micelio y secreciones. Sirve de ejemplo el trabajo desarrollado por Espinosa-Páez *et al.* (2017) en avena y frijol, o el desarrollado por Asensio-Grau *et al.* (2020) en lenteja.

La capacidad fermentativa de *Pleurotus ostreatus*, junto al conjunto de propiedades anteriormente expuestas, lo hacen el organismo de elección para mejorar el perfil nutricional de las lentejas. De esta manera, se pretende contribuir en la búsqueda de una fuente de proteína más sostenible que la de origen animal y que pueda ser utilizada como un ingrediente proteico de gran calidad para el desarrollo de nuevos productos. Conseguir este objetivo permitiría obtener ingredientes que, tras una adecuada etapa de estabilización, presente mejoras en cuanto a funcionalidad y digestibilidad y que puedan orientarse a grupos de población específicos, tales como personas de avanzada edad, deportistas, veganos o sujetos que presenten alteraciones gastrointestinales con maldigestión proteica.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1 Objetivos.

El aumento del consumo de legumbres y, concretamente, de lentejas, ha impulsado el interés por el desarrollo de nuevos alimentos e ingredientes con propiedades mejoradas. A tales fines, el objetivo general del presente trabajo final de grado ha sido analizar la capacidad fermentativa en estado sólido del hongo *Pleurotus ostreatus* tanto en lenteja en grano como en harina de lenteja. El desarrollo del mismo se enmarca dentro del proyecto My Best Elderly Food (MyBEEF), enfocado en el desarrollo de alimentos calidad alimentaria basados en proteína sostenible, con digestibilidad y funcionalidad mejoradas para la población *senior*. Cabe mencionar que el estudio se alinearía con los Objetivos de Desarrollo Sostenible planteados por las Naciones Unidas en 2015, con los que se pretende poner fin a la pobreza, proteger el planeta y mejorar las condiciones de vida de la población mundial. Así pues, se puede enmarcar dentro los objetivos de Hambre cero (objetivo 2), Salud y bienestar (objetivo 3), Acción por el clima (objetivo 13) y Vida de ecosistemas terrestres (objetivo 15).

Para alcanzar el objetivo general, han sido planteados los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la influencia de la granulometría del sustrato (grano o harina) en la cinética de crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus*
2. Evaluar el impacto de fermentación en las propiedades fisicoquímicas de los sustratos a lo largo del tiempo.
3. Analizar la contribución de la fermentación en las propiedades antioxidantes y contenido en polifenoles de los sustratos largo del tiempo.
4. Evaluar la reducción del contenido en antinutrientes (fitatos) en los sustratos fermentados y a lo largo del tiempo de fermentación.

2.2 Plan de trabajo.

A continuación, se presentan las tareas asociadas a este trabajo final de grado:

1. Caracterización composicional del sustrato de partida en términos de humedad, y contenido en proteínas, lípidos, carbohidratos y cenizas.
2. Inoculación y fermentación en estado sólido de lenteja en grano y harina durante 14 días a 28 °C.
3. Determinación de las propiedades fisicoquímicas del sustrato fermentado a los diferentes tiempos de fermentación: pH, acidez, actividad de agua y sólidos solubles (°Brix)
4. Estimación de la actividad metabólica del hongo a través del seguimiento con el tiempo de fermentación de la tasa respiratoria, producción de biomasa (contenido en glucosamina) y bioconversión del almidón y proteínas en el sustrato fermentado.
5. Análisis de la actividad antioxidante por tres métodos diferentes y del contenido total en compuestos fenólicos en los sustratos fermentados a diferentes tiempos.
6. Cuantificación del contenido en ácido fítico en los sustratos fermentados a diferentes tiempos.
7. Análisis estadístico de los resultados obtenidos y estimación del tiempo óptimo de fermentación de acuerdo a la evolución en el tiempo de los parámetros analizados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materia prima.

En el presente trabajo se utilizó como sustrato lenteja en grano de la variedad Pardina, proporcionada por Molendum ingredients S.L. (Lote: 1901573) y harina de lenteja. Para la elaboración de la harina de lenteja, se trituraron los granos con una procesadora de alimentos Thermomix® TM-6.

La fermentación se llevó a cabo con el hongo *P. ostreatus*, adquirido en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (20311/ Lote 18-10-2016) (Universidad de Valencia, Valencia, España).

3.2 Reactivos químicos y bioquímicos.

El medio de cultivo se elaboró a partir de extracto de levadura, extracto de malta, glucosa y agar, suministrados por la casa comercial Scharlau (Spain).

Para las determinaciones analíticas, se utilizaron los siguientes reactivos: hidróxido de sodio (NaOH), acetilacetona ($C_5H_8O_2$), etanol (CH_3OH), metanol (CH_3CH_2OH), ácido gálico ($C_7H_6O_5$), Trolox ($C_{14}H_{18}O_4$), DPPH ($C_{33}H_{44}N_5O_6$), cloruro de hierro (III) hexahidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), TPTZ ($C_{18}H_{12}N_6$), ácido acético ($C_2H_4O_2$), ABTS ($C_{18}H_{24}N_6S_4$), reactivo Folin-Ciocalteu, ácido tioglicólico, persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$), ácido acético glacial, cloruro de calcio ($CaCl_2$) dihidrato, p-dimetilamino benzaldehído y glucosa, adquiridos de la casa comercial Sigma-Aldrich (Spain). El kit enzimático empleado en la determinación de almidón fue adquirido en la casa comercial Megazyme (Total starch AA/AMG assay, Megazyme, Ireland). Otros compuestos empleados fueron glucosamina (TCI Chemicals, USA), acetilacetona y ácido sulfúrico (H_2SO_4) de Carlo Erba Reagents (Spain), sulfato de amonio (III) ($NH_4Fe(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) y ácido clorhídrico (HCl) de AppliChem Panreac (USA), fitato de sodio de la casa comercial Biosynth Carbosynth® (USA) y carbonato de sodio (Na_2CO_3) de la casa comercial Scharlau (Spain).

3.3 Fermentación fúngica en estado sólido.

3.3.1 Diseño experimental.

El plan de trabajo establecido se diseñó en cuatro etapas: preparación del sustrato, inoculación del hongo, fermentación y determinaciones analíticas (durante y tras la fermentación), tal y como se muestra en la **Figura 2**.

Para poder analizar el proceso fermentativo y el crecimiento del hongo a diferentes tiempos se prepararon un total de 24 recipientes de vidrio con tapa (volumen de 250 mL) de lenteja en grano y 36 de harina de lenteja. Para los granos se realizaron análisis cada dos días, durante 14 días (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 días), con 3 réplicas por día. Por otro lado, para la harina los análisis se realizaron diariamente durante 8 días y cada dos días a partir del día 8, hasta completar las dos semanas (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 y 14 días), con 3 réplicas por día.

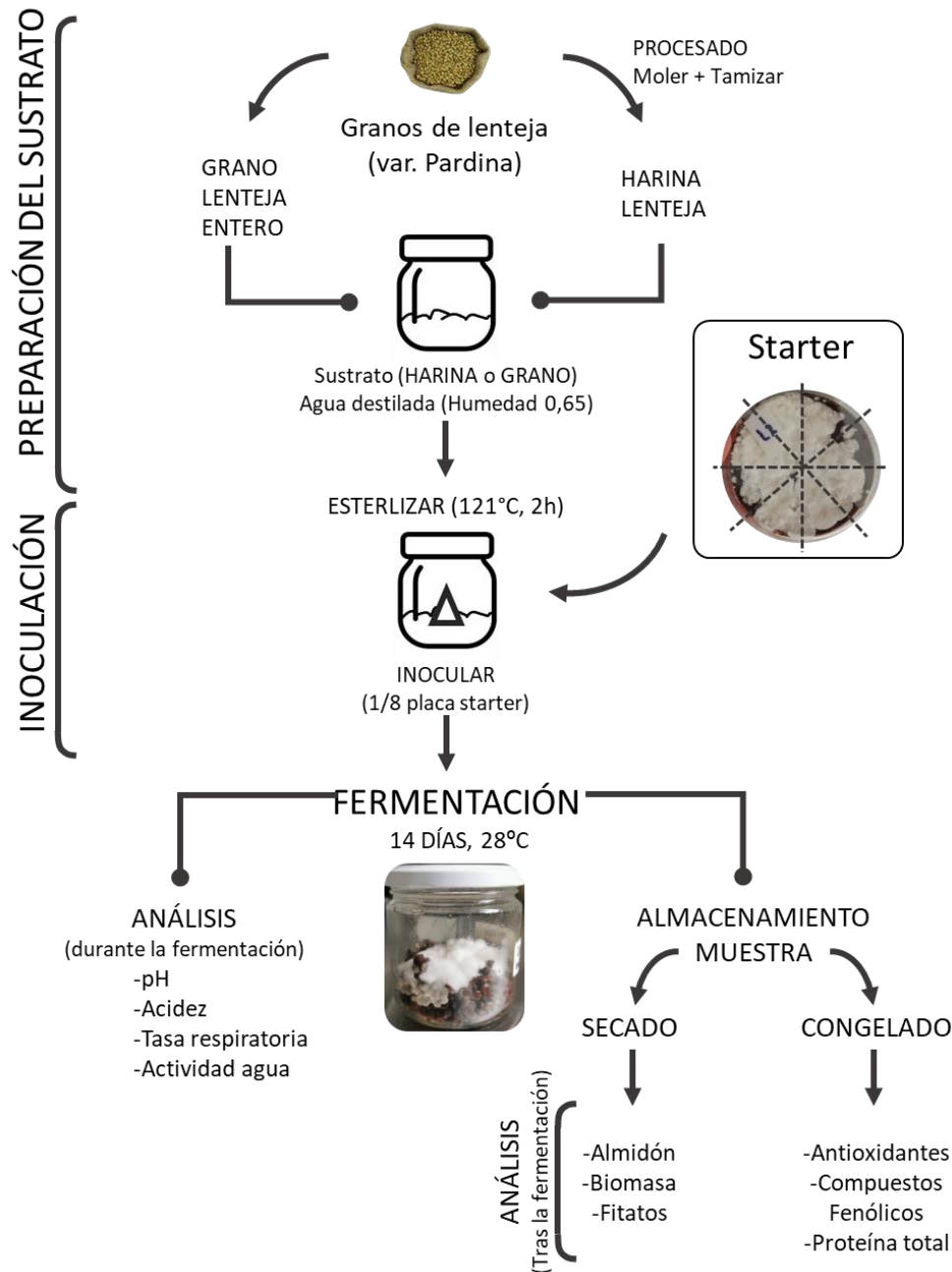


Figura 2. Plan de trabajo para llevar a cabo los objetivos planteados.

3.3.2 Preparación del inóculo.

En primer lugar, se tomaron colonias aisladas a partir de la cepa procedente del CETC y se sembraron en medio de cultivo sólido formado por 0,4% de glucosa, 0,4% de extracto de levadura, 0,1% de extracto de malta y 1,5% de agar y se dejaron las placas a 28°C durante 14 días. A partir de estas placas se inoculó parte del micelio obtenido en medio de cultivo líquido (0,4% de extracto de levadura, 0,4% de glucosa y 0,1% de extracto de malta) y se incubó un máximo de 14 días a 28°C.

El medio líquido de cultivo garantizó una distribución homogénea de esporas a partir de la cual se elaboró el cultivo iniciador para la fermentación. Para ello se pesaron placas Petri de vidrio y

se introdujeron 10 g de harina de lenteja y agua suficiente para alcanzar un 65% de humedad. Se esterilizaron a 121°C durante 20 minutos y se inocularon con 1 mL del cultivo de esporas, distribuyéndolo uniformemente por toda la superficie con un asa Digrafsky. Las placas se incubaron un máximo de 14 días a 28°C, hasta que el micelio ocupó de manera homogénea la superficie de la placa (**Figura 3**).



Figura 3. Placa de cultivo iniciador (inóculo) de *Pleurotus ostreatus* tras 14 días de incubación a 28°C.

