



# EVALUACIÓN DEL IMPACTO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO CON *PLEUROTUS* *OSTREATUS* EN LAS PROPIEDADES DE LA QUINOA



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

## TRABAJO FINAL DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**Alumna: Paula Mor Llombart**

**Tutora: Ana Belén Heredia Gutiérrez**

**Cotutora: Ana M<sup>a</sup> Andrés Grau**

**Cotutora: Andrea Asensio Grau**

**Directora experimental: Janaina Sánchez García**

Curso 2020-21

Valencia, 23 de julio de 2021, Universitat Politècnica de València





## EVALUACIÓN DEL IMPACTO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO CON *PLEUROTUS OSTREATUS* EN LAS PROPIEDADES DE LA QUINOA

### RESUMEN

La quinoa (*Chenopodium quinoa*) es un pseudocereal rico en proteínas, fibra y almidón, y fuente de minerales, vitaminas y compuestos bioactivos. Su consumo contribuye a la sostenibilidad ambiental y su alta adaptabilidad a medios de cultivos desfavorables lo convierte en una buena alternativa para abastecer la demanda alimentaria en el futuro. Sin embargo, presenta factores antinutricionales como las saponinas, taninos o ácido fítico que dificultarían su absorción tras el proceso digestivo. La fermentación es un proceso de biotransformación donde intervienen microorganismos que permitirían ensalzar la biodisponibilidad de los compuestos y la digestibilidad proteica. Entre ellos, *Pleurotus ostreatus* es un hongo comestible con un valor nutricional muy interesante y unas características organolépticas únicas.

De esta manera, este trabajo tiene el objetivo de evaluar la capacidad fermentativa en estado sólido del hongo *Pleurotus ostreatus* en grano y harina de quinoa. Así pues, se estudió la cinética del crecimiento del hongo atendiendo a parámetros como el pH, acidez, actividad de agua, biomasa, tasa respiratoria y sólidos solubles. Igualmente, se analizaron las propiedades nutricionales del producto como el contenido proteico, almidón, actividad antioxidante, polifenoles y ácido fítico a distintos tiempos de fermentación. En general, se observó un aumento proteico acompañado de una reducción notable de ácido fítico (antinutriente) y almidón, pero también de las propiedades antioxidantes del sustrato. La fermentación en grano de quinoa obtuvo mejores resultados en la mayoría de las determinaciones realizadas. En conclusión, mayores tiempos de fermentación (días 12 y 14) permitieron obtener mejores resultados en relación con el contenido de proteína final y la reducción en antinutrientes.

---

**Palabras clave:** proteína, digestibilidad, factores antinutricionales, antioxidantes, fenoles, cinética de crecimiento.

### RESUM

La quinoa (*Chenopodium quinoa*) és un pseudocereal ric en proteïnes, fibra i midó, i font de minerals, vitamines i compostos bioactius. El seu consum contribueix a la sostenibilitat ambiental i la seua alta adaptabilitat a terrenys de cultiu desfavorables el converteix en una bona alternativa per atendre la demanda alimentària en el futur. Malgrat això, presenta factors antinutricionals com les saponines, tanins o àcid fític que dificultarien la seua absorció després del procés digestiu. La fermentació és un procés de biotransformació on intervenen microorganismes que permetrien exaltar la biodisponibilitat dels compostos i la digestibilitat proteica. Entre ells, *Pleurotus ostreatus* és un fong comestible amb un valor nutricional molt interessant i unes característiques organolèptiques úniques.

D'aquesta manera, aquest treball té l'objectiu d'evaluar la capacitat fermentativa en estat sòlid del fong *Pleurotus ostreatus* en gra i farina de quinoa. Així doncs, es va estudiar la cinètica de creixement del fong atenent a paràmetres com el pH, acidesa, activitat d'aigua, biomassa, taxa respiratòria i sòlids solubles. Igualment, es van analitzar les propietats nutricionals del



producte com el contingut proteic, midó, activitat antioxidant, polifenols i àcid fític a diferents temps de fermentació. En general, es va observar un augment proteic acompanyat d'una reducció notable d'àcid fític (antinutrient) i midó, però també de les propietats antioxidants del substrat. La fermentació en gra de quinoa va obtenir millors resultats en la majoria de les determinacions realitzades. En conclusió, majors temps de fermentació (dies 12 i 14) van permetre obtenir millors resultats en relació amb el contingut de proteïna final i la reducció en antinutrients.

---

**Paraules clau:** proteïna, digestibilitat, factors antinutricionals, antioxidants, fenols, cinètica de creixement.

## ABSTRACT

Quinoa (*Chenopodium quinoa*) is a pseudocereal rich in protein, fiber and starch, and a source of minerals, vitamins and bioactive compounds. Its consumption contributes to environmental sustainability and its high adaptability to unfavorable environments makes it a good alternative to supply food demand in the future. However, it has antinutritional factors such as saponins, tannins or phytic acid that would hinder its absorption after the digestive process. Fermentation is a biotransformation process where microorganisms intervene that would enhance the bioavailability of the compounds and protein digestibility. Among them, *Pleurotus ostreatus* is an edible mushroom with a very interesting nutritional value and unique organoleptic characteristics.

In this way, this work has the objective of evaluating the fermentative capacity in solid state of the *Pleurotus ostreatus* fungus in grain and quinoa flour. Thus, the kinetics of the fungus growth was studied according to parameters such as pH, acidity, water activity, biomass, respiratory rate and soluble solids. Likewise, the nutritional properties of the product were analysed, such as protein content, starch, antioxidant activity, polyphenols and phytic acid at different fermentation times. In general, an increase in protein was observed accompanied by a notable reduction in phytic acid (antinutrient) and starch, but also the antioxidant properties of the substrate. Quinoa grain fermentation obtained better results in most of the determinations made. In conclusion, longer fermentation times (days 12 and 14) allowed to obtain better results in relation to the final protein content and the reduction in antinutrients.

---

**Keywords:** protein, digestibility, antinutritional factors, antioxidants, phenols, growth kinetics.

**Alumna:** Paula Mor Llombart

**Tutora:** Ana Belén Heredia Gutiérrez

**Cotutora:** Ana M<sup>a</sup> Andrés Grau

**Cotutora:** Andrea Asensio Grau

**Directora experimental:** Janaina Sánchez García



## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Sostenibilidad medioambiental y soberanía alimentaria.....	1
1.2. El pseudocereal quinoa .....	1
1.3. La fermentación en estado sólido como estrategia de mejora nutricional y funcional ....	3
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1 Materia prima.....	7
3.2 Reactivos .....	7
3.3 Fermentación en estado sólido.....	7
3.3.1 Preparación del inóculo.....	7
3.3.2 Preparación e inoculación del sustrato.....	7
3.4 Determinaciones fisicoquímicas de seguimiento de la fermentación .....	8
3.4.1 Tasa respiratoria (CO <sub>2</sub> y O <sub>2</sub> ).....	9
3.4.2 pH y contenido en sólidos solubles (°Brix) .....	9
3.4.3 Acidez .....	9
3.4.4 Actividad de Agua a <sub>w</sub> .....	10
3.5 Determinaciones analíticas sobre el sustrato antes y después de la fermentación.....	10
3.5.1 Caracterización del sustrato no fermentado.....	10
3.5.2 Crecimiento fúngico en biomasa.....	10
3.5.3 Almidón total.....	11
3.5.4 Proteína total .....	12
3.5.5 Polifenoles totales .....	11
3.5.6 Actividad antioxidante .....	12
3.5.7 Fitatos.....	14
3.6 Análisis estadístico de los resultados .....	14
4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
4.1 Caracterización de la materia prima .....	15
4.2 Cinética de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> .....	16
4.3 Evolución de las propiedades fisicoquímicas del sustrato a lo largo del proceso de fermentación.....	22
4.4 Impacto de la fermentación en las propiedades antioxidantes, antinutrientes y compuestos bioactivos del sustrato.....	23
5.CONCLUSIONES .....	28
6.BIBLIOGRAFÍA.....	29



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional de la materia prima en grano y harina de quinoa. ....	15
--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparativa entre fermentación sumergida (SmF) y fermentación en estado sólido (SSF). Adaptado de Garrido-Galand et al., (2021). ....	3
Figura 2. Plan experimental del trabajo. ....	8
Figura 3. Harina de quinoa inoculada con <i>Pleurotus ostreatus</i> tras 14 días de fermentación. ....	8
Figura 4. Tasas respiratorias de consumo de O <sub>2</sub> , emisión de CO <sub>2</sub> en función del tiempo de fermentación en grano (A) y harina (B) de quinoa; mL de CO <sub>2</sub> y O <sub>2</sub> por 100 mL de aire en el espacio de cabeza de los botes inoculados en grano (C) y harina (D) de quinoa. ....	16
Figura 5. Coeficiente de respiración (CR) en grano y harina de quinoa durante el proceso fermentativo. ....	18
Figura 6. Evolución de la biomasa presente en el medio durante el transcurso de la fermentación. ....	19
Figura 7. Evolución de la variación neta de almidón durante el transcurso de la fermentación..	19
Figura 8. Evolución del incremento neto de proteína durante el transcurso de la fermentación. ....	21
Figura 9. Evolución del pH (A), acidez titulable (B), contenido en sólidos solubles (C) y actividad del agua (D) durante la fermentación fúngica en grano y harina de quinoa. ....	22
Figura 10. Efecto de la fermentación fúngica en la actividad antioxidante evaluada mediante los métodos ABTS (A), DPPH (B) y FRAP (C) y el contenido en polifenoles (D) en grano y harina de quinoa. ....	24
Figura 11. Efecto de la fermentación fúngica en el contenido de fitatos en grano y harina de quinoa. ....	26

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Sostenibilidad medioambiental y soberanía alimentaria

El aumento de la población mundial junto con el impacto negativo del cambio climático sobre la productividad de los terrenos cultivables (Ray et al., 2019) podría provocar una menor accesibilidad a alimentos en el futuro. Este hecho está promoviendo la búsqueda de especies cultivables que abastezcan a la población de alimentos ricos en nutrientes. Afortunadamente, cultivos infrautilizados pero nutricionalmente importantes como el mijo, quinoa, amaranto y alforfón, entre otros, son altamente resistentes a entornos hostiles (sequia, salinidad y temperaturas extremas) y presentan un alto rendimiento con recursos limitados (Rodríguez et al., 2020). En este sentido, la FAO estima (FAO, 2017) que la demanda alimentaria en 2050 tendrá que ser abastecida de medios marginales. Asimismo, la gran dependencia de los cultivos de cereales en todo el mundo y que soporta el 50% de la demanda calórica global, estaría provocando deficiencias en micronutrientes.

La desnutrición se define como una condición fisiológica anormal causada por un consumo inadecuado, desequilibrado o excesivo de macronutrientes y / o micronutrientes. En concreto, la desnutrición proteico-energética (PEM) es un problema presente en África y otras naciones en desarrollo causado por deficiencias en proteína y/o energía debido a dietas basadas únicamente en cereales que no son capaces de garantizar la seguridad nutricional (Sarwar et al., 2013).

En este contexto, es necesario un nuevo enfoque que tenga en cuenta estas áreas de cultivo con alimentos de calidad en términos de enriquecimiento, biofortificación y nutrición para conseguir una futura soberanía alimentaria de forma más sostenible (Jacobsen et al., 2013). Los cultivos de pseudocereales desempeñan un papel fundamental como alimento base rico en micronutrientes y/o fitonutrientes en ciertas culturas. Son ricos en almidón, fibra y proteínas con cantidades abundantes de aminoácidos ricos en azufre. También son una buena fuente de minerales (calcio, hierro y zinc), vitaminas y fitoquímicos como saponinas, polifenoles, fitoesteroles, fitoesteroides y betalainas con posibles beneficios para la salud. Si bien el cultivo de cereales está muy extendido, el cultivo de los pseudocereales se ha localizado tradicionalmente en las zonas geográficas de origen. Sin embargo, el interés por esta fuente alimentaria se ha visto incrementado por ser cultivos que se adaptan bien a condiciones climáticas adversas y por su perfil nutricional de mayor calidad respecto a los cereales, sobre todo en lo que se refiere a su elevado contenido proteico de alto valor biológico. Esto último posicionaría a los pseudocereales como una fuente de proteína muy prometedora respecto a las proteínas de origen animal pues se integraría mejor en un concepto de seguridad alimentaria y sostenibilidad ante el incremento de la población mundial (Fasolin et al., 2019).

### 1.2. El pseudocereal quinoa

La quinoa (*Chenopodium quinoa*) es un pseudocereal perteneciente a la familia de las dicotiledóneas y originario de América del sur. Sus primeros indicios de su uso datan del 5000 a.C y desde entonces ha cubierto un gran rol en la nutrición humana y animal. Los cultivares de quinoa son muy resistentes a distintos pH del suelo y pueden tolerar medios pobres y áridos (Martínez et al., 2009). Además, tolera temperaturas extremas (desde los -8 °C a los 35°C), salinidad elevada y sequía. Asimismo, crece perfectamente a elevada altitud y su gran variabilidad genética le permite adaptarse a un amplio rango de condiciones ambientales. Por tanto, la quinoa es un cultivo altamente resiliente y puede llegar a ser una alternativa sostenible medioambientalmente.

La quinoa es además una fuente de proteína de alta calidad ya que presenta los nueve aminoácidos esenciales, que son los que el cuerