



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Estudio de la fermentación como pretratamiento para la mejora de las propiedades antioxidantes de polvos de tallo de brócoli

TRABAJO FIN DE MASTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO/A:

María Alegría Serna Barrera

TUTOR/A ACADEMICO:

Dra. Cristina Barrera Puigdollers

COTUTOR/A :

Dra. Lucía Seguí Gil

DIRECTOR EXPERIMENTAL:

Claudia Bas Bellver

VALENCIA, 9 de julio de 2021

ESTUDIO DE LA FERMENTACIÓN COMO PRETRATAMIENTO PARA LA MEJORA DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE POLVOS DE TALLOS DE BRÓCOLI

Maria Alegría Serna Barrera¹, Claudia Bas-Bellver¹, Lucía Seguí Gil¹, Cristina Barrera Puigdollers¹.

RESUMEN

La pérdida y el desperdicio de alimentos en la industria alimentaria y hortofrutícola en particular, representan uno de los problemas de contaminación ambiental más comunes en el mundo. Los tallos del brócoli constituyen una gran variedad de compuestos bioactivos, siendo ricos en antioxidantes, vitaminas, fibra, carotenoides, compuestos fenólicos y glucosinolatos. Es por esto, que el presente trabajo estudió la fermentación como pretratamiento para la obtención de polvos de tallo de brócoli con propiedades funcionales utilizando tres cepas de bacterias del ácido láctico (*Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus reuteri*) y dos tipos de intensidad de desestructuración: Triturado y Troceado. Los resultados obtenidos muestran que *Lactobacillus reuteri* experimentó el mayor incremento en la población microbiana tras 24 h. En cuanto a la intensidad de la desestructuración previa a la fermentación, ésta no pareció afectar de forma significativa al crecimiento de ninguna de las tres cepas ensayada. La fermentación produjo un aumento significativo en el contenido en fenoles totales, incluidos los del tipo flavonoides, pero menos acusado en la habilidad de las muestras para secuestrar los radicales DPPH y ABTS. Finalmente, se observó que el contenido en antioxidantes aumentó un 72% después del proceso de fermentación, liofilización y molienda, por lo tanto, puede concluirse que la fermentación con bacterias del ácido láctico (BAL) es un pretratamiento que mejora las propiedades del tallo de brócoli y el producto en polvo desarrollado en esta investigación contribuiría en reducir el desperdicio de los tallos de brócoli y podría ser empleado como potencial ingrediente en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales.

PALABRAS CLAVE: brócoli, fermentación, valorización de residuos, probiótico, antioxidantes, liofilización.

RESUM

La pèrdua i el malbaratament d'aliments a la indústria alimentària i hortofrutícola en particular, representen un dels problemes de contaminació ambiental més comuns en el món. Els tija el bròquil constitueixen una gran varietat de compostos bioactius, sent rics en antioxidants, vitamines, fibra, carotenoides, compostos fenòlics i glucosinolats. És per això, que el present

¹ Universidad Politécnica de Valencia, Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IUIAD), Departamento Tecnología de Alimentos, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, España.

treball va estudiar la fermentació com a pretractament per a l'obtenció de pols de tija de bròquil amb propietats funcionals utilitzant tres soques de bacteris de l'àcid làctic (*Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus reuteri*) i dos tipus d'intensitat de desestructurado : Triturat i Trossejat. Els resultats van mostrar que *Lactobacillus reuteri* va experimentar el major increment en la població microbiana després de 24 h. Pel que fa a la intensitat de la desestructuració prèvia a la fermentació, aquesta no va semblar afectar de forma significativa a el creixement de cap de les tres soques assajades. La fermentació va produir un augment significatiu en el contingut en fenols totals, inclosos els de el tipus flavonoides, però menys acusat en l'habilitat de les mostres per segrestar els radicals DPPH i ABTS. Finalment, es troba que el contingut en antioxidants va augmentar un 72% després de l'procés de fermentació, liofilització i mòlta, per tant, es pot concloure que la fermentació amb bacteris de l'àcid làctic (BAL) és un pretractament que millora les propietats de la tija de bròquil i el producte en pols desenvolupat en aquesta investigació contribuiria a reduir el malbaratament de les tiges de bròquil i podria ser emprat com a potencial ingredient en el desenvolupament de nous aliments funcionals.

PARAULES CLAU: bròquil, fermentació, valorització de residus, probiòtic, antioxidants, liofilització.

ABSTRACT

The loss and waste of food in the food and fruit and vegetable industry in particular, represents one of the most common environmental pollution problems in the world. The broccoli stems constitute a great variety of bioactive compounds, being rich in antioxidants, vitamins, fiber, carotenoids, phenolic compounds and glucosinolates. This is why the present work studied fermentation as a pretreatment to obtain broccoli stem powders with functional properties using three strains of lactic acid bacteria (*Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus reuteri*) and two types of intensity of unstructured : Crushed and Chopped. The results showed that *Lactobacillus reuteri* experienced the greatest increase in the microbial population after 24 h. Regarding the intensity of the destructuring prior to fermentation, it did not seem to significantly affect the growth of any of the three strains tested. Fermentation produced a significant increase in the content of total phenols, including those of the flavonoid type, but less marked in the ability of the samples to sequester the radicals DPPH and ABTS. Finally, it is found that the antioxidant content increased by 72% after the fermentation, freeze-drying and milling process, therefore, it can be concluded that fermentation with lactic acid bacteria (LAB) is a pretreatment that improves the properties of the stem of broccoli and the powdered product developed in this research would contribute to reducing the waste of broccoli stems and could be used as a potential ingredient in the development of new functional foods.

KEY WORDS: broccoli, fermentation, waste recovery, probiotic, antioxidants, lyophilization

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la pérdida y el desperdicio de alimentos son un motivo de preocupación dentro del sistema alimentario debido a las consecuencias sociales, económicas y ambientales (FAO, 2020). Aproximadamente el 30% de los alimentos se convierte en desperdicio (Gustavsson et al., 2011) y es por ello que los esfuerzos por combatir dicha problemática se enfatizan en los Objetivos de Desarrollo Sostenible 2030, los cuales establecen como prioridades la mejora continua y sostenible del sistema alimentario, además de satisfacer la creciente demanda de alimentos e impulsar la acción climática (FAO, 2020). Entre las soluciones para combatir la pérdida y desperdicio de residuos de la industria hortofrutícola, se encuentra la obtención de polvos con propiedades beneficiosas para la salud. Se trata de productos estables, que se presentan en forma concentrada y resultan versátiles por la posibilidad de ser utilizados directamente o como ingrediente en la formulación de alimentos (Bas et al., 2019). La obtención de los polvos permite mejorar la seguridad alimentaria y valorizar los subproductos de la industria.

Actualmente en España se producen alrededor de 600.000 toneladas de brócoli al año. El 50% de la producción española procede de la región de Murcia, a la que sigue la Ribera del Ebro y Extremadura (AEE, 2020). El brócoli (*Brassica oleracea L. var. Italica*) es una verdura de la familia Brassicaceae, ampliamente consumida en el mundo por sus beneficios para la salud, ya que contiene una gran cantidad de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes, antitumorales y cardioprotectoras (Moreno et al., 2006; Vasanthi et al., 2009; Zhang et al., 2011). Entre estos compuestos destacan los glucosinolatos (GLS) y compuestos fenólicos, tales como flavonoides, antocianinas y ácidos fenólicos (Bekhit et al., 2013; Latte et al., 2011). Las partes del brócoli que se utilizan para la alimentación son en su mayoría floretes, que constituyen únicamente el 15% en peso del total de la planta. Las hojas, por su parte, representan el 47% y el tallo el 38% aproximado del peso total. Varios investigadores han investigado los subproductos de brócoli como agentes antimicrobianos y como materia prima para la producción de compuestos bioactivos.

Liu et al. (2018) realizaron un análisis comparativo de fitonutrientes del brócoli en los diferentes tejidos (Tabla 1). Al comparar las concentraciones entre los floretes, tallos y hojas concluyeron que las flores de brócoli tenían concentraciones más altas de aminoácidos, glucorafanina y neoglucobrasica en comparación con los otros tejidos, mientras que las hojas tenían más carotenoides, clorofilas, vitaminas E y K, contenido fenólico total y actividad antioxidante; por su parte, los tallos presentaron el menor contenido de glucosinolatos. Con lo anterior, el tallo de brócoli se presenta como una alternativa de estudio ya que a pesar de no ser la parte de la planta que presenta un mayor contenido en compuestos beneficiosos para la salud, hay técnicas y pretratamientos incluida la fermentación que se podrían aplicar para incrementar dichos compuestos.

TABLA 1. Concentración de fenoles totales, glucosinolatos, carotenoides y clorofila en las diferentes partes del brócoli (Liu et al., 2018).

		Floretes	Tallos	Hojas
Fenoles totales (mg EAG/g ms)		2,51 ± 0,03	1,4 ± 1,3	4 ± 2
Glucosinolatos (µmol/g ms)		34,6 ± 1,6	7,5 ± 0,4	10,1 ± 0,6
Carotenoides (µg/g ms)	β- caroteno	31 ± 5	0,0	248 ± 29
	Violaxantina	35 ± 2	0,0	206 ± 20
	Neoxantina	30,2 ± 1,3	5 ± 8	156 ± 11
	Luteína	86 ± 8	11 ± 10	484 ± 33
Clorofila (µg/g ms)	Clorofila a	852 ± 106	144 ± 62	4478 ± 409
	Clorofila b	135 ± 14	22 ± 9	781 ± 56

La fermentación es una técnica milenaria, considerada como una de las formas más efectivas de conservar los alimentos debido a la formación de ácidos orgánicos, alcoholes, bacteriocinas y otros productos finales antimicrobianos (Hutkins, 2019). Se trata de un proceso que ocurre en presencia de microorganismos beneficiosos, tales como levaduras, mohos y bacterias que descomponen los azúcares y almidones en alcoholes y ácidos, lo que hace que los alimentos sean más nutritivos (Adebo et al., 2017). Además, esta técnica contribuye a mejorar la seguridad alimentaria, ya que previene el crecimiento de microorganismos patógenos.

Por tanto, las matrices fermentadas son potenciales ingredientes clave para el desarrollo de nuevos alimentos con propiedades mejoradas con diversas aplicaciones en la industria alimentaria: en la elaboración de complementos alimenticios, condimentos para sopas o alimentos probióticos (Onweluzo & Nwabugwu, 2009; Onimawo et al., 2003), así como en la formulación de alimentos para bebés (Olagunju & Ifesan, 2013) o productos fortificados a base de cereales (Xing et al., 2020). Es por esto que en los últimos años ha crecido el interés por estudiar la influencia de la fermentación sobre los alimentos y su beneficio para la salud humana (Guan et al., 2020), así como sobre la mejora en las propiedades funcionales, sensoriales (Wu et al., 2020) y fisicoquímicas (Xu et al., 2019). Entre los alimentos fermentados destacan la salsa de soja, el tempeh, el miso o la kombucha, originarios del este y sureste de Asia; yogur, queso, salami, kéfir y quark, procedentes de Europa; o la salsa de pimiento picante, muy popular en África (Xiang et al., 2019).

Otros alimentos fermentados tradicionales producidos en todo el mundo incluyen bebidas como cerveza, café, té, vino y sidra; pan resultante de la fermentación de cereales; y encurtidos o aceitunas de frutas y verduras fermentadas (Campbell-Platt, 1994). En este contexto, la fermentación se presenta como una alternativa sostenible y segura para la obtención de productos con alto valor nutricional a partir de residuos vegetales (Di Cagno et al., 2013; Xing et al., 2020).

Entre los microorganismos implicados en los procesos fermentativos destacan las bacterias del ácido láctico (BAL) pertenecientes a los géneros *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*, con características morfológicas, metabólicas y funcionales similares

(Roobab et al., 2020). Se consideran los principales microorganismos probióticos y se destaca su importancia industrial en alimentos de consumo habitual como el yogur, el queso, la cerveza, el vino o los embutidos, entre otros (Pereira et al., 2017). Según la OMS, los probióticos son “microorganismos vivos que, cuando se consumen en una cantidad adecuada (10^8 - 10^9 UFC/día), confieren beneficios para la salud del huésped”. Por lo tanto, para nombrar un producto como alimento probiótico se requiere no solo que el microorganismo en cuestión se encuentre en una concentración adecuada en el momento de consumo ($> 10^6$ - 10^7 UFC/g), sino también evidencia de que la cepa es inocua y beneficiosa para la salud.

Durante la fermentación, las bacterias BAL producen metabolitos primarios y secundarios, tales como ácidos orgánicos, CO_2 , peróxido de hidrógeno y péptidos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos (Di Cagno et al., 2013). La fermentación ácido-láctica también mejora los atributos nutricionales y de salud de los alimentos mediante la bioconversión de compuestos fitoquímicos, como los polifenoles, en sus formas más bioactivas y bioaccesibles (Filannino et al., 2015; Rodríguez et al., 2009). En un estudio acerca de los cambios en la capacidad antioxidante del puré de brócoli fermentado y la estabilidad durante el almacenamiento a 4 °C y 25 °C, Yan et al. (2019) constataron que la fermentación estabiliza los metabolitos bioactivos y la capacidad antioxidante durante el almacenamiento a largo plazo del puré de brócoli.

Entre las bacterias BAL, *Lactobacillus reuteri* se encuentra presente en el ecosistema gastrointestinal de animales y humanos y es capaz de prevenir infecciones causadas por agentes patógenos y reducir los efectos derivados de trastornos intestinales severos, incluidos los cólicos en pacientes pediátricos. Aunque esta cepa se usa generalmente en la fermentación de alimentos lácteos, existen diversos estudios en los que se evalúa la adaptación y supervivencia de este microorganismo en productos de origen vegetal, como el zumo de cereza o el puré de brócoli (Filannino et al., 2015). Por su parte, *Lactobacillus plantarum* es la especie más utilizada para fermentar productos alimenticios de origen vegetal ya que produce gran cantidad de enzimas activas, tales como amilasas, β -glucosidasas, descarboxilasas, lactatodeshidrogenasas, peptidasas, descarboxilasas de ácido fenólico, fenol reductasas, proteinasas y tanasas (Domínguez et al 2011). Finalmente, la cepa *Lactobacillus salivarius spp salivarius* tiene gran interés como especie probiótica ya que se destaca su capacidad de sobrevivir a las condiciones presentes en el estómago, en el intestino delgado y a su vez ser capaz de adherirse y colonizar la mucosa intestinal (Dunne et al., 2001).

Aunque existen muchos estudios en los que se evalúa el efecto del procesado y la fermentación sobre las propiedades bioactivas de crucíferas, tales como repollo, hoja de mostaza y brócoli, en términos de contenido total de polifenoles, capacidad antioxidante, glucosinolatos y productos de degradación (Ciska y Pathak, 2005, Maryati et al., 2017, Nguyen et al., 2015; Palani et al., 2016), se dispone de información limitada sobre la fermentación de los tallos de brócoli y su efecto sobre las propiedades fisicoquímicas y nutricional del producto fermentado.

Es por esto que, el presente trabajo tiene como objetivo desarrollar polvos funcionales a partir de residuos de brócoli. En este sentido, se propone estudiar la fermentación, liofilización y molienda como pretratamientos para mejorar las propiedades antioxidantes del tallo de brócoli.

MATERIAL Y MÉTODOS

Materia prima

El brócoli empleado en este estudio era originario de Murcia, España, aunque se adquirió en un supermercado local de la ciudad de Valencia (España). Hasta el momento de su uso, el material vegetal se conservó en refrigeración a 4 °C. El primer paso en la preparación de las muestras consistió en separar los tallos de las hojas y las flores. También, se realizaron diferentes análisis preliminares para identificar el correcto pretratamiento térmico y/o químico que permitiera reducir la carga microbiana en el tallo de brócoli. El proceso consistió en sumergir los tallos de brócoli a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio durante 5 y 10 min seguido de aplicar un tratamiento térmico a 72°C durante 30, 45 y 60 s, y así comparar la mejor combinación que permitiera reducir la carga microbiana para evitar posibles competencia de sustrato durante la fermentación con el microorganismo inoculado. Por lo tanto, el mejor pretratamiento consistió en sumergir los tallos enteros durante 5 min en una disolución acuosa de 200 ppm de hipoclorito de sodio en una relación de 2 g muestra/10 mL de disolución a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se aplicó un tratamiento de pasteurización por inmersión en un baño con agua a 72 °C durante 60 s, contados una vez la muestra alcanzó la temperatura indicada. De esta forma se logró reducir al mínimo valor la carga microbiana inicial. Una vez acondicionados, los tallos se trituraron con un procesador de alimentos Thermomix® (Vorwerk, España) durante 30 s a 10.000 rpm (muestras trituradas, TRI) o durante 10 s a 10.000 rpm (muestras troceadas, TRO). Todos los materiales empleados fueron esterilizados en autoclave a 120 °C durante 2 h (Systec GmbH, modelo VB-40; Linden, Alemania) para evitar posibles contaminaciones por parte de otras especies.

Cultivo bacteriano

Se emplearon tres cepas de lactobacilos: *Lactobacillus salivarius* spp. *salivarius* CECT 4063, *Lactobacillus plantarum* spp. CECT 749 y *Lactobacillus reuteri* spp. CECT 925; adquiridas en la Colección Española de Cultivo Tipo (CECT, Valencia, España). Estos microorganismos fueron seleccionados debido a su potencial efecto probiótico, su capacidad de degradar y metabolizar diferentes polisacáridos y su habilidad para crecer en muestras vegetales. Las cepas liofilizadas se recuperaron siguiendo las

indicaciones de la CECT. Una vez reconstituidas, se conservaron en viales a -20 °C hasta ser utilizadas.

Procedimiento experimental

La recuperación de las cepas liofilizadas se llevó a cabo en caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Scharlab, Barcelona, España) a 37 °C durante 24 h. La fermentación de la muestra se llevó a cabo en envases de vidrio estériles con cierre Twist-Off y capacidad de 370 mL, donde se agregaron 100 g de tallo de brócoli desestructurado y 1 mL de cultivo iniciador, alcanzando una concentración inicial de aproximadamente 8 log UFC/g. La desestructuración de los tallos de brócoli previa a la fermentación consistió en un troceado de los tallos o, alternativamente trituradollevada a cabo en un procesador de alimentos (Thermomix®, Vorwerck) en las condiciones indicadas anteriormente. Los tallos desestructurados e inoculados se incubaron en estufa a 37 °C durante 96 h. Las pruebas de fermentación se realizaron por duplicado y se hicieron recuentos a diferentes tiempos a lo largo de la fermentación (0, 7, 24, 48, 72 y 96 h) tal y como se describe en el apartado de recuentos microbianos.

Una vez definido el tiempo de fermentación que, para cada una de las condiciones ensayadas, resultó en una concentración microbiana mayor, se fermentó el tallo de brócoli en las condiciones definidas y posteriormente se liofilizó. La liofilización fue precedida de una etapa de congelación a -40 °C durante 24 h en un congelador Matek CVN-40/105 ; la liofilización se llevó a cabo a -45 °C y 0,1 mbar durante 48 h en un equipo a nivel de planta piloto Telstar Lyoalfa. Finalmente, el residuo fermentado y liofilizado se trituró a 10.000 rpm durante 20 s con el procesador de alimentos Thermomix® (Vorwerk, España). De esta forma se obtuvo un polvo sobre el que se realizaron las determinaciones analíticas que se especifican a continuación.

Determinaciones analíticas

Todas las determinaciones descritas en este apartado se realizaron, al menos, por triplicado.

Actividad del agua (a_w). Se determinó con un higrómetro de punto de rocío Aqualab® CX-2 (Decagon Devices In. Pullma, WA, USA) con una precisión de $\pm 0,003$ a una temperatura de 25 °C.

pH. Se valoró con un pH-metro digital S20 SevenEasy™ (Mettler Toledo Inlab), previamente calibrado con las pertinentes disoluciones tampón a pH 7 y 4.

Humedad (x^w). Se determinó por el método oficial AOAC 950-46 (1997). Se trata de un método gravimétrico indirecto a través del cual se cuantifica la pérdida de peso que experimenta una cantidad conocida de muestra durante

su secado en una estufa de vacío (Vaciotem, J.P. Selecta, S.A., Barcelona, España) a 60 °C y \leq 133 mbar hasta alcanzar peso constante.

Sólidos solubles totales (SST). Se calcularon a partir de la humedad y de la medida de °Brix obtenida en un refractómetro de mesa (ABBE ATAGO, NAT T3, Japón) a una temperatura de 20 °C.

Recuentos microbianos. El número de viables de *L. salivarius*, *L. plantarum* y *L. reuteri* se estimó mediante dilución seriada con agua de peptona tamponada (Scharlau Chamie, Barcelona, España), siembra en agar MRS e incubación a 37 °C durante 24 h. En el caso de las muestras sólidas de brócoli fermentado, la primera dilución (10^{-1} g/L) se obtuvo en una bolsa stomacher mezclando 3 g de muestra con 27 mL de agua de peptona estéril y triturando a velocidad media durante 2 min.

Propiedades antioxidantes. Para la extracción de los compuestos antioxidantes se utilizó como disolvente una disolución de metanol al 80% (v/v) en agua bidestilada en una relación 1:10 (m/v). La mezcla se mantuvo en agitación durante 1 h (agitador horizontal COMECTA WY-100). A continuación, el extracto se centrifugó durante 5 min a 10.000 rpm (Medifriger BL-S, P-Selecta), tomándose muestras del sobrenadante para los ensayos.

Contenido en fenoles totales

Se determinó por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999; Wolfe et al., 2003), que mide la intensidad de coloración producida por la interacción entre dicho reactivo y los compuestos fenólicos, a una longitud de onda de 760 nm. Para una detección adecuada, se prepararon diluciones 1:100 (v/v) a partir de los extractos del tallo de brócoli fresco y del tallo de brócoli fermentado y diluciones 1:1 (v/v) a partir de los extractos del polvo liofilizado. Para los análisis, se mezclaron 0,125 mL de la muestra diluida, 0,5 mL de agua bidestilada y 0,125 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu en una cubeta de espectrofotometría. Tras 6 min de reacción en oscuridad, se añadieron 1,25 mL de carbonato sódico (Na_2CO_3) al 7% y 1 mL de agua bidestilada. Esta preparación se dejó durante 90 min en oscuridad, tras los cuales se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Como referencia se utilizó un blanco en el que la muestra se sustituyó por metanol al 80% (v/v) en agua bidestilada. Las medidas de absorbancia fueron comparadas con una curva patrón de ácido gálico (pureza \geq 98%; Sigma-Aldrich) en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0 y 0,4 g/L. Los resultados se expresaron como miligramos de ácido gálico equivalentes por gramo de materia seca (mg EAG/g ms).

Contenido en flavonoides totales

Se determinó siguiendo el método colorimétrico modificado del cloruro de aluminio (AlCl_3) (Luximon-Ramma *et al.*, 2002). Tras la extracción de los compuestos, se prepararon las mismas diluciones que para el ensayo de fenoles totales. Para los análisis, se mezclaron 1,5 mL de la muestra diluida con 1,5 mL de una disolución de AlCl_3 al 2% (m/v) en metanol que reacciona con los flavonoides y desarrolla un color amarillo. La reacción se dejó durante 30 min, tras los que se midió la absorbancia a 368 nm con un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Como referencia se preparó un blanco por sustitución de la muestra con metanol al 80% en agua bidestilada. Los resultados de absorbancia se compararon con una curva patrón de quercetina (pureza $\geq 95\%$; Sigma-Aldrich) en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0 y 0,2 g/L. El contenido en flavonoides totales se expresó en miligramos de quercetina equivalentes por gramo de materia seca (mg EQ/g ms).

Capacidad antioxidante: métodos DPPH y ABTS

La actividad antioxidante se evaluó siguiendo los métodos de los radicales libres DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) y ABTS (ácido 2,20-azobis-3-etil benzotiazolin-6-sulfónico). Antes de aplicar estos ensayos se procedió a la extracción de los antioxidantes contenidos en las diferentes muestras susceptibles de analizar, tal y como se ha comentado anteriormente. Tras esto, y después de varias pruebas, se determinó preparar una dilución 1:100 en agua bidestilada (v/v) para todas las muestras.

El método del radical DPPH se aplicó siguiendo el procedimiento descrito por Shahidi *et al.* (2006) con algunas modificaciones. Este método se basa en medir el cambio de absorbancia/coloración de la disolución púrpura de DPPH cuando reacciona con los compuestos antioxidantes presentes en la muestra, lo que se mide espectrofotométricamente a 515 nm (Martínez-Las Heras *et al.*, 2017). Para ello, en cada cubeta se adicionaron 0,1 mL de la muestra diluida y 2,9 mL de la disolución 0,06 mM de DPPH en metanol. La mezcla se dejó reaccionar durante 2 h, midiendo la absorbancia cada cierto tiempo con un espectrofotómetro (Helios Zeta UV/Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Como referencia se empleó un blanco en el que la muestra fue reemplazada por metanol al 80% (v/v) en agua bidestilada. Los resultados se expresaron como miligramos de trólox equivalentes por gramo de materia seca (mg ET/g ms), obtenidos a partir del porcentaje de inhibición para el antioxidante de referencia trólox (pureza $\geq 97\%$; Sigma-Aldrich) en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0 y 400 mg/L.

El método del radical ABTS o TEAC se aplicó según el procedimiento descrito por Re *et al.* (1999), basado en medir la capacidad que tienen los

compuestos antioxidantes presentes en la muestra para reducir el radical ABTS⁺, el cual se obtiene tras la reacción del ABTS con persulfato potásico. Para ello, se preparó una disolución de ABTS 7 mM (pureza $\geq 99\%$; Sigma-Aldrich) en persulfato potásico 2,45 mM, que permaneció en oscuridad durante 16 h y a temperatura ambiente, con la finalidad de liberar el radical ABTS⁺. A continuación, la disolución se diluyó en tampón fosfato hasta obtener una absorbancia de $0,70 \pm 0,02$ medida a 734 nm. Posteriormente, en cada cubeta de espectrofotómetro se añadieron 90 μ l de la muestra diluida (dilución 1:200 (v/v) para las muestras liofilizadas y 1:100 (v/v) para el resto de muestras) y 2,9 mL de la disolución de ABTS⁺ en tampón fosfato. Las absorbancias se midieron a 734 nm tras 1, 5 y 10 min de reacción, tomándose el tiempo 10 min como definitivo. Como referencia se analizó un blanco en el que la muestra se reemplazó por metanol al 80% (v/v) en agua bidestilada. Los resultados obtenidos se expresaron como miligramos de trólox equivalentes por gramo de materia seca (mg ET/g ms), utilizando la recta de calibrado de trólox (C₁₄H₁₈O₄) (pureza $\geq 97\%$; Sigma-Aldrich) como antioxidante estándar de referencia, en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0 y 500 mg/L.

Análisis estadístico

Se llevó a cabo con el software Statgraphics Centurión XVII (Statpoint Technologies, Virginia, US), aplicando análisis de varianza simple (ANOVA) y multifactorial con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la materia prima

En la tabla 2 se muestran las principales propiedades fisicoquímicas y antioxidantes del tallo de brócoli, así como la relación entre el peso del tallo y el peso total de la cabeza floral, medida en porcentaje. Como se puede observar, el tallo (parte normalmente desechada) representó el 49% en peso del total de la pieza y su contenido en agua fue del 92%. Estos valores coinciden con los obtenidos por Bakhit et al. (2013). Por lo que respecta a la actividad del agua del tallo, ésta resultó del orden de $0,992 \pm 0,004$, lo que representa un ambiente ideal para el crecimiento de bacterias del género *Lactobacillus*. En contraste, el tallo de brócoli presentó un bajo contenido en sólidos solubles ($0,0028 \pm 0,0007$) lo que podría reducir la cantidad de sustrato para el consumo y la transformación durante la fermentación de las bacterias ácido lácticas, sin embargo, no es un obstáculo para el óptimo crecimiento de los microorganismos ya que éstos son capaces de degradar y metabolizar otros polisacáridos presentes en las células vegetales para su viabilidad durante la fermentación.

En cuanto a las propiedades antioxidantes del tallo de brócoli fresco, el contenido total de compuestos fenólicos resultó similar al obtenido en estudios previos para el mismo tipo de muestra (Podsdek, 2007), pero inferior al encontrado en brócoli entero. Entre los compuestos fenólicos del tallo de brócoli se encuentran los flavonoides, con valores inferiores comparados con otras crucíferas como la coliflor, el repollo y la col rizada. En cuanto a la capacidad antioxidante, el método de medida empleado no afectó notablemente al valor final, que resultó inferior al obtenido por Liu et al. (2018) en hojas y floretes de brócoli.

TABLA 2. Propiedades fisicoquímicas y antioxidantes del tallo de brócoli fresco.

Análisis	Valor
% tallo	49 ± 4
x ^w (%)	92 ± 2
a _w	0,992 ± 0,004
x ^{ss} (g ss/g total)	0,0028 ± 0,0007
Fenoles totales (mg EAG/g ms)	4,9 ± 0,6
Flavonoides (mg EQ/g ms)	0,33 ± 0,02
AA método DPPH (mg ET/g ms)	2,6 ± 0,3
AA método ABTS (mg ET /g ms)	2,0 ± 0,2

Efecto de la intensidad del triturado y del tipo de microorganismo sobre el crecimiento microbiano y las propiedades antioxidantes

La figura 1 muestra los resultados de los recuentos microbianos realizados a lo largo del proceso de fermentación del tallo de brócoli triturado (TRI) o troceado (TRO) por parte de *Lactobacillus salivarius* (LS), *Lactobacillus plantarum* (LP) y *Lactobacillus reuteri* (LR). Como se puede observar, el recuento inicial de viables osciló entre 6,79 log UFC/g para LR, 7,64 log UFC/g para LS y 8,70 log UFC/g para LP, dependiendo de la concentración microbiana alcanzada en el inóculo inicial, y aumentó notablemente durante las primeras horas de fermentación hasta alcanzar un máximo pasadas 24 h. A partir de este instante, los recuentos comenzaron a disminuir debido probablemente al agotamiento de los nutrientes presentes en el medio. En un estudio similar con zumo de repollo, Yoon et al. (2006) constataron que el contenido en *L. casei*, *L. plantarum* y *L. delbruekii* alcanzó su valor máximo tras 48 h de fermentación ($\approx 8 \log_{10}$ UFC/mL), que se mantuvo constante durante las siguientes 24 h. Asumiendo que la dosis recomendada para que los probióticos puedan ejercer un efecto beneficioso para la salud es de 10^9 UFC/día (FAO, 2019), sería suficiente con ingerir entre 1 y 10 g de tallo de brócoli fermentado durante 24 h con cualquiera de los tres microorganismos ensayados para alcanzar el beneficio esperado.

Por otra parte, como era de esperar debido a la formación de ácidos láctico, acético y propiónico (Guan et al., 2020), la fermentación del tallo de brócoli durante 96 h con bacterias ácido-lácticas produjo un descenso en el pH del medio desde un valor inicial de 6,3 hasta un valor final de 4,1. Este hecho es de gran importancia para inhibir el crecimiento de microorganismos

responsables de deterioro y alargar la vida útil del producto fermentado durante su posterior almacenamiento (Yan et al., 2019).

En cuanto a la intensidad de la desestructuración previa a la fermentación, ésta no pareció afectar de forma significativa al crecimiento de ninguna de las tres cepas ensayadas, si bien era de esperar que el menor tamaño de partícula alcanzado tras el triturado del tallo de brócoli favoreciera la liberación de nutrientes al medio y aumentara el acceso a los mismos por parte de las bacterias fermentativas (Betoret et al., 2009; Olukomaiya et al 2020; Starzynska et al, 2011).

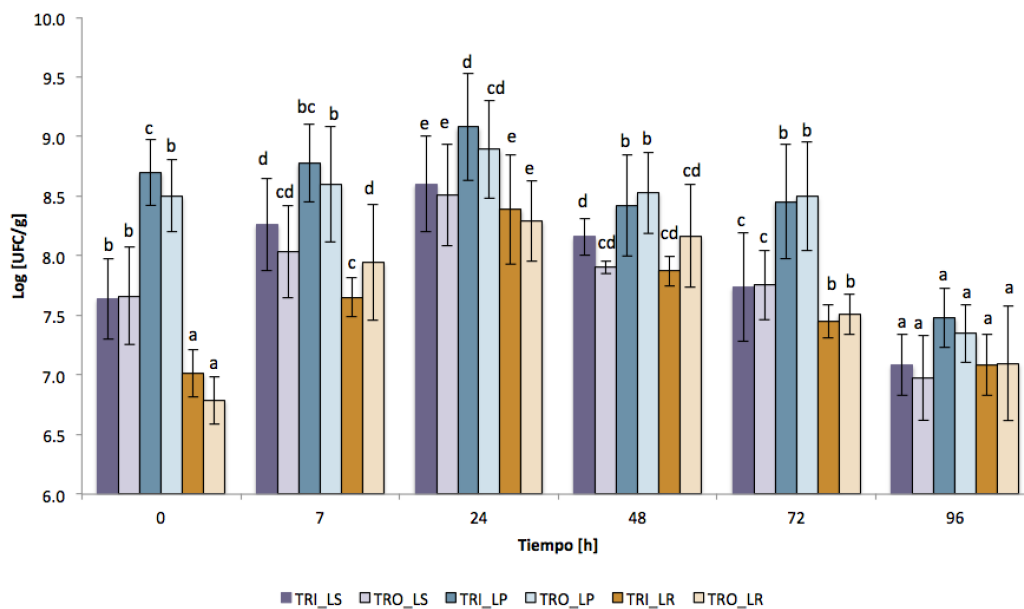


Figura 1. Recuento de viables (LS: *L. salivarius*; LP: *L. plantarum*; LR: *L. reuteri*) durante la fermentación de tallo de brócoli troceado (TRO) y triturado (TRI). Las barras de error representan la desviación estándar de tres repeticiones. Las letras diferentes en la misma serie indican diferencias estadísticamente significativas en función del tiempo de fermentación con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$).

Una vez definido el tiempo de fermentación que permite obtener un mayor crecimiento microbiano (24 h), se calculó el incremento en la población microbiana ($\log \text{UFC}_{24\text{h}} - \log \text{UFC}_{0\text{h}}$) para cada una de las condiciones de proceso ensayadas (tabla 3). El análisis estadístico de los valores obtenidos confirmó que el tratamiento de desestructuración previo a la fermentación no tuvo efecto alguno sobre el crecimiento microbiano, que sí se vio significativamente afectado por el tipo de microorganismo empleado.

De entre los tres microorganismos ensayados, *L. reuteri* fue el que mejor creció en el tallo de brócoli y *L. plantarum* el que peor. Estos resultados sorprenden puesto que *L. plantarum* es el cultivo iniciador comercial más utilizado en la fermentación de productos vegetales (Chwastek et al., 2015).

Sin embargo, sugieren que, frente a las otras cepas ensayadas, *L. plantarum* requiere para su crecimiento de algunos nutrientes específicos que escasean en el tallo de brócoli o que *L. plantarum* es más susceptible a los compuestos antimicrobianos presentes en el tallo de brócoli. En el mismo sentido, se podría afirmar que *L. reuteri* se adapta mejor que *L. salivarius* y *L. plantarum* a las características intrínsecas de la materia prima que, en el caso del tallo de brócoli, podría ser el bajo contenido en sólidos solubles. Esta habilidad de *L. reuteri* para crecer en matrices vegetales fue previamente constatada por Saori et al. (2016) en zumo de arándano y zanahoria, en el que el crecimiento microbiano confirmó estabilidad al producto durante la fermentación y el posterior almacenamiento, además de mejorar las propiedades antioxidantes y permitir el desarrollo de una bebida probiótica de origen no lácteo.

TABLA 3. Incremento en la población microbiana tras 24 h de fermentación. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$)

	<i>LS</i>	<i>LP</i>	<i>LR</i>
TRI	1,0 ± 0,4 ^a	0,36 ± 0,12 ^a	1,4 ± 0,5 ^a
TRO	0,8 ± 0,4 ^a	0,5 ± 0,2 ^a	1,5 ± 0,3 ^a

El efecto que la desestructuración previa a la fermentación ejerce sobre los cambios en las propiedades antioxidantes, se evaluó para tallo de brócoli fermentado durante 24 h con *L. salivarius*. Como se puede comprobar en la tabla 4, no se observaron diferencias significativas en el contenido en fenoles y flavonoides totales y en la actividad antioxidante (AA) medida por los métodos DPPH y ABTS entre las muestras TRO y TRI, lo que coincide con lo comentado anteriormente para el crecimiento microbiano. Así pues, se decidió proceder únicamente al análisis de las propiedades antioxidantes tras 24 h de fermentación en las muestras TRI. Sería recomendable, de cara a futuras investigaciones, que la diferencia entre los tratamientos de desestructuración previos fuera más acusada.

TABLA 4. Efecto de la intensidad de la desestructuración previa (TRI/TRO) sobre las propiedades antioxidantes de tallos de brócoli fermentados durante 24 h con *Lactobacillus salivarius*. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$).

	TRI	TRO
Fenoles totales (mg EAG/g ms)	8,31 ± 0,10 ^a	8,10 ± 0,02 ^a
Flavonoides totales (mg EQ/g ms)	0,65 ± 0,02 ^a	0,67 ± 0,04 ^a
AA método DPPH (mg ET/g ms)	2,10 ± 0,09 ^a	2,10 ± 0,10 ^a
AA método ABTS (mg ET/g ms)	2,15 ± 0,09 ^{ab}	2,13 ± 0,03 ^a

El efecto de la fermentación con los tres microorganismos probióticos ensayados sobre las propiedades antioxidantes de los tallos de brócoli triturados se presentan en la tabla 5. Según los resultados obtenidos, la

fermentación del tallo de brócoli durante 24 h con cualquiera de las tres cepas microbianas produjo un aumento significativo en el contenido en fenoles totales, incluidos los del tipo flavonoides, pero menos acusado en la habilidad de las muestras para secuestrar los radicales DPPH y ABTS. Para explicar esto se podría hacer alusión a la capacidad de las bacterias del ácido láctico para producir enzimas que degradan los polisacáridos de la pared celular, principalmente celulasas y glicosidasas, favoreciendo así la liberación de los compuestos fenólicos (Sharma et al., 2020). Según estudios previos, existe una correlación positiva entre la capacidad de transformación fenólica de los microorganismos probióticos y su ciclo de crecimiento (Cheng et al., 2016).

En cuanto al tipo de cepa empleada, las muestras fermentadas con *L. reuteri* durante 24 h fueron las que presentaron un mayor contenido en fenoles totales y una habilidad significativamente más elevada para secuestrar los radicales libres DPPH y ABTS. Esto pone de manifiesto una mayor capacidad de este microorganismo para adaptarse a las propiedades del tallo de brócoli, para emplear este sustrato y metabolizar sus componentes.

Los resultados presentados indican que la fermentación podría ser una alternativa para mejorar las propiedades antioxidantes del tallo de brócoli a través de microorganismos del ácido láctico y es coherente con los resultados de Yan et al. (2019) quienes concluyeron que, aunque la fermentación aumentó significativamente la capacidad antioxidante del puré de brócoli, el contenido en fenoles totales aumentó en mayor proporción.

Tras la fermentación, el contenido fenólico total aumentó un 52% en el caso de las muestras fermentadas con LR, un 25% en el caso de las muestras fermentadas con LS y un 17% en el caso de los tallos fermentados con LP. Los flavonoides también presentaron un comportamiento similar para las dos etapas de procesado y en la actividad antioxidante se destacó LR por presentar un aumento en la transformación de compuestos bioactivos.

TABLA 5. Propiedades antioxidantes de los tallos de brócoli fermentados. Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$).

	Fenoles totales (mg EAG/g ms)	Flavonoides totales (mg EQ/ g ms)	Método DPPH (mg ET/g ms)	Método ABTS (mg ET/g ms)
LS	8,31 ± 0,13 ^a	0,65 ± 0,02 ^b	2,10 ± 0.09 ^a	2,15 ± 0.09 ^b
LP	9,4 ± 0,2 ^b	0,52 ± 0,03 ^a	1,98 ± 0.02 ^a	1,62 ± 0.03 ^a
LR	9,5 ± 0,2 ^b	0,47 ± 0,07 ^a	3,50 ± 0.02 ^b	2,70 ± 0.06 ^c

Efecto de la liofilización sobre el contenido microbiano y las propiedades antioxidantes del tallo de brócoli fermentado

En la tabla 6 se presenta la viabilidad de los microorganismos empleados tras la operación de liofilización, para cada una de las tres cepas ensayadas y las dos intensidades de desestructuración aplicadas. La viabilidad de la población microbiana se calculó como el cociente entre el número de células vivas presentes en el tallo de brócoli fermentado y liofilizado y el número de células vivas presentes en el tallo de brócoli fermentado sin liofilizar, expresados ambos por gramo de sólido seco. A partir de los resultados obtenidos se puede afirmar que en todos los casos la viabilidad tomó valores muy elevados (> 90%), no apreciándose diferencias estadísticamente significativas en función del tipo de microorganismo o de la intensidad de la desestructuración previa a la fermentación. Esto demuestra que la liofilización es una técnica adecuada para deshidratar alimentos probióticos y aumentar su estabilidad, sin afectar negativamente a la viabilidad de los microorganismos beneficiosos presentes.

TABLA 6. Viabilidad de LS, LP y LR después de la liofilización. Valor medio de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% (valor $p < 0,05$).

	LS	LP	LR
TRI	95 \pm 3 % ^a	95 \pm 3 % ^a	93 \pm 3 % ^a
TRO	93 \pm 4 % ^a	92 \pm 2 % ^a	94 \pm 2 % ^a

En la tabla 7 se muestra el incremento de las propiedades antioxidantes de las muestras liofilizadas según el tipo de procesado para cada una de las tres cepas ensayadas.

Tras la liofilización se aprecia un aumento significativo de los fenoles para cada una de las cepas, siendo LR mayor comparado con LP y LS, mientras que el porcentaje de flavonoides fue bajo en todos los casos, siendo LP levemente mayor. En relación a la actividad antioxidante, se presenta para los dos métodos un porcentaje similar en todos los casos. El incremento de las propiedades bioactivas puede estar explicado debido a que durante el procesado y posterior molienda se producen una serie de roturas en la estructura de la matriz que mejora la accesibilidad a los disolventes empleados para la extracción de los compuestos bioactivos (Calabuig-Jimenez et al., 2018). Por un lado, la congelación y posterior sublimación implica roturas celulares, una alteración de la estructura por formación de cristales y posterior generación de canales porosos, los cuales en sí mismos pueden favorecer la liberación de compuestos bioactivos. Por otra parte, la liofilización genera una estructura porosa fácil de moler, lo cual da lugar a un polvo fino (Calabuig-Jimenez et al., 2018), y a su vez facilita el contacto del disolvente con el polvo, permitiendo un mayor acceso a los compuestos bioactivos (Domínguez-Perles et al., 2010).

En relación a la obtención de polvos funcionales, diferentes matrices han sido estudiadas, por ejemplo, Bas et al 2019, investigó las operaciones de secado por aire caliente y liofilización en el bagazo de caqui para analizar las propiedades fisicoquímicas y funcionales del polvo tras la molienda. Y concluyeron que la operación de liofilización combinada con la posterior molienda permite obtener un polvo enriquecido con bacterias probióticas que se destaca por su estabilidad y mejora de las propiedades antioxidantes.

Estudios similares se presentan para la aplicación de un aperitivo funcional de manzana y zumo de arándano, en donde se observó que la liofilización es el mejor proceso para conservar el 100% del contenido funcional del aperitivo Roig S. (2017).

TABLA 7. Incremento de las propiedades antioxidantes tras la liofilización con *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus salivarius*. Las letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$).

	Fenoles totales (mg EAG/g ms)	Flavonoides totales (mg EQ/ g ms)	Método DPPH (mg ET/g ms)	Método ABTS (mg ET/g ms)
LS	59 ± 2% ^b	18 ± 4% ^a	90 ± 5% ^a	91 ± 2% ^a
LP	46 ± 3% ^a	25 ± 2% ^b	86 ± 5% ^a	86 ± 2 % ^a
LR	63 ± 3% ^c	20 ± 2% ^a	93 ± 5% ^a	89 ± 3 % ^a

CONCLUSIONES

El presente estudio evidenció que la fermentación es un método simple, y económico que aumenta el valor nutricional del tallo de brócoli. A partir de la cinética de crecimiento microbiano, se establece en 24 h el tiempo de fermentación para alcanzar un máximo contenido en *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus reuteri* y se constata que, de las tres cepas ensayadas, *Lactobacillus reuteri* es la que se adapta mejor a las características intrínsecas del tallo de brócoli. En cuanto a la intensidad de la desestructuración previa, los dos niveles ensayados produjeron un efecto similar sobre el contenido microbiano y las propiedades antioxidantes del tallo de brócoli, que se vieron notablemente mejoradas tras la fermentación. En todos los casos, el tallo de brócoli fermentado presentó recuentos superiores a 10^8 UFC/g, que permanecieron prácticamente invariables tras las etapas de liofilización y molienda final. El producto en polvo desarrollado en esta investigación contribuiría en reducir el desperdicio de los tallos de brócoli y podría ser empleado como potencial ingrediente en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales.

AGRADECIMIENTOS

A mis tutoras, Cristina y Lucía, gracias por la dedicación, respeto y apoyo. A mis compañeros de laboratorio, Claudia, Stevens y Leidy por su colaboración, explicación y paciencia. Al proyecto AGCOOP_D/2018/025

“OBTENCION DE POLVOS DE USO ALIMENTARIO CON PROPIEDADES FUNCIONALES A PARTIR DE RESIDUOS DE LAS LINEAS DE CONFECCION DE HORTALIZAS” financiado por la Agencia Valenciana de Fomento y Garantía Agraria.

REFERENCIAS

- Adebo, O.A., Njobeh, P.B., Adebisi, J.A., Gbashi, F., Phoku J.Z. & Kayitesi, E. (2017). Fermented Pulse-Based Food Products in Developing Nations as Functional Foods and Ingredients. In: Chavarri Hueda, M. (ed). Functional Food – Improve Health through adequate food.
- Alimentación en España 2020/2021. Producción, Industria, Distribución y Consumo. 23ª Edición. Pag 166.
- Bekhit, A. E.D., Lingming K., Mason S.L., Zhou, J.H and Sedcole, J.R. (2013) Upgrading the utilization of brassica wastes: physicochemical properties and sensory evaluation of fermented brassica stalks. *International Food Research Journal* 20(4): 1961-1969.
- Betoret, E., Calabuig-Jiménez, L., Barrera, C., Dalla Rosa, M. (2016). Sustainable drying technologies for the development of functional foods and preservation of bioactive compounds. In *Sustainable Drying Technologies*. InTech.
- Betoret, E.; Betoret, N.; Carbonell, J.V.; Fito, P. Effects of pressure homogenization on particle size and the functional properties of citrus juices. *J. Food Eng.* 2009, 92, 18–23
- Calabuig- Jimenez, L., Betoret N., Barrera, C., Seguí L., Betoret E. (2018). TESIS DOCTORAL. Mejoras tecnológicas para el incremento de la funcionalidad de antioxidantes y probióticos. Contribución a la sostenibilidad de la industria agroalimentaria. Universitat Politècnica de València.
- Campbell-Platt, G. (1994). Fermented foods — a world perspective. *Food Research International*, 27(3): 253-257.
- Chawastek A., Klewicka E., Klewiki R., Sojka M. (2015) Lactic acid fermentation of red beet juice supplemented with waste highbush blueberry-sucrose osmotic syrup as a method of probiotic beverage production- *Journal of Food Processing and Preservation* (40): 780-789.
- Ciska E. And Pathak D.R. (2005) Glucosinolate Derivatives in Stored Fermented Cabbage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (26):7938-43.
- Di cagno R., Coda R., Angelis M., Gobbetti M., (2013) Exploitation of vegetable and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33, pp 1-10
- Domínguez-Perles, R., Martínez- Ballesta, M. Carvajal C., Moreno D.A. Broccoli-derived by products- a promising source of bioactive ingredients. *Journal of Food Science* 75 (4)2010. Pp. 383-392.
- Dunne, C.; O'Mahony, L.; Murphy, L.; Thornton, G.; Morrissey, D.; O'Halloran, S.; Feeney, M.; Flynn, S.; Fitzgerald, G.; Daly, C.; Kiely, B.; O'Sullivan, G.C.; Shanahan, F.; Collins J. K. 2001. «In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings». *The American Journal of Clinical Nutrition* 73(2 Suppl):386S-392S.
- FAO, 2020. La medición de la pérdida y el desperdicio de alimentos en relación con la metodología de evaluación de las pérdidas de alimentos. Pag. 3.
- Filannino P., Bai Y., Di Cagno R., Gobbetti M., y Gänzle M. (2015) Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. During fermentation of cherry juice and broccoli puree. *Food microbiology*. Volume 46, pages 272-279.
- Guan N., He X., Wang S., Liu F., Huang Q., Fu X., Zhang B. (2020) Cell Wall Integrity of Pulse Modulates the in Vitro Fecal Fermentation Rate and Microbiota Composition *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68 (4), pp. 1091-1100
- Gustavsson J., Cederberg C., Sonesson U., van Otterdijk R., Meybeck A. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO); Rome, Italy: 2011. Global Food Losses and Food Waste– Extent, Causes and Prevention.
- Hutkins, R. (2019). *Microbiology and technology of fermented foods*. London, UK: Wiley Press.

- Hwang, J.H.; Lim, S.B. Antioxidant and anticancer activities of broccoli by-products from different cultivars and maturity stages at harvest. *Prev. Nutr. Food Sci.* 2015, 20, 8–14.
- Latte K.P., Appel K.E., Lampen A. (2011) Health benefits and possible risks of broccoli-an overview. *Food Chem Toxicol.* 49 (12): 3287-309.
- Liu, M., Zhang, L., Lan Ser, S., Cumming J.R. and Mo Ku K. (2018). Comparative Phytonutrient Analysis of Broccoli By-Products: The Potentials for Broccoli By-Product Utilization. *Molecules* 23, 900
- Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Soobrattee, M.A., Aruoma, O.I. (2002). Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp. 5042–5047.
- Martínez-Las Heras, R., Landines, E., Heredia, A., Castelló, M. and Andrés, A. (2017). Influence of drying process and particle size of persimmon fibre on its physicochemical, antioxidant, hydration and emulsifying properties. *Journal of Food Science and Technology*, 54(9), pp.2902-2912.
- Nguyen T.H., Nagasaka R., Ohshima T. (2015) Effects of extraction solvents, cooking procedures and storage conditions on the contents of ergothioneine and phenolic compounds and antioxidative capacity of the cultivated mushroom *Flammulina velutipes* International Journal of Food Science and Technology, 47, pp. 1193-1205
- Palani S., Kavitha J. (2016) Phytochemical screening, GC-MS analysis and antioxidant activity of marine algae chlorococcum humicola. *World Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. Volume 5, 1154-1167.
- Passot, S.; Cenard, S.; Douania, I.; Tréléa, I.C.; Fonseca, F. Critical water activity and amorphous state for optimal preservation of lyophilised lactic acid bacteria. *Food Chem.* 2012, 132, 1699–1705
- Pereira DI, McCartney AL, Gibson GR. 2017. An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of Its cholesterol-lowering properties. *Appl Environ Microbiol* ;(8):4743-4752.
- Podsędek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 40(1), 1–11.
- Moreno D.A., García-Viguera C. (2006) El brócoli fuente de ingredientes funcionales: glucosinolatos. *Alimentación, Nutrición, Salud* 1136-4815/08/49-53.
- Olagunju, A.I. & Ifesan, B.O.T. (2013). Changes in nutrient and antinutritional contents of sesame seeds during fermentation. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2(6): 2407-2410
- 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. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.12623
- Animawo, I.A., Nmerole, E.C., Idoko, P.I. & Akubor, P.I. (2003). Effects of fermentation on nutrient content and some functional properties of pumpkin seed (*Telfaria occidentalis*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 58(3): 1-9
- Onweluzo, J. & Nwabugwu, C.C. (2009). Fermentation of Millet (*Pennisetum americanum*) and Pigeon Pea (*Cajanus cajan*) Seeds for Flour Production: Effects on Composition and Selected Functional Properties. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, pp. 1231–1237.
- Roobab, U.; Batool, Z.; Manzoor, M.F.; Shabbir, M.A.; Khan, M.R.; Aadil, R.M. Sources, formulations, advanced delivery and health benefits of probiotics. *Curr. Opin. Food Sci.* 2020, 32, 17–28.
- Roig, S. (2017). Caracterización del polvo obtenido a partir de residuo de arándano y su uso como ingrediente funcional en la formulación de galletas. Universidad Politécnica de Valencia. Trabajo fin de grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 1-47
- Sánchez-Pujante P.J, Gionfriddo, M., Sabater-Jaraa A.B, Almagro, L., Pedreño M.A, Diaz-Vivancosa P. (2020). Enhanced bioactive compound production in broccoli cells due to coronatine and methyl jasmonate is linked to antioxidative metabolism. *Journal of Plant Physiology*, 248, 153136.

- Saori C., Guergoletto K.B., Garcia S. (2016) Development of Blueberry and Carroy Juice Blend Fermented by *Lactobacillus reuteri* LR92. *Beverages*, 2, 37.
- Schwab, C., Vogel, R. & Gänzle, M.G. Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying. *Cryobiology*. 2007, 55(2), 108–114.
- Starzyńska–Janiszewska, A. & Stodolak, B. (2011). Effect of Inoculated Lactic Acid Fermentation on Antinutritional and Antiradical Properties of Grass Pea (*Lathyrus sativus* ‘Krab’) Flour. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61(4): 245-249. doi: 10.2478/v10222-011-0027-3.
- Sharma R., Garg p., Kumar P., Kant S., Kulshrestha S. (2020) Microbial Fermentation and Its Roli in Quality Improvement of Fermented Foods (6), 106.
- Shahidi, F., Liyana-Pathirana, C. and Wall, D. (2006). Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions. *Food Chemistry*, 99(3), pp.478-483.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.
- Vasanthi H.R., Mukherjee S., Das D.K. (2009). Potential Health Benefits of Broccoli – A Chemico- Biological Overview. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 9, 749-759.
- Wolfe, K., Wu, X., Liu, R. H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(3), 609-614
- World Health Organization; Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation*; FAO: Rome, Italy, 2006; Volume 85.
- Wu C. , Li T., Qi J., Jiang T., Xu H., Lei H. (2020) Effects of lactic acid fermentation-based biotransformation on phenolic profiles, antioxidant capacity and flavor volatiles of apple juice. *LWT*, 122, p. 109064
- Xing Q., Dekker S., Kyriakopoulou K., Boom R.M., Smid E.J., Schutyser M.A. (2020) Enhanced nutritional value of chickpea protein concéntrate by dry separation and solid state fermentation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 59 ,p. 102269
- Xu X., Bao Y., Wu B., Lao F., Hu X., Wu J. Chemical analysis and flavor properties of blended orange, carrot, apple and Chinese jujube juice fermented by selenium-enriched probiotics. *Food Chemistry*, 289 (2019), pp. 250-258
- Yan X.C., Ji H.w., McAuley C., Ann M.A., Shiferaw N.T. (2019). Fermentation for enhancing the bioconversion of glucoraphanin into sulforaphane and improve the functional attributes of broccoli puree. *Journal of Functional Foods* 61, 103461.
- Yoon, K.Y., Woodams, E.E. and Hang, Y.D. 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresour. Technol.* 97, 1427–1430