3.3.3 Preparación del sustrato.

En recipientes de vidrio de 250 mL con tapa se introdujeron 35 g de sustrato (lenteja en grano o en harina) y se humidificaron hasta una humedad del 65 %. Se realizó un orificio en las tapas de los recipientes de vidrio para facilitar la medición de las concentraciones de dióxido de carbono y oxígeno en el espacio de cabeza a lo largo del proceso fermentativo. Se sellaron con esparadrapo quirúrgico para minimizar cambios en la composición del espacio de cabeza entre determinaciones. Posteriormente, los recipientes con el sustrato húmedo se esterilizaron a 121°C durante 20 minutos.

3.3.4. Inoculación del sustrato.

La inoculación del sustrato con el inóculo (**Figura 3**) se realizó en condiciones de asepsia en la campana de flujo laminar (Biostar Telstar®). Para ello, las placas del inóculo se dividieron en 8 porciones iguales con un cúter estéril y flameado en llama con etanol. Cada porción de placa se introdujo en cada uno de los frascos y se incubaron durante 14 días a 28°C (**Figura 4**).



Figura 4. Recipiente con granos de lenteja inoculadas con *P. ostreatus* tras 12 días de fermentación.

3.4 Determinaciones analíticas.

Previo proceso fermentativo se procedió con la caracterización nutricional de la materia prima, para lo cual se midió su contenido en humedad, proteína, grasa y cenizas, y se calculó el contenido en carbohidratos mediante balances de materia. Las determinaciones analíticas vinculadas a la fermentación se realizaron tanto en lenteja en grano como en harina de lenteja a diferentes tiempos de fermentación.

El contenido en azúcares solubles (°Brix), la actividad de agua, el pH y la acidez titulable se midió diariamente durante el proceso de fermentación. El resto de determinaciones se analizaron para cada uno de los tiempos planteados, una vez transcurridos los catorce días de fermentación (referidas como determinaciones post-fermentación). Para las determinaciones post-fermentación se almacenaron las muestras de la forma más adecuada para el desarrollo del protocolo. Parte de la muestra fresca se conservó a -20°C y sirvió para analizar la actividad antioxidante y contenido proteico. Otra parte (aproximadamente 100 g de muestra fresca) se secó en estufa a 60°C y sirvió para elaborar muestra seca fermentada a distintos tiempos, empleada para el análisis de biomasa, almidón y fitatos.

3.4.1 Caracterización composicional del sustrato en términos de en humedad, proteína, grasa, carbohidratos y cenizas.

Se analizó el contenido en humedad en ambos sustratos de acuerdo con el método oficial recogido por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales, AOAC (2000). Para ello, las muestras se introdujeron en la estufa a 60°C durante 48 horas y transcurrido el tiempo, se llevaron a la estufa a vacío 48 horas. El valor de humedad se calculó por la variación en la masa del sustrato antes y después del secado. El contenido en proteínas se determinó mediante el método Kjeldahl (AOAC, 2000). El contenido lipídico de los sustratos se determinó utilizando el método Soxhlet (AOAC, 2000), basado en la extracción de la grasa de la muestra utilizando éter de petróleo. Asimismo, se determinó el contenido en cenizas para así poder estimar el contenido en carbohidratos por balances de materia. Los resultados se calcularon de acuerdo al tanto por ciento presente en la muestra.

3.4.2 Contenido en sólidos solubles (°Brix).

Para la determinación de sólidos solubles durante la fermentación, se tomó 1 g de muestra fresca fermentada de ambos sustratos y se homogeneizó con 10 mL de agua destilada. La disolución del sustrato se midió con un refractómetro ATAGO™ Abbe NAR-3T.

3.4.3 Almidón.

El almidón total de las muestras almacenadas se estimó mediante un kit enzimático (Total starch AA/AMG assay, Megazyme) basando en el método Rapid Total Starch (RST). Los reactivos contenidos en el kit enzimático (α -amilasa termoestable -AM-, amilogucosidasa -AMG- y tampón reactivo GOPOD) se prepararon tal y como indicaba el fabricante. Los reactivos no

suministrados se prepararon como se indica a continuación, siguiendo las instrucciones especificadas en el kit: se preparó una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1,7 M y tres soluciones de tampón acetato de sodio con cloruro de calcio (ClCa₂) 5 mM a diferentes concentraciones de tampón (100 mM, 200 mM y 600 mM).

Para la determinación se tomaron 100 mg de muestra seca. A ello se le agregaron 10 mL de tampón acetato de sodio (100 mM, pH 5,0) más cloruro de calcio (5 mM). Se agitaron los tubos en un vortex (Heidolph Reax top) y se adicionó AM sin diluir. Los tubos se incubaron en un baño de agua hirviendo un total de 15 min, agitando en un vortex a los 2, 5, 10 y 15 min. Se atemperaron los tubos a 50°C, se adicionó 0,1 mL de AMG y se devolvieron a un baño a 50°C durante 30 min. Transcurrido ese tiempo se mezclaron las muestras por inversión. De cada tubo se tomaron 2 mL y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 min. Del sobrenadante se recuperó 0,1 mL, que se llevó a un tubo nuevo junto con 10 mL de tampón acetato de sodio (100 mM) más cloruro de calcio (5mM). Se adicionaron 3 mL del reactivo GOPOD y, tras 20min a 50°C se midió la absorbancia frente a un blanco (reagent blank), a 510 nm. Paralelamente, se realizó un blanco sin enzimas (Sample Blank, SB). El SB se realizó para cada muestra, sustituyendo la AM y AMG por tampón acetato de sodio (100 mM pH 5,0) más cloruro de calcio (5 mM) en la misma cantidad.

Para cada conjunto de determinaciones se incluyó un blanco sin muestra (reagent blank, RB). El RB se preparó mezclando 0,1mL de agua destilada con 3,0 mL de reactivo GOPOD. Asimismo, se desarrollaron controles de glucosa para cada conjunto de determinaciones utilizando 0,1 mL de solución estándar de glucosa (100 µg/0,1mL) con 3,0 mL de reactivo GOPOD. Con los valores de absorbancia para cada dilución de glucosa de concentración conocida se pudo estimar la cantidad de almidón presente en la muestra de acuerdo a la **Ecuación 1**.

$$\text{Almidón (\%)} = \Delta A \cdot F \cdot EV \cdot \frac{D}{W} \cdot 0,90 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

ΔA es la variación de absorbancia de las muestras analizadas con respecto al blanco, F es el factor de conversión calculado como 100 µg glucosa entre la absorbancia resultante de la reacción entre GOPOD y 100 µg de glucosa, EV es volumen de extracción de la muestra (mL), D es la dilución aplicada a la muestra y W es el peso de la muestra (mg).

Finalmente se calculó el porcentaje de variación relativa del contenido en almidón, con respecto al día 0 de fermentación, de acuerdo a la Ecuación 2.

$$\Delta M_{\text{almidón}}(\%) = \frac{(m_t \cdot A_t) - (m_0 \cdot A_0)}{m_0} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

ΔM es la variación en masa ($g_{\text{almidón}}/100g_{\text{muestra}}$), m_t es la masa de muestra fermentada durante t días (g), m_0 es la masa de la muestra control (tiempo 0, g), A_t es el contenido en almidón estimado en la muestra fermentada durante t días (%) y A_0 es el contenido en almidón estimado en la muestra control (tiempo 0).

3.4.4 Actividad de agua.

La actividad de agua se monitorizó durante toda la fermentación en ambos sustratos mediante el equipo AQUA LAB 4TE.

3.4.5 Tasa respiratoria.

Se midió diariamente el porcentaje de dióxido de carbono (CO₂) y oxígeno (O₂) presentes en el espacio de cabeza de los recipientes durante la fermentación utilizando el analizador de gas Dansensor CheckPoint 3 de la casa comercial Mocon. La tasa de respiración (TR) se determinó en términos de consumo de O₂ y de producción de CO₂, teniendo en cuenta la variación de la concentración de ambos gases analizados con el tiempo, según la **Ecuación 3** y **4**. De igual manera, se calculó el coeficiente de respiración (RQ), como el cociente entre la cantidad de CO₂ y la cantidad de O₂ en el espacio de cabeza del recipiente inoculado

$$TR_{O_2} (mL O_2 \cdot kg^{-1} \cdot día^{-1}) = \left[\frac{C_{O_2t} - C_{O_2t+1}}{\Delta t} \right] \cdot \frac{V_a}{M} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$TR_{CO_2} (mL CO_2 \cdot kg^{-1} \cdot día^{-1}) = \left[\frac{C_{CO_2t+1} - C_{CO_2t}}{\Delta t} \right] \cdot \frac{V_a}{M} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

O₂ y CO₂ son las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono en el espacio de cabeza (mL/mL aire), t es tiempo en días, V_a es el volumen de aire en el espacio de cabeza y M es la masa de sustrato en kg.

3.4.6 Determinación del pH.

Para medir el pH de las muestras, se tomaron 5 g de sustrato fermentado, homogeneizado con 20 mL de agua destilada. El pH se midió con un medidor de pH (Mettler Toledo Seven Compact).

3.4.7 Acidez titulable.

Para determinar la acidez se utilizó el método estandarizado propuesto por Rani *et al.* (2018). Para ello se tomaron 5 g de muestra y se homogeneizaron en 20 mL de agua destilada. La muestra se neutralizó con NaOH 0,5 M hasta alcanzar un pH de 8,20. El valor de acidez se calculó finalmente según la **Ecuación 5**.

$$\text{Ác. Láctico (\%)} = \frac{V_{NaOH} \cdot V_{final} \cdot m_{ácido}}{V_{muestra} \cdot m_{muestra} \cdot 1000} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

V_{NaOH} es el volumen de NaOH consumido (mL), V_{final} es el volumen final que se alcanzó tras la neutralización (mL), $m_{\text{ácido}}$ es el peso equivalente del ácido láctico (90,08 g/mol), V_{muestra} es el volumen de la muestra (mL) y m_{muestra} es la cantidad de muestra analizada (g).

3.4.8 Determinación de biomasa.

El crecimiento fúngico se pudo estimar a partir del contenido en glucosamina, producto de la hidrólisis de la quitina propia del hongo (Scotti *et al.* 2001). La cantidad de glucosamina se determinó mediante espectrofotometría a 530 nm, a partir de una recta de calibrado en la que se utilizó como estándar glucosamina.

A continuación, se detalla la metodología empleada para la hidrólisis de la quitina y para la determinación de glucosamina por espectrofotometría.

A) Hidrólisis de la quitina en N-acetil-glucosamina.

A 100 mg de la muestra seca fermentada se le adicionaron 2,4 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 72%) y se incubó a 25°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo se añadieron 55 mL de agua destilada y se esterilizó la mezcla durante 2 horas a 121°C para favorecer la hidrólisis de la quitina. Finalmente se neutralizó el hidrolizado hasta un pH 7 con NaOH (10M y 0,5M) empleando el medidor de pH.

B) Determinación de glucosamina.

Previamente se prepararon los reactivos necesarios para la determinación. El Reactivo de Ehrlick se elaboró a razón de 2,67 g de p-dimetilamino benzaldehído por 100mL de solución final, empleando como solvente una disolución 1:1 de etanol puro y ácido clorhídrico concentrado (HCl). El Reactivo de acetilacetona se preparó mezclando acetilacetona con una disolución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 0,5 N (ratio 1:50).

Para realizar la determinación se añadió 1mL de hidrolizado junto con 1mL de Reactivo de Acetilacetona en tubos de vidrio. Los tubos se llevaron a un baño con agua a 100°C durante 20 min. Transcurrido el tiempo y una vez enfriados los tubos, se adicionaron 6 mL de etanol para disolver el precipitado formado y 1 mL de Reactivo de Ehrlick. Las muestras se llevaron a incubación a 65°C durante 10 min. Finalmente, se dejaron enfriar y se realizó la medida en espectrofotómetro (Thermo scientific, modelo Helios Zeta UV/Vis) a una longitud de onda de 530 nm.

Se realizó también un blanco como control siguiendo el mismo procedimiento detallado anteriormente, sustituyendo el hidrolizado por la cantidad equivalente de agua destilada.

La estimación de la cantidad de glucosamina se realizó a partir de una recta de calibrado con glucosamina comprendida entre 0-0,5 mg/mL. Finalmente se expresaron los resultados como variación relativa con respecto al tiempo 0 de la fermentación, de acuerdo a la **Ecuación 6**. Cabe señalar que el contenido en glucosamina puede expresarse como cantidad de biomasa fúngica utilizando el factor de conversión de 0.057 mg $\text{glucosamina}/1 \text{ mg hongo seco}$ (Schmidt y Furlong, 2012).

$$\Delta M_{\text{glucosamina}}(\%) = \frac{(m_t \cdot G_t) - (m_0 \cdot G_0)}{m_0} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

ΔM es la variación en masa ($\text{g}_{\text{Glucosamina}}/100\text{g}_{\text{muestra}}$), m_t es la masa de muestra fermentada durante t días (g), m_0 es la masa de la muestra control (tiempo 0, g), G_t es el contenido en glucosamina estimado en la muestra fermentada durante t días ($\text{g}_{\text{Glucosamina}}/\text{g}_{\text{materia seca}}$) y G_0 es el contenido en glucosamina estimado en la muestra control (tiempo 0, $\text{g}_{\text{Glucosamina}}/\text{g}_{\text{materia seca}}$).

3.4.9 Actividad antioxidante.

Para analizar la actividad antioxidante de las muestras es necesario realizar una extracción de compuestos hidrosolubles. En primer lugar, se tomaron 0,5 g de muestra fresca conservada a -20°C , previamente atemperada, y se le adicionó 10 mL de metanol 80%. Tras 2h en agitación a 55 rpm y a 25°C se centrifugaron las muestras a 8000 rpms durante 10 minutos, para separar el sobrenadante (el extracto metanólico) del precipitado. Cabe destacar que se trabajó en condiciones de oscuridad para evitar la fotodegradación de los compuestos antioxidantes. Posteriormente a la extracción se analizó la actividad antioxidante mediante tres métodos que se detallan a continuación:

A) ABTS.

Este ensayo se basa en la capacidad de los compuestos antioxidantes de la muestra de reducir el radical ABTS^+ . Para ello se preparó una disolución a partir de ABTS ($\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{S}_4$ 7,4 mM) y persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 2,6 mM), mezcladas en un ratio 1:1. Esta disolución se dejó incubando un mínimo de 12 h en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente para que así se produjese la formación del radical ABTS^+ .

Transcurrido el tiempo se diluyó en metanol puro en proporción 1:1 y se midió la absorbancia de dicha dilución a 734 nm (Thermo scientific, modelo Helios Zeta UV/Vis) para asegurar que la absorbancia era de $1,1 \pm 0,02$. Posteriormente se prepararon las muestras en cubetas de plástico desechables de 4 mL de capacidad. Para ello se dispensaron 2,85 mL de la disolución diluida en metanol, 75 μL de extracto metanólico o de metanol al 80% (en caso del blanco) y 75 μL de metanol 80% y se dejó en incubación en oscuridad durante 2 horas. La medida se realizó transcurridas 2h de incubación.

Para la cuantificación de la actividad antioxidante se realizó una recta de calibrado utilizando como patrón el compuesto Trolox (análogo a la vitamina E), comprendida entre 0-200 mg/mL. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de Trolox por gramo de muestra.

B) DPPH.

El fundamento de esta medida se basa en la capacidad de los compuestos antioxidantes presentes en la muestra de reducir el radical DPPH a DPPH-H. Para ello se preparó una disolución

madre de DPPH ($C_{33}H_{44}N_5O_6$) a una concentración de 0,041 mg/mL en metanol al 100% y se midió su absorbancia en el espectrofotómetro (Thermo scientific, modelo Helios Zeta UV/Vis) a una longitud de onda de 515 nm para asegurar una absorbancia de $1,1 \pm 0,02$. Para el análisis de las muestras se utilizaron cubetas desechables de 4 mL en las que se adicionaron 2,92 mL de disolución madre y 75 μ L de extracto metanólico y se mantuvieron en reposo y oscuridad durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia en el espectro visible por espectrofotometría a 515 nm.

La actividad antioxidante se cuantificó a partir de una recta de calibrado elaborada a partir del compuesto Trolox (análogo a la vitamina E), comprendida entre 0-200 mg/mL. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de Trolox por gramo de muestra.

C) FRAP.

Este método se fundamenta en la cantidad de compuestos antioxidantes presentes en la muestra que pueden reducir el Fe^{3+} presente en el reactivo TPTZ a Fe^{2+} . Para ello se preparó una disolución a partir de buffer acetato (300 mM, pH 3,6), TPTZ (10 mM TPTZ $C_{18}H_{12}N_6$ en HCl (40 Mm)) y cloruro de hierro (20 mM $FeCl_2 \cdot 6H_2O$) en proporción 10:1:1 respectivamente. La disolución se llevó a 37°C y, seguidamente, se midió su absorbancia por espectrofotometría a 593 nm (Thermo scientific, modelo Helios Zeta UV/Vis) para corroborar que esta era muy próxima a 0. Para la realización de la medida, se utilizaron cubetas desechables de plástico de 4 mL de capacidad en las que se adicionó 2,85 mL de disolución preparada y 150 μ L de extracto metanólico y se mantuvieron en reposo y oscuridad durante 30 minutos. La medida de absorbancia se realizó tras el tiempo de incubación por espectrofotometría (espectrofotómetro Thermo scientific, modelo Helios Zeta UV/Vis) y a una longitud de onda de 593 nm.

Para la cuantificación de la actividad antioxidante se realizó una recta de calibrado utilizando como patrón el compuesto Trolox (análogo a la vitamina E), comprendida entre 0-125 mg/mL. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de Trolox por gramo de muestra.

3.4.10 Polifenoles totales.

Los fenoles son compuestos hidrosolubles que necesitan ser extraídos de la muestra previo análisis. Para ello, se utilizó el mismo método de extracción explicado anteriormente (sección 3.4.9). El análisis de polifenoles totales se realizó mediante el ensayo de Folin-Cicalteu, de acuerdo al trabajo publicado por Chang *et al.* (2006). La medida se realizó en cubetas de plástico de 4 mL de capacidad en las que se adicionaron 125 μ L de extracto metanólico, 0,5 mL de agua bidestilada y 125 μ L de compuesto Folin y se dejó incubar durante 5 minutos. Posteriormente se adicionó 1,25 mL de carbonato de sodio (Na_2CO_3 , 7% p/v) y se incubó durante 30 min más. Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia por espectrofotometría a una longitud de onda de 760 nm (Thermo scientific, modelo Helios Zeta UV/Vis).

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó una recta de calibrado utilizando como estándar ácido gálico (0-200 mg/ml). Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico por gramo de muestra.

3.4.11 Fitatos.

El procedimiento se basó en el propuesto por Peng *et al* (2010). En primer lugar, se preparó solución férrica a partir de Sulfato de Amonio Hierro (III) ($\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) y ácido clorhídrico (HCl 2M) (0,2 % p/v), ajustando el volumen final a 1L con agua destilada. También se preparó solución de biperidina utilizando 2, 2'-biperidina y ácido tioglicólico (1g/mL), ajustando el volumen a 100 mL con agua destilada.

Para realizar la extracción se tomaron 50 mg de muestra seca del sustrato y 10 mL de HCl 0,2 M, se agitaron e incubaron toda la noche a 4°C. Posteriormente se tomaron 0,5 mL de sobrenadante y se transfirieron a tubos de vidrio junto con 1 mL de solución férrica. Se llevaron las muestras a un baño de agua hirviendo durante 30 min y, tras enfriarlas, se adicionaron 2 mL de solución de biperidina. Se homogenizó con un vortex (Heidolph Reax top) durante unos segundos y se midió inmediatamente la absorbancia a 519 nm.

Para estimar la cantidad de fitatos en la muestra se utilizó como estándar ácido fítico. Partiendo de una solución madre de ácido fítico en HCl 0,2 M (0,7 mg/mL) se realizó una recta de calibrado (0-0,15 mg/ml). Los resultados se expresaron como mg de ácido fítico por gramo de muestra.

3.4.12 Contenido proteico.

La cantidad de proteína durante la fermentación de la lenteja en grano y en harina se determinó a partir del método Kjeldahl, según AOAC (2000). Los resultados se expresaron como variación relativa con respecto al tiempo 0 de la fermentación, de acuerdo a la **Ecuación 7**.

$$\Delta M_{\text{proteína}}(\%) = \frac{(m_t \cdot P_t) - (m_0 \cdot P_0)}{m_0} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

ΔM es la variación en masa ($\text{g}_{\text{proteína}}/100\text{g}_{\text{muestra}}$), m_t es la masa de muestra fermentada durante t días (g), m_0 es la masa de la muestra control (tiempo 0, g), P_t es el contenido en proteína estimado en la muestra fermentada durante t días ($\text{g}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{materia seca}}$) y P_0 es el contenido en glucosamina estimado en la muestra control (tiempo 0, $\text{g}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{materia seca}}$).

3.4 Análisis estadístico.

Las posibles diferencias significativas entre tiempos de fermentación para un mismo sustrato y entre tiempos de fermentación para distintos sustratos se evaluaron mediante análisis de varianza unifactoriales (ANOVA), con nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$) mediante el programa Stargraphics Centurion XIX. Igualmente, se realizaron análisis de correlación de Pearson para establecer asociaciones entre la actividad antioxidante y el contenido en fenoles y entre la estimación de biomasa, proteína y almidón. El tratamiento estadístico se realizó en todas las réplicas ($n = 3$) de cada sustrato.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de la materia prima de partida.

La materia prima se caracterizó nutricionalmente previo establecimiento del proceso fermentativo. Para ello se analizó el contenido en proteína, grasas, humedad y cenizas de los sustratos escogidos, esto es, lenteja en grano y harina de lenteja. Además, se estimó el contenido en carbohidratos a partir de balances de materia. La composición aproximada se recoge en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Caracterización composicional del sustrato de partida: lenteja Pardina en grano y harina.

	Lenteja en grano	Harina de lenteja
Proteína (g proteína/g total)	0,290 ± 0,004 (a)	0,295 ± 0,003 (a)
Grasas (g grasas/g total)	0,0078 ± 0,0007 (a)	0,0109 ± 0,0009 (a)
Carbohidratos (g carbohidratos/g total)	0,585 ± 0,006 (a)	0,585 ± 0,005 (a)
Humedad (g agua/g total)	0,0922 ± 0,0004 (a)	0,0855 ± 0,0002 (b)
Cenizas (g cenizas/g total)	0,0250 ± 0,0008 (a)	0,0236 ± 0,0005 (a)

*(a-b): Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los macronutrientes de los dos sustratos.

Limón *et al.* (2015) señala que la abundancia relativa de los macronutrientes del sustrato está directamente relacionada con el desarrollo del propio proceso fermentativo en estado sólido, con el crecimiento del microorganismo y con el impacto del mismo en las características finales del producto. Con perspectivas a una aplicación industrial y económica en el contexto alimentario, autores como Michael *et al.* (2011) han discutido que cierta variación en el sustrato de partida puede modificar el contenido en proteína del propio hongo, entre otros nutrientes. De esta manera, es conveniente corroborar si el material de partida en ambos casos tiene una composición inicial similar. Tras el análisis estadístico entre sustratos se puede confirmar que las diferencias macromoleculares no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$), y que las variaciones entre un sustrato y otro radican únicamente en el tamaño de partícula y en el área superficial disponible para la acción enzimática del hongo. Por el contrario, la diferencia entre el contenido en humedad sí resultó estadísticamente significativa entre el grano y la harina ($p < 0,05$). No obstante, la humedad de la materia prima se ajustó al 65% durante la preparación del sustrato, adicionando la cantidad necesaria de agua destilada (ver apartado 3.3.3). Por este motivo, se descarta que esta variación haya tenido un impacto negativo en el desarrollo fúngico.

Como se adelantaba, el uso del sustrato por parte del hongo *Pleurotus spp.* dependerá de su capacidad de secretar determinadas enzimas (principalmente de tipo oxidativas e hidrolíticas) que le permitan metabolizar sustratos ricos en lignocelulosas (Luz *et al.*, 2012), es decir, carbohidratos complejos como la fibra. Por tanto, la composición del sustrato influirá significativamente a la maquinaria metabólica y enzimática del hongo. El trabajo de Espinosa-Páez *et al.* (2017) permite ejemplificar esto último y su relación con el sustrato, pues señala como la fermentación con el hongo *Pleurotus ostreatus* tiene un impacto diferencial en el

contenido en fibra de avena y judías negras fermentadas (una reducción del 22% y 59%, respectivamente). Contrariamente, el impacto del mismo hongo evaluado en otra variedad de judía supuso un incremento de la fibra dietética en un 16%.

4.2 Cinética de crecimiento de *Pleurotus ostreatus*.

Una vez se inocula el sustrato con el hongo y a medida que avanzan los días de fermentación, se produce un proceso de bioconversión del sustrato en biomasa, resultando en una variación neta de los macronutrientes y micronutrientes. Para lograr este objetivo, el hongo ha de ser capaz de desarrollarse adecuadamente en el medio disponible.

Uno de los objetivos del presente trabajo fue el de evaluar la cinética de crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* tanto en lenteja en grano como en harina. Así, se ha de tener en cuenta como la abundancia relativa de oxígeno y dióxido de carbono afecta directamente al crecimiento del microorganismo (Bellettini *et al.*, 2019). Por este motivo, y con la intención añadida de mantener un control sobre las condiciones de crecimiento del hongo y del propio proceso fermentativo, se analizó la composición del aire en el espacio de cabeza del sistema de fermentación a lo largo del proceso. Los resultados se muestran en la **Figura 5** y **Figura 6**.

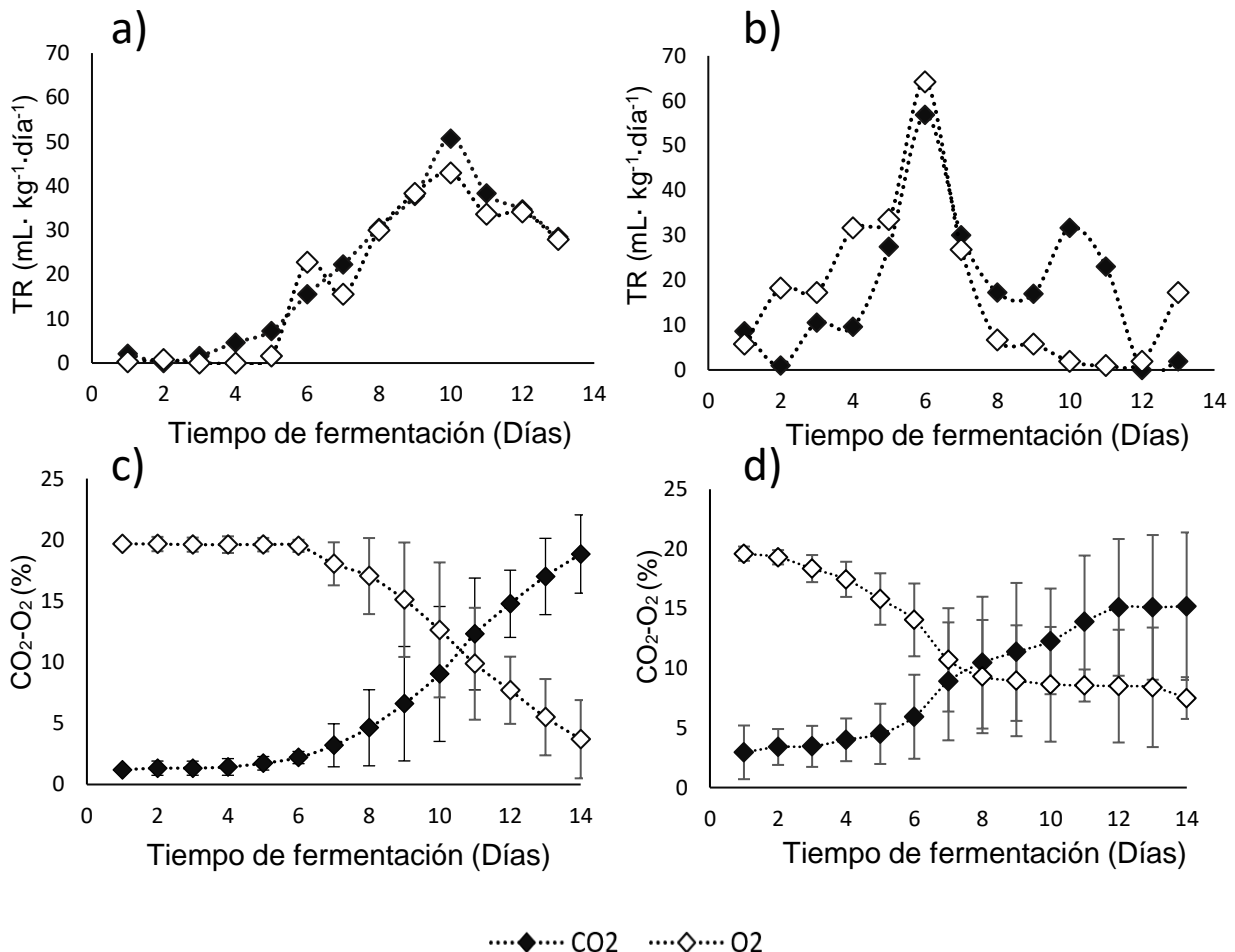


Figura 5. Tasa de respiración (TR) de O₂ y CO₂ en términos de consumo o producción, respectivamente, estimados en granos de lenteja inoculados (a) y en harina de lenteja inoculada (b) durante el proceso fermentativo. Se representa también la evolución de la atmósfera del espacio de cabeza (%CO₂ y %O₂) en granos de lenteja inoculados (c) y harina de lenteja inoculada (d). Los marcadores representan los valores medios (n=3) y las barras la desviación estándar.

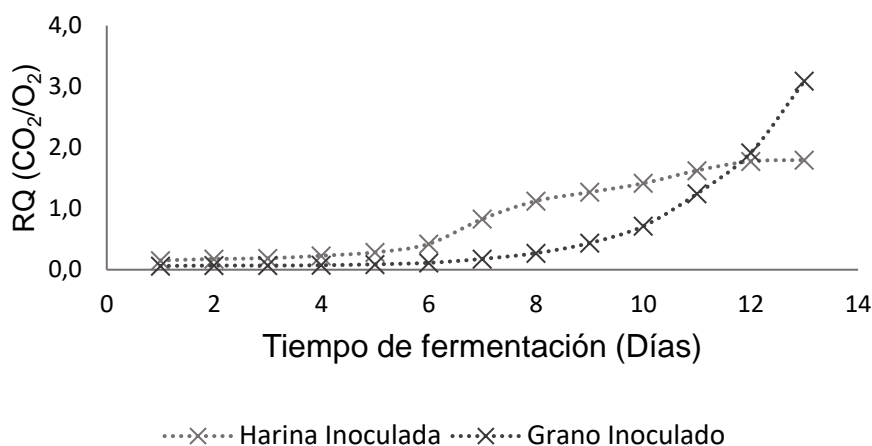
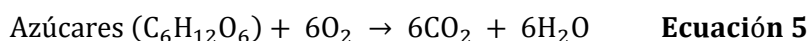


Figura 6. Coeficiente de respiración (RQ) en harina de lenteja inoculada y grano inoculado durante el proceso fermentativo

La tasa de respiración aporta información sobre el consumo y producción de oxígeno y dióxido de carbono, respectivamente. Dada la íntima conexión entre la respiración y el metabolismo, a partir de estos datos se puede monitorizar el desarrollo de biomasa durante la fermentación en estado sólido (Manan y Webb, 2021). Así pues, se aprecia que la TR en ambos sustratos ensayados (**Figura 5.a** y **5.b**), tanto para O₂ como para CO₂, aumenta a medida que avanza la fermentación. Esto quiere decir que el consumo de O₂ incrementa a la vez que lo hace la producción de CO₂. Durante los primeros días de fermentación, los bajos valores de TR sugieren que el microorganismo se encuentra en una fase de crecimiento estacionario (lento) que duraría hasta el día 5 en grano y el día 3 en harina. A partir de entonces el valor de TR crece hasta alcanzar la máxima tasa de consumo y producción (día 10 para grano y 6 para harina). Esta fase coincidiría con la fase de crecimiento exponencial del hongo. De igual manera, se aprecia como el consumo de O₂ y producción de CO₂ disminuyen. Este descenso corresponde a una etapa de crecimiento pausado, donde las esporas fúngicas activas mantienen su metabolismo (Manan y Webb, 2021).

Las **Figuras 5.c** y **5.d** representan la concentración de CO₂ (%) y O₂ (%) en el aire del espacio de cabeza a lo largo de la fermentación, y la **Figura 6** el cociente de respiración (RQ), calculado como el cociente entre la concentración de CO₂ y la concentración de O₂, también del espacio de cabeza. La evolución de estos gases en el medio fermentativo muestra como para el último día de fermentación predomina el dióxido de carbono sobre el oxígeno, encontrándose el equilibrio entre ambos gases (con un RQ ~1) a los 10 y 8 días para grano y harina, respectivamente. Cabe señalar que el RQ aporta información adicional sobre la población fúngica implicada en el proceso fermentativo y acerca de su actividad metabólica. Esto está relacionado con las reacciones metabólicas que se suceden dependiendo de si la fermentación se desarrolla en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis. De acuerdo al trabajo de Manan y Webb (2021), un RQ < 1 significaría que la fermentación ocurre en aerobiosis. Por el contrario, un RQ > 1 indica un bajo uso del oxígeno y que, por tanto, el hongo se encuentra en condiciones de anaerobiosis y sucede la fermentación de la glucosa, de acuerdo a la **Ecuación 5**. De esta manera, la fermentación de *P. ostreatus* en granos de lenteja se desarrollaría en anaerobiosis a partir del día 10, mientras que para harina de lenteja ocurriría a partir del día 8.



El hongo evaluado en el presente trabajo es ampliamente conocido por su metabolismo lignocelulósico (Adebayo y Martínez-Carrera, 2015). Así, y de acuerdo a ciertos estudios, *P. ostreatus* libera enzimas como celulasas, hemicelulasas o lacasas que permiten el uso de la fibra (principalmente insoluble) para su crecimiento y que aumentarían la disponibilidad de carbohidratos simples en el medio (Vega y Franco, 2013). Los resultados del contenido en almidón parecen apoyar la premisa de que durante la fermentación el hongo sería capaz de utilizar como fuente de carbono para su crecimiento azúcares fermentables resultantes de la hidrólisis de carbohidratos complejos. Esto se puede observar en la **Figura 7**, que muestra como la variación del contenido en almidón del sustrato disminuye de forma estadísticamente significativa a lo largo de la fermentación ($p < 0,05$). No obstante, el almidón se trata de un hidrato de carbono complejo de tipo soluble, por lo que no se esperaría que fuera la principal fuente de carbono del hongo. La variación neta negativa del almidón sugiere que el tipo de sustrato y las condiciones de crecimiento afectan a la acción enzimática y que el hongo es capaz de ajustar el metabolismo y su sistema enzimático a las condiciones del medio en el que se desarrolle (Espinosa-Páez *et al.*, 2017). En este sentido la disponibilidad de los nutrientes y requerimientos es esencial. No obstante, la evaluación del contenido en fibra de la materia prima y de las muestras fermentadas sería muy interesante, a fines de establecer una correlación más acertada de lo anteriormente comentado.

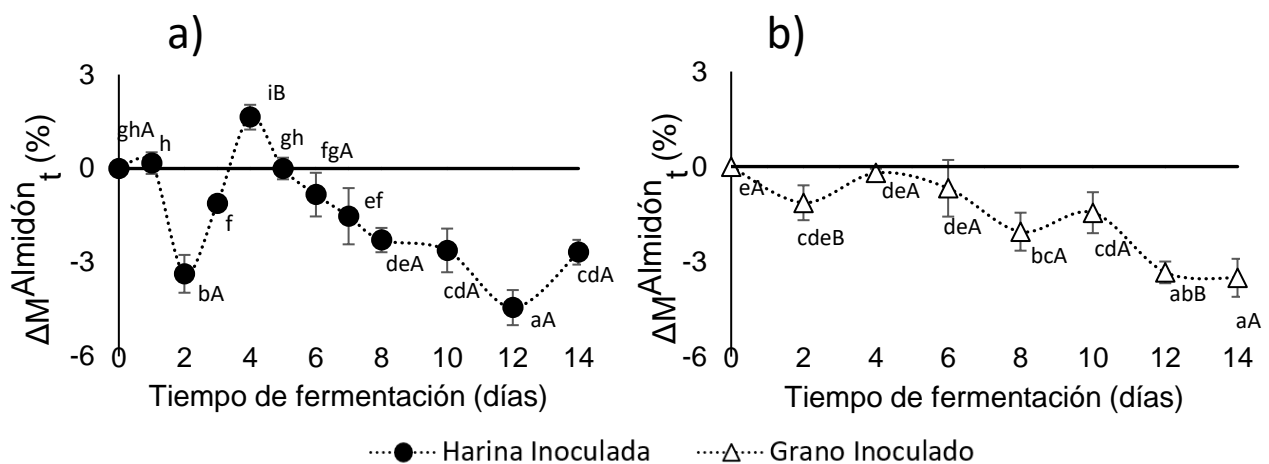


Figura 7. Variación neta de almidón total (%) en harina de lenteja (a) y lenteja en grano a lo largo de la fermentación en estado sólido con *P. ostreatus*. Los marcadores representan los valores medios (n=3) y las barras la desviación estándar.

* (a-i): Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el contenido en almidón entre los diferentes tiempos de fermentación para cada sustrato.

* (A-B): Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el contenido en almidón entre ambos sustratos para cada tiempo.

El análisis de biomasa por estimación de glucosamina (**Figura 8.a**) muestra como el hongo se desarrolla de forma eficiente, coincidiendo con los resultados de la TR (**Figura 5.a y 5.b**). Además, al igual que ocurre con otras especies del género *Pleurotus*, el crecimiento de *P. ostreatus* se optimiza cuando en el espacio de cabeza se alcanza una concentración de CO_2 de entre el 16 y el 22%. Esto se traduce en que el aumento de la concentración de CO_2 tiene un impacto positivo en el crecimiento del hongo (Zadrazil, 1975), lo que concuerda con la evolución del contenido de biomasa evaluada en este trabajo (**Figura 8.a**). Así, se puede observar cómo en los últimos días de fermentación (días 12-14) se produce un aumento notable en la variación de la biomasa en las muestras, coincidiendo con un 15-19% de CO_2 en el espacio de cabeza.

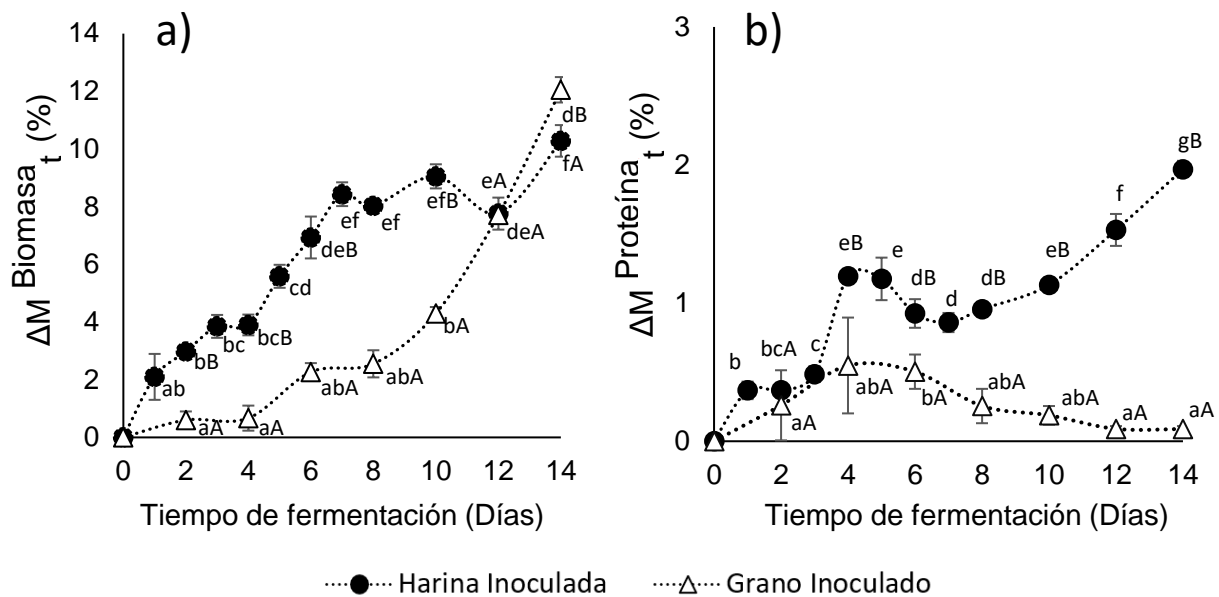


Figura 8. Variación neta de biomasa (a) y de proteína (b) (%) en el sustrato (lenteja en grano o harina) a lo largo de la fermentación en estado sólido con *P. ostreatus*. Los marcadores representan los valores medios (n=3) y las barras la desviación estándar.

*(a-f): Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el contenido en biomasa y proteína entre los diferentes tiempos de fermentación para cada sustrato.

*(A-B): Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el contenido en biomasa y proteína entre ambos sustratos para cada tiempo.

La variación neta del contenido en proteína (**Figura 8.b**) aumentó significativamente en las harinas fermentadas, con un incremento de aproximadamente un 2% en el día 14 de fermentación. La tendencia fue diferente en el caso de los granos de lenteja, donde la máxima variación en el contenido de proteína se observó en el día 4 de fermentación (aproximadamente un 0,5%). En este último sustrato, el incremento una vez finalizada la fermentación fue de un 0,1 % con respecto al sustrato no fermentado. El impacto positivo del hongo sobre el sustrato coincide con la capacidad de síntesis de aminoácidos por parte de *P. ostreatus* (Espinosa-Páez *et al.*, 2017). No obstante, la diferencia significativa entre harina y grano sugiere que el impacto del hongo sobre el contenido proteico es diferente según las características del sustrato, y que, en este caso, dependerían de la estructura del sustrato y de la accesibilidad a los nutrientes (Bautista Justo *et al.*, 1998).

A partir del análisis preliminar e individual de cada conjunto de datos, se realizaron correlaciones de Pearson para comprobar si existía una relación estadísticamente significativa entre biomasa, almidón y proteína. El análisis estadístico aplicado a los resultados en harina deja ver que existe una correlación positiva entre el contenido de biomasa y proteína (0,8173 ($p < 0,05$)) y una correlación negativa entre el contenido en biomasa y almidón (-0,5169 ($p < 0,05$)). Esto implica que el aumento de proteína y la disminución de almidón se acompaña con el crecimiento del hongo. De la misma manera, en el grano fermentado se aprecia una ligera correlación positiva entre el contenido de biomasa y proteína, pero estadísticamente significativa (0,1011 ($p < 0,05$)), y una fuerte correlación negativa entre el contenido en biomasa y almidón (-0,8019 ($p < 0,05$)).

4.3 Impacto de la fermentación en las propiedades fisico-químicas del sustrato.

El control fisico-químico del sustrato a lo largo de la fermentación en estado sólido es esencial para favorecer el crecimiento del microorganismo. La actividad de agua (a_w) es un parámetro clave en el contexto de la SSF. Ya se ha comentado anteriormente como esta modalidad de fermentación se caracteriza por mantener una baja a_w que aporte el agua libre estrictamente necesaria como para que el microorganismo pueda desarrollarse, impidiendo a su vez la aparición de agentes bacterianos contaminantes (Soccol *et al.*, 2017). En este sentido también se ha de establecer un control sobre el pH y acidez, para corroborar que se adecúan a los requerimientos del microorganismo (Bellettini *et al.*, 2019). Cabe mencionar que estos dos parámetros también permiten controlar el crecimiento de bacterias indeseadas, pues generalmente reducen significativamente el pH (y aumentan la acidez) en procesos de fermentación en un periodo corto de tiempo (Ayyash *et al.*, 2018). Igualmente, el control fisico-químico puede ser interesante de cara a evaluar las propiedades organolépticas y con perspectivas a una aplicación industrial. El pH, la acidez o el contenido en sólidos solubles aportan información relevante en este sentido. Por todo ello, durante la fermentación se monitorizaron el pH, acidez titulable, sólidos solubles y actividad de agua (**Tabla 2**).

Tabla 2. Valores de pH, acidez titulable, sólidos solubles y actividad de agua en ambos sustratos durante la fermentación.

		pH	Acidez (% AL)	SS (°Brix)	a_w
Grano	t0	6,53 ± 0,05 (a)	0,312 ± 0,010 (a)	0,875 ± 0,010 (a)	0,9892 ± 0,00110 (a)
	t2	6,56 ± 0,04 (a)	0,300 ± 0,010 (a)	0,88 ± 0,03 (a)	0,9909 ± 0,0012 (b)
	t4	6,53 ± 0,07 (a)	0,300 ± 0,005 (a)	1,10 ± 0,10 (c)	0,9900 ± 0,0002 (ab)
	t6	6,63 ± 0,03 (b)	0,300 ± 0,010 (a)	1,00 ± 0,00 (bc)	0,9911 ± 0,0004 (b)
	t8	6,62 ± 0,10 (b)	0,301 ± 0,005 (a)	0,90 ± 0,10 (ab)	0,9908 ± 0,0011 (ab)
	t10	6,67 ± 0,11 (b)	0,32 ± 0,03 (a)	0,95 ± 0,05 (ab)	0,9907 ± 0,0014 (ab)
	t12	6,78 ± 0,15 (b)	0,294 ± 0,026 (a)	0,97 ± 0,09 (ab)	0,9915 ± 0,0004 (b)
	t14	7,3 ± 0,9 (b)	0,34 ± 0,03 (a)	0,88 ± 0,00 (ab)	0,9913 ± 0,00110 (b)
Harina	t0	6,43 ± 0,05 (cd)	0,318 ± 0,018 (ab)	0,97 ± 0,03 (ab)	0,9925 ± 0,0014 (d)
	t1	6,42 ± 0,02 (bcd)	0,30 ± 0,02 (a)	0,93 ± 0,06 (a)	0,9903 ± 0,0012 (abcd)
	t2	6,49 ± 0,04 (cd)	0,312 ± 0,019 (ab)	0,93 ± 0,06 (a)	0,991 ± 0,002 (cd)
	t3	6,3 ± 0,2 (a)	0,38 ± 0,04 (c)	0,97 ± 0,12 (ab)	0,9883 ± 0,0006 (a)
	t4	6,44 ± 0,07 (cd)	0,35 ± 0,02 (bc)	0,97 ± 0,03 (ab)	0,9904 ± 0,0018 (abcd)
	t5	6,30 ± 0,06 (ab)	0,38 ± 0,03 (c)	0,90 ± 0,00 (a)	0,9889 ± 0,0008 (abc)
	t6	6,470 ± 0,010 (cd)	0,366 ± 0,019 (c)	0,90 ± 0,10 (a)	0,9892 ± 0,0013 (abc)
	t7	6,37 ± 0,05 (abc)	0,39 ± 0,03 (c)	0,95 ± 0,00 (a)	0,9890 ± 0,0001 (abc)
	t8	6,48 ± 0,04 (cd)	0,354 ± 0,010 (bc)	0,90 ± 0,00 (a)	0,990 ± 0,002 (bcd)
	t10	6,41 ± 0,09 (abcd)	0,384 ± 0,006 (c)	1,05 ± 0,05 (b)	0,9903 ± 0,0014 (abcd)
	t12	6,38 ± 0,04 (abc)	0,447 ± 0,005 (d)	0,92 ± 0,03 (a)	0,9884 ± 0,0006 (ab)
	t14	6,52 ± 0,05 (d)	0,46 ± 0,04 (d)	0,98 ± 0,08 (ab)	0,9886 ± 0,0005 (ab)

Abreviaturas: SS, sólidos solubles; a_w , actividad de agua; t, tiempo; AL, ácido láctico

*(a-d): Existen diferencias significativas ($p < 0.05$).

Se puede apreciar como los valores de pH permanecen prácticamente invariables a lo largo de la fermentación, acotados entre 6,3 y 7,3. Algo similar sucede con los resultados de acidez (% ácido láctico). El trabajo desarrollado por Pranoto *et al.* (2013), señala como una bajada de pH se acompañaría con un aumento de la acidez titulable por acumulación de ácido láctico. De ello se puede deducir que la fermentación con *P. ostreatus* no tiene un impacto evidente en la acidificación o alcalinización del medio, al contrario que con otros hongos como *Aspergillus sojae* y *Aspergillum ficuum* durante la fermentación de altramuz (Olukomaiya *et al.*, 2020) o con otros microorganismos bacterianos como *Lactobacillus plantarum* en la fermentación del sorjo (Pranoto *et al.*, 2013). Por otro lado, y según el estudio desarrollado por Bellettini *et al.* (2019), un pH entre 4,0 y 7,0 resulta óptimo para el crecimiento del micelio fúngico, de forma que las condiciones de acidez del medio fueron las adecuadas para el crecimiento del mismo.

Por otro lado, las medidas de actividad de agua se mantuvieron constantes y estables a lo largo del proceso de fermentación, con medias de $0,9911 \pm 0,0009$ para granos y de $0,9898 \pm 0,0012$ para harina. Esto confirma que la disponibilidad de agua libre fue la adecuada y que no ha repercutido de forma negativa en el desarrollo del hongo.

El contenido en sólidos solubles tampoco varió de forma estadísticamente significativa, lo que sugiere que la fermentación con *P. ostreatus* no conllevó un aumento de la concentración de azúcares fermentables o análogos en el medio. Otra hipótesis es que el hongo metabolice rápidamente el azúcar libre disponible, tal y como se discutía en apartados anteriores.

4.4 Impacto de la fermentación en las propiedades antioxidantes, antinutrientes y compuestos bioactivos del sustrato.

Uno de los principales retos y objetivos en la fermentación de legumbres es la producción de ingredientes que presenten mayor actividad antioxidante que sus análogos sin fermentar, dado el interés de estos compuestos en cuanto a la protección frente al estrés oxidativo (Limón *et al.*, 2015). La SSF puede provocar cambios biológicos en el sustrato que culminen con la producción de metabolitos secundarios biológicamente activos con capacidad antioxidante (Dhull *et al.*, 2020), señalando entre ellos los compuestos fenólicos (Alshikh *et al.* 2015). La actividad antioxidante en el caso de los dos sustratos estudiados se ha determinado mediante tres ensayos generales (ABTS, DPPH y FRAP) (**Figura 9**), además de mediante una estimación de polifenoles totales (**Figura 10**). El ensayo de ABTS estima la habilidad relativa de los antioxidantes presentes en una muestra para reducir el radical ABTS (Ratnavathi y Komala, 2016). Por otro lado, el ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) permite determinar la capacidad de estos compuestos para reducir el Fe^{3+} contenido en el reactivo TPTZ en Fe^{2+} (Cerretani y Bendini, 2010). El ensayo de DPPH, por otro lado, permite evaluar el contenido en antioxidantes capaces de inhibir la oxidación lipídica, lo que se traduciría en la reducción del radical DPPH durante el ensayo (Škrovánková *et al.*, 2012). Cabe señalar que existen otros métodos de análisis de compuestos antioxidantes, los cuales difieren tanto en condiciones de desarrollo como en principio químico. Estas diferencias se traducen en una estimación diferencial de estos compuestos, de forma que es preferible incluir diferentes ensayos.

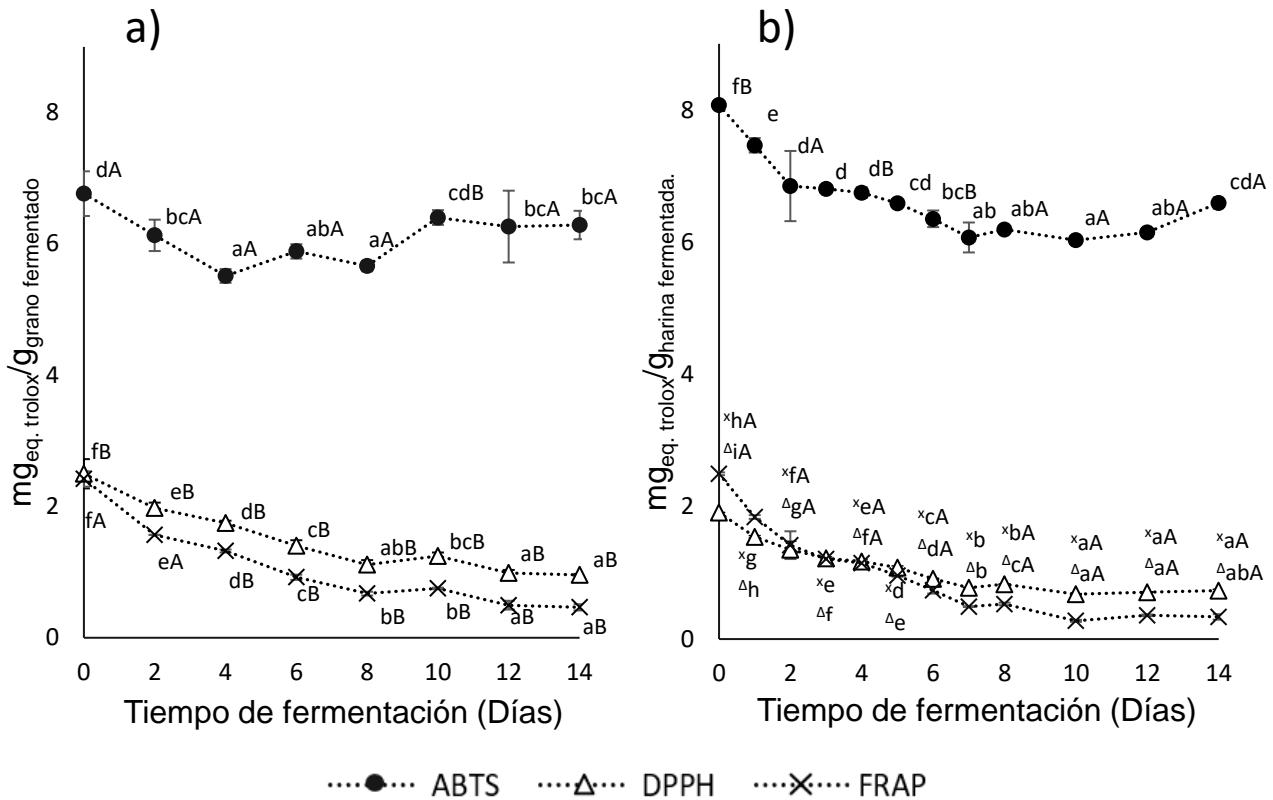


Figura 9. Efectos de la fermentación con *P. ostreatus* sobre el contenido en antioxidantes en grano de lenteja (a) y en harina de lenteja (b), expresado como mg de Trolox (estándar) por gramo de muestra. Los marcadores corresponden al valor medio (n=3) y las barras representan la desviación estándar. Δ y \times señalan la significación estadística para DPPH y FRAP, respectivamente.

* (a-h): Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el contenido en antioxidantes entre los diferentes tiempos de fermentación para cada sustrato.

* (A-B): Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el contenido en antioxidantes entre ambos sustratos para cada tiempo.

Los resultados muestran una disminución del contenido en antioxidantes y polifenoles a lo largo del tiempo de fermentación en ambos sustratos, con diferencias estadísticamente significativas entre los días de fermentación (**Figura 9** y **Figura 10**). El potencial de los hongos para producir compuestos bioactivos, como son los antioxidantes, está íntimamente relacionado con la actividad enzimática vinculada a su crecimiento. Así pues, y contrariamente a lo esperado, tanto la actividad antioxidante como la presencia de compuestos fenólicos disminuyó ligeramente a medida que avanzó la fermentación con el hongo. A pesar de todo ello, se puede apreciar un ligero aumento en antioxidantes evaluados por ABTS en los últimos días de fermentación (**Figura 7**, ABTS), que pudiera estar vinculado a la liberación de otros compuestos antioxidantes más allá de los fenoles, como carotenoides o análogos a la vitamina E (Adebo y Gabriela Medina-Meza, 2020).

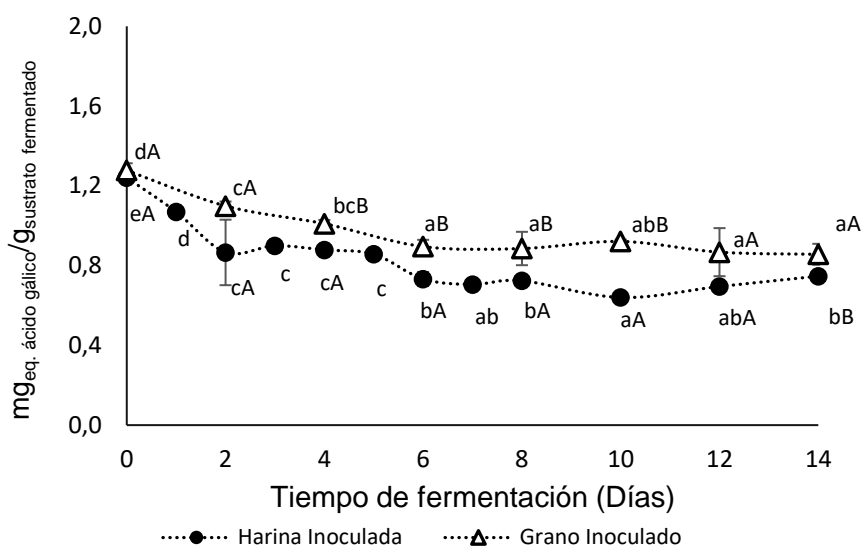


Figura 10. Efectos de la fermentación con *P. ostreatus* sobre el contenido en polifenoles en grano de lenteja y harina de lenteja, expresado como mg de ácido gálico (estándar) por gramo de muestra fermentada. Los marcadores corresponden al valor medio (n=3) y las barras a la desviación estándar. *(a-d): Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el contenido en almidón entre los diferentes tiempos de fermentación para cada sustrato. *(A-B): Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el contenido en almidón entre ambos sustratos para cada tiempo.

El estudio desarrollado por Magro *et al.* (2019) muestra como la fermentación de lentejas con el hongo *Aspergillus oryzae* tiene un impacto similar sobre los antioxidantes a medida que transcurren las horas de fermentación. En este caso, la actividad antioxidante estimada con DPPH disminuye de manera estadísticamente significativa de 5,82 a 5,73 $\mu\text{mol Trolox Equivalente} \cdot \text{g}^{-1}$ transcurridas 96 horas, al igual que sucede con el ensayo de ABTS. El estudio reportado por Limón *et al.* (2015) señala cómo la composición del sustrato y la elección del microorganismo juega un papel esencial en el aumento de la biodisponibilidad de compuestos antioxidantes. En este sentido, el hongo *P. ostreatus* empleado es capaz de secretar diferentes enzimas, entre las que se encuentran las lacasas (Espinosa-Páez *et al.* 2017). Estas enzimas son capaces de polimerizar, despolimerizar y transformar compuestos fenólicos, pudiendo aumentar su contenido en el medio o disminuirlo (Hur *et al.*, 2014). Otros estudios señalan como la disminución de actividad antioxidante puede estar relacionada con la degradación (Ohtman *et al.*, 2009) e hidrólisis de compuestos fenólicos (Adebo y Gabriela Medina-Meza, 2020) a medida que transcurre la fermentación. Hur *et al.* (2014) señala la necesidad de realizar estudios sobre la actividad e influencia de distintos organismos (y de sus enzimas) en cada sustrato, con el fin de establecer las condiciones de fermentación más adecuadas en cada caso. La temperatura es otro de los factores que pudieran estar asociados a la disminución de antioxidantes y compuestos fenólicos. Un aspecto a tener en cuenta en la determinación de fenoles es que, si bien el método basado en el reactivo Folin-Ciocalteu es ampliamente utilizado para este fin, otros compuestos más allá de los fenólicos son capaces de reducirlo, pudiendo afectar a los resultados obtenidos (Starzyńska-Janiszewska *et al.*, 2014)

Por otro lado, se estudió la posible relación entre los diferentes métodos antioxidantes. Para ello se realizó un análisis estadístico basado en correlaciones de Pearson entre los tres métodos analíticos de antioxidantes (ABTS, DPPH y FRAP) y contenido en polifenoles en ambos sustratos.

Los resultados para harina indican que existe una fuerte correlación lineal positiva entre los tres métodos de determinación de antioxidantes y fenoles ($r > 0,95$ ($p < 0,05$)), destacando DPPH ($r = 0,9623$). El caso de los granos de lenteja es similar, existiendo correlación lineal positiva entre los tres métodos con respecto al contenido en fenoles. No obstante, para este sustrato la correlación con mayor coeficiente se consiguió mediante el método FRAP ($r = 0,9472$ ($p < 0,05$)).

Otro aspecto importante a la hora de analizar nutricionalmente un alimento es su contenido en antinutrientes. Estos compuestos, tales como los fitatos, contribuyen a la disminución de la absorción de micronutrientes esenciales como son el calcio, hierro, zinc o magnesio (Peng *et al.*, 2010) y tienen un impacto negativo en la digestibilidad de la proteína (Espinosa-Páez *et al.* 2017). Las lentejas en este sentido presentan este inconveniente: poseen antinutrientes que limitan sus potenciales beneficios nutricionales. Así, la fermentación fúngica en estado sólido se presenta como estrategia para reducir el contenido en antinutrientes de determinados sustratos (Garrido-Galand *et al.*, 2021). Por este motivo, se decidió analizar la evolución en el contenido de fitatos en las muestras fermentadas con *P. ostreatus* (Figura 11).

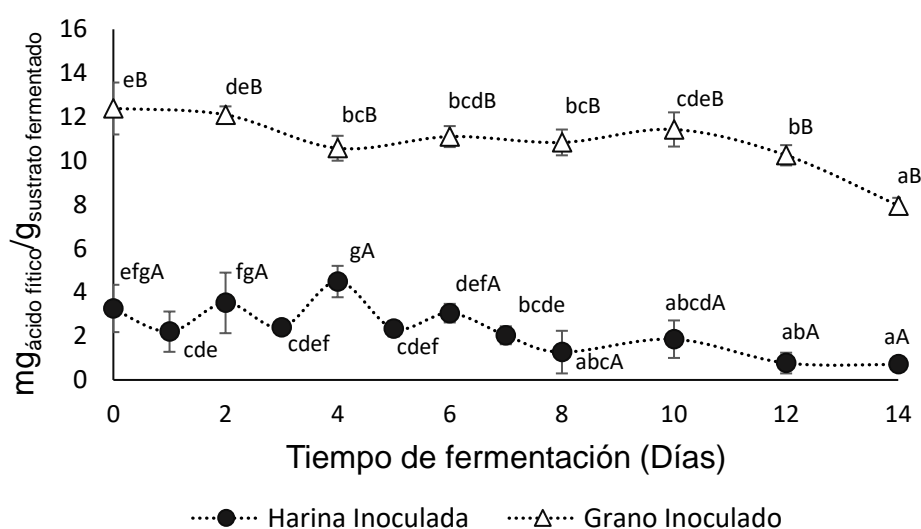


Figura 11. Efectos de la fermentación con *P. ostreatus* sobre el contenido en ácido fítico en grano de lenteja y en harina de lenteja, expresado como mg de ácido fítico por gramo de sustrato fermentado. Los marcadores corresponden al valor medio ($n=3$) y las barras representan la desviación estándar.

*(a-g): Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el contenido en almidón entre los diferentes tiempos de fermentación para cada sustrato.

*(A-B): Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el contenido en almidón entre ambos sustratos para cada tiempo.

La Figura 11 evidencia como se produce una disminución estadísticamente significativa en el contenido en antinutrientes al final del proceso fermentativo ($p < 0,05$). Este hecho coincide con otros trabajos desarrollados con este mismo microorganismo. Se puede señalar a modo de ejemplo el trabajo de Espinosa-Páez *et al.* (2017) sobre fermentación en judías con *P. ostreatus*, que favorece a la disminución del contenido en taninos, otro compuesto antinutricional. Además, posteriores trabajos de este grupo de investigación demostraron la correlación entre la disminución en antinutrientes con una mejor digestibilidad (Espinosa-Páez *et al.*, 2021). De esta forma, la disminución del contenido en ácido fítico en lenteja Pardina gracias al impacto del hongo *P. ostreatus* permitiría mejorar la digestibilidad del sustrato, aunque sería necesario realizar ensayos de digestión *in vitro* para confirmar estas hipótesis.

5. CONCLUSIONES

1. El plan experimental ejecutado y los resultados obtenidos han permitido caracterizar el impacto del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre dos sustratos: harina de lenteja y grano de lenteja. La diferencia entre ambos sustratos se encontraba únicamente en el tamaño de partícula y en el área superficial disponible para la acción hidrolítica del hongo.
2. La Tasa de Respiración, la evolución de la composición del aire en el espacio de cabeza y el Coeficiente de Respiración resultan ser parámetros útiles para la monitorización del proceso ya que proporcionan información acerca la fermentación en estado sólido con *P.ostreatus* en términos de disponibilidad de gases (aerobiosis o anaerobiosis).
3. El crecimiento del hongo se pudo estimar de forma eficiente a partir de la variación neta del contenido en glucosamina (biomasa). La evolución del contenido en glucosamina a lo largo de los días de fermentación depende del tipo de sustrato. No obstante, tras catorce días de fermentación los valores alcanzados en harina y en grano fueron similares. El contenido en proteína también aumentó en ambos sustratos con respecto al tiempo inicial al finalizar la fermentación, aunque el impacto en harina fue mucho más evidente, resultando en un 21% más de proteína que en grano. Además, se observó una fuerte correlación positiva entre el crecimiento del micelio fúngico y el aumento de proteína en el sustrato.
4. El contenido en almidón se redujo a lo largo del proceso fermentativo, lo que sugiere que *Pleurotus ostreatus* emplea este carbohidrato complejo como fuente de carbono para su crecimiento. En este caso, se observó una correlación negativa entre el desarrollo del hongo y la cantidad en almidón, indicando que a medida que crece el hongo, disminuye el almidón en el medio.
5. El pH, acidez, a_w y contenido en sólidos solubles del sustrato durante el proceso fermentativo se mantuvieron constantes a lo largo de la fermentación, tanto para harina de lenteja como para grano. Por tanto, las condiciones de crecimiento del hongo fueron estables durante todo el proceso fermentativo y sin impacto evidente en estos parámetros durante al menos catorce días.
6. Tanto el contenido en antioxidantes como el contenido en polifenoles disminuyeron tras la fermentación de los sustratos con *P. ostreatus*. La composición y estructura del sustrato, la elección del microorganismo o la maquinaria metabólica del propio hongo se señalan como factores clave que determinan estos resultados.
7. Por último, la fermentación tanto en lenteja en grano como de harina de lenteja con *P. ostreatus* redujo significativamente contenido de ácido fítico (antinutriente), lo que supone por tanto una mejora de la digestibilidad del producto final.

En definitiva, el tiempo óptimo de fermentación depende de las propiedades/características que se pretendan obtener en el producto fermentado. Para harina, el crecimiento fúngico y contenido proteico del material de partida aumentó tras la fermentación y alcanzó el máximo a los catorce días de fermentación, a la vez que el mínimo contenido en antinutrientes. Para grano, el máximo contenido en proteína se obtuvo al cuarto día de fermentación, mientras que la menor concentración en antinutrientes se alcanzó en el día catorce. Con vistas a una aplicación industrial y desarrollo de nuevos ingredientes, la fermentación en harina fue más eficiente en cuanto al contenido proteico y disminución de fitatos. No obstante, para escoger un sustrato u otro sería necesario repetir estos análisis tras la estabilización (secado) de ambos fermentados. De igual manera, se tendrían que realizar estudios de digestión *in vitro* para conocer el impacto del proceso fermentativo en grano o harina en la mejora la digestibilidad de los macronutrientes y bioaccesibilidad de compuestos bioactivos de interés para la salud humana.

6. REFERENCIAS

- ADEBAYO, E. A., & MARTINEZ-CARRERA, D. (2015). Oyster mushrooms (Pleurotus) are useful for utilizing lignocellulosic biomass. *African Journal of Biotechnology*, 14(1), 52-67.
- ADEBO, O. A., & GABRIELA MEDINA-MEZA, I. (2020). Impact of fermentation on the phenolic compounds and antioxidant activity of whole cereal grains: A mini review. *Molecules*, 25(4), 927.
- AGTE, V. V., GOKHALE, M. K., & PAKNIKAR, K. M. (1999). Effect of fermentation using baker's yeast on bioavailable iron and zinc from cereals and legumes. *Journal of Food Science and Technology(Mysore)*, 36(6), 551-554.
- ALSHIKH, N., DE CAMARGO, A. C., & SHAHIDI, F. (2015). Phenolics of selected lentil cultivars: Antioxidant activities and inhibition of low-density lipoprotein and DNA damage. *Journal of functional foods*, 18, 1022-1038.
- ALSHIKH, N., DE CAMARGO, A. C., & SHAHIDI, F. (2015). Phenolics of selected lentil cultivars: Antioxidant activities and inhibition of low-density lipoprotein and DNA damage. *Journal of functional foods*, 18, 1022-1038.
- AOAC, 2000. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. 15th Edition.
- ASENSIO-GRAU, A., CALVO-LERMA, J., HEREDIA, A., & ANDRÉS, A. (2020). Enhancing the nutritional profile and digestibility of lentil flour by solid state fermentation with *Pleurotus ostreatus*. *Food & Function*, 11(9), 7905-7912.
- ATLI, B., YAMAÇ, M., YILDIZ, Z., & ŞÖLENER, M. (2019). Solid state fermentation optimization of *Pleurotus ostreatus* for lovastatin production. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 53(9), 858-864.
- AYYASH, M., JOHNSON, S. K., LIU, S. Q., AL-MHEIRI, A., & ABUSHELAIBI, A. (2018). Cytotoxicity, antihypertensive, antidiabetic and antioxidant activities of solid-state fermented lupin, quinoa and wheat by *Bifidobacterium* species: In-vitro investigations. *Lwt*, 95, 295-302
- BAUTISTA JUSTO, M., ALANÍS GUZMÁN, M. G., GONZÁLEZ DE MEJÍA, E., & GARCÍA DÍAZ, C. L. (1998). Composición química de tres cepas mexicanas de setas (*Pleurotus ostreatus*). *Arch. latinoam. nutr*, 359-63.
- BECERRA-TOMÁS, N., PAPANDREOU, C., & SALAS-SALVADÓ, J. (2019). Legume consumption and cardiometabolic health. *Advances in Nutrition*, 10(Supplement_4), S437-S450.
- BELLETTINI, M. B., FIORDA, F. A., MAIEVES, H. A., TEIXEIRA, G. L., ÁVILA, S., HORNUNG, P. S., ... & RIBANI, R. H. (2019). Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(4), 633-646.
- BONNET, C., BOUAMRA-MECHEMACHE, Z., RÉQUILLART, V., & TREICH, N. (2020). Regulating meat consumption to improve health, the environment and animal welfare. *Food Policy*, 97, 101847.
- BOUCHENAK, M., & LAMRI-SENHADJI, M. (2013). Nutritional quality of legumes, and their role in cardiometabolic risk prevention: a review. *Journal of medicinal food*, 16(3), 185-198.

- CERRETANI, L., & BENDINI, A. (2010). Rapid assays to evaluate the antioxidant capacity of phenols in virgin olive oil. In *Olives and olive oil in health and disease prevention* (pp. 625-635). Academic Press.
- 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.
- CLEMENTE, A., & JIMENEZ-LOPEZ, J. C. (2020). Introduction to the Special Issue: Legumes as Food Ingredient: Characterization, Processing, and Applications.
- COUTO, S. R., & SANROMÁN, M. A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry—a review. *Journal of Food Engineering*, 76(3), 291-302.
- COUTO, S. R., & SANROMÁN, M. A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry—a review. *Journal of Food Engineering*, 76(3), 291-302.
- DAY, C. N., & MORAWICKI, R. O. (2016). Effects of fermentation by yeast and amylolytic lactic acid bacteria on grain sorghum protein content and digestibility. *Journal of Food Quality*, 2018.
- DHULL, S. B., PUNIA, S., KIDWAI, M. K., KAUR, M., CHAWLA, P., PUREWAL, S. S., ... & PALTHANIA, S. (2020). Solid-state fermentation of lentil (*Lens culinaris* L.) with *Aspergillus awamori*: Effect on phenolic compounds, mineral content, and their bioavailability. *Legume Science*, 2(3), e37.
- DUEÑAS, M., HERNÁNDEZ, T., ROBREDO, S., LAMPARSKI, G., ESTRELLA, I., & MUÑOZ, R. (2012). Bioactive phenolic compounds of soybean (*Glycine max* cv. Merit): modifications by different microbiological fermentations. *Polish journal of food and nutrition sciences*, 62(4).
- 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.
- ELKOWICZ, K., & SOSULSKI, F. W. (1982). Antinutritive factors in eleven legumes and their air-classified protein and starch fractions. *Journal of Food Science*, 47(4), 1301-1304.
- ESPINOSA-PÁEZ, E., ALANIS-GUZMÁN, M., 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), 2275.
- ESPINOSA-PÁEZ, E., HERNÁNDEZ-LUNA, C. E., LONGORIA-GARCÍA, S., MARTÍNEZ-SILVA, P. A., ORTIZ-RODRÍGUEZ, I., VERA, M. T. V., & CANTÚ-SALDAÑA, C. M. (2021). *Pleurotus ostreatus*: a potential concurrent biotransformation agent/ingredient on development of functional foods (cookies). *LWT*, 111727.
- FAO (2009). *How to feed the world in 2050*. Acceso: 15 Julio 2021

- GARRIDO-GALAND, S., ASENSIO-GRAU, A., CALVO-LERMA, J., HEREDIA, A., & ANDRÉS, A. (2021). The potential of fermentation on nutritional and technological improvement of cereal and legume flours: a review. *Food Research International*, 110398.
- GUPTA, S., LEE, J. J., & CHEN, W. N. (2018). Analysis of improved nutritional composition of potential functional food (Okara) after probiotic solid-state fermentation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(21), 5373-5381.
- HOCQUETTE, J. F. (2016). Is in vitro meat the solution for the future?. *Meat science*, 120, 167-176.
- HUR, S. J., LEE, S. Y., KIM, Y. C., CHOI, I., & KIM, G. B. (2014). Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food chemistry*, 160, 346-356
- KHAZAEI, H., SUBEDI, M., NICKERSON, M., MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C., FRIAS, J., & VANDENBERG, A. (2019). Seed protein of lentils: Current status, progress, and food applications. *Foods*, 8(9), 391.
- KRISHNA, C. (2005). Solid-state fermentation systems—an overview. *Critical reviews in biotechnology*, 25(1-2), 1-30.
- 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.
- LICANDRO, H., HO, P. H., NGUYEN, T. K. C., PETCHKONGKAEW, A., VAN NGUYEN, H., CHU-KY, S., ... & WACHÉ, Y. (2020). How fermentation by lactic acid bacteria can address safety issues in legumes food products?. *Food Control*, 110, 106957.
- LIMÓN, R. I., PEÑAS, E., TORINO, M. I., MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C., DUEÑAS, M., & FRIAS, J. (2015). Fermentation enhances the content of bioactive compounds in kidney bean extracts. *Food Chemistry*, 172, 343-352.
- LIU, X., & KOKARE, C. (2017). Microbial enzymes of use in industry. In *Biotechnology of microbial enzymes* (pp. 267-298). Academic Press.
- LUZ, J. M. R. D., NUNES, M. D., PAES, S. A., TORRES, D. P., SILVA, M. D. C. S. D., & KASUYA, M. C. M. (2012). Lignocellulolytic enzyme production of *Pleurotus ostreatus* growth in agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1508-1515.
- MAGRO, A. E. A., SILVA, L. C., RASERA, G. B., & DE CASTRO, R. J. S. (2019). Solid-state fermentation as an efficient strategy for the biotransformation of lentils: enhancing their antioxidant and antidiabetic potentials. *Bioresources and Bioprocessing*, 6(1), 1-9.
- MANAN, M. A., & WEBB, C. (2021). Performance of Fungal Growth Through Integrated Gompertz Model and Respiratory Quotient by Solid State Fermentation in Multi-Layer Squared Tray Solid State Bioreactor with Aeration Strategies.
- MARGIER, M., GEORGÉ, S., HAFNAOUI, N., REMOND, D., NOWICKI, M., DU CHAFFAUT, L., ... & REBOUL, E. (2018). Nutritional composition and bioactive content of legumes: Characterization of pulses frequently consumed in France and effect of the cooking method. *Nutrients*, 10(11), 1668.

- MICHAEL, H. W., BULTOSA, G., & PANT, L. M. (2011). Nutritional contents of three edible oyster mushrooms grown on two substrates at Haramaya, Ethiopia, and sensory properties of boiled mushroom and mushroom sauce. *International journal of food science & technology*, 46(4), 732-738.
- MONTOWSKA, M., KOWALCZEWSKI, P. Ł., RYBICKA, I., & FORNAL, E. (2019). Nutritional value, protein and peptide composition of edible cricket powders. *Food Chemistry*, 289, 130-138.
- MORA-UZETA, C., CUEVAS-RODRIGUEZ, E., LOPEZ-CERVANTES, J., MILÁN-CARRILLO, J., GUTIÉRREZ DORADO, R., & REYES MORENO, C. (2020). Improvement nutritional/antioxidant properties of underutilized legume tepary bean (*Phaseolus Acutifolius*) by solid state fermentation. *Agrociencia*, 53, 987–1003.
- Niba, L. L. (2003). The relevance of biotechnology
- MUZQUIZ, M., VARELA, A., BURBANO, C., CUADRADO, C., GUILLAMÓN, E., & PEDROSA, M. M. (2012). Bioactive compounds in legumes: pronutritive and antinutritive actions. Implications for nutrition and health. *Phytochemistry reviews*, 11(2), 227-244.
- NEMECEK, T., VON RICHTHOFEN, J. S., DUBOIS, G., CASTA, P., CHARLES, R., & PAHL, H. (2008). Environmental impacts of introducing grain legumes into European crop rotations. *European journal of agronomy*, 28(3), 380-393.
- NKHATA, S. G., AYUA, E., KAMAU, E. H., & SHINGIRO, J. B. (2018). Fermentation and germination improve nutritional value of cereals and legumes through activation of endogenous enzymes. *Food Science & Nutrition*, 6(8), 2446-2458.
- OLUKOMAIYA, O. O., ADIAMO, O. Q., FERNANDO, W. C., MEREDDY, R., LI, X., & SULTANBAWA, Y. (2020). Effect of solid-state fermentation on proximate composition, anti-nutritional factor, microbiological and functional properties of lupin flour. *Food chemistry*, 315, 126238.
- OSAWA, R. O., KUROISO, K., GOTO, S., & SHIMIZU, A. (2000). Isolation of tannin-degrading lactobacilli from humans and fermented foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 3093.
- OTHMAN, N. B., ROBLAIN, D., CHAMMEN, N., THONART, P., & HAMDI, M. (2009). Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. *Food Chemistry*, 116(3), 662-669.
- PANDEY, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 81-84.
- PANDEY, A., SOCCOL, C. R., & MITCHELL, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process biochemistry*, 35(10), 1153-1169.
- PENG, W. U., TAO, Z. H. A. O., & TIAN, J. C. (2010). Phytic acid contents of wheat flours from different mill streams. *Agricultural Sciences in China*, 9(11), 1684-1688.
- PRANOTO, Y., ANGGRAHINI, S., & EFENDI, Z. (2013). Effect of natural and *Lactobacillus plantarum* fermentation on in-vitro protein and starch digestibilities of sorghum flour. *Food Bioscience*, 2, 46-52.
- RAGHAVARAO, K. S. M. S., RANGANATHAN, T. V., & KARANTH, N. G. (2003). Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 127-135.

- RANI, P., KUMAR, A., PUROHIT, S. R., & RAO, P. S. (2018). Impact of fermentation and extrusion processing on physicochemical, sensory and bioactive properties of rice-black gram mixed flour. *LWT*, *89*, 155-163.
- RATNAVATHI, C. V., & KOMALA, V. V. (2016). Sorghum grain quality. In *Sorghum biochemistry* (pp. 1-61). Academic Press..
- RODRÍGUEZ, H., CUIEL, J. A., LANDETE, J. M., DE LAS RIVAS, B., DE FELIPE, F. L., GÓMEZ-CORDOVÉS, C., ... & MUÑOZ, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, *132*(2-3), 79-90.
- ŞANLIER, N., GÖKCEN, B. B., & SEZGIN, A. C. (2019). Health benefits of fermented foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, *59*(3), 506-527.
- SCHMIDT, C. G., & FURLONG, E. B. (2012). Effect of particle size and ammonium sulfate concentration on rice bran fermentation with the fungus *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology*, *123*, 36-41.
- SCOTTI, C. T., VERGOIGNAN, C., FERON, G., & DURAND, A. (2001). Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions. *Biochemical Engineering Journal*, *7*(1), 1-5.
- SHI, L., MU, K., ARNTFIELD, S. D., & NICKERSON, M. T. (2017). Changes in levels of enzyme inhibitors during soaking and cooking for pulses available in Canada. *Journal of food science and technology*, *54*(4), 1014-1022.
- SINDHU, S. C., & KHETARPAUL, N. (2001). Probiotic fermentation of indigenous food mixture: effect on antinutrients and digestibility of starch and protein. *Journal of Food Composition and Analysis*, *14*(6), 601-609.
- ŠKROVÁNKOVÁ, S., MIŠURCOVÁ, L., & MACHŮ, L. (2012). Antioxidant activity and protecting health effects of common medicinal plants. *Advances in food and nutrition research*, *67*, 75-139.
- SOCCOL, C. R., DA COSTA, E. S. F., LETTI, L. A. J., KARP, S. G., WOICIECHOWSKI, A. L., & DE SOUZA VANDENBERGHE, L. P. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, *1*(1), 52-71.
- STARZYŃSKA-JANISZEWSKA, A., STODOLAK, B., & MICKOWSKA, B. (2014). Effect of controlled lactic acid fermentation on selected bioactive and nutritional parameters of tempeh obtained from unhulled common bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(2), 359-366.
- SUBRAMANIYAM, R., & VIMALA, R. (2012). Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *Int J Sci Nat*, *3*(3), 480-486.
- VAQUERO, I., MARCOBAL, Á., & MUÑOZ, R. (2004). Tannase activity by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International journal of food microbiology*, *96*(2), 199-204.
- VEGA, A., & FRANCO, H. (2013). Productividad y calidad de los cuerpos fructíferos de los hongos comestibles *Pleurotus pulmonarius* RN2 y *P. djamor* RN81 y RN82 cultivados sobre sustratos lignocelulósicos. *Información tecnológica*, *24*(1), 69-78.

- XIANG, H., SUN-WATERHOUSE, D., WATERHOUSE, G. I., CUI, C., & RUAN, Z. (2019). Fermentation-enabled wellness foods: A fresh perspective. *Food Science and Human Wellness*, 8(3), 203-243.
- XIAO, Y., XING, G., RUI, X., LI, W., CHEN, X., JIANG, M., & DONG, M. (2014). Enhancement of the antioxidant capacity of chickpeas by solid state fermentation with *Cordyceps militaris* SN-18. *Journal of functional foods*, 10, 210-222.
- XU, L. N., GUO, S., & ZHANG, S. (2018). Effects of solid-state fermentation with three higher fungi on the total phenol contents and antioxidant properties of diverse cereal grains. *FEMS microbiology letters*, 365(16), fny163.
- ZADRAZIL, F. (1975). Influence of CO₂ concentration on the mycelium growth of three *Pleurotus* species. *European Journal for Applied Microbiology*, 1(4), 327-335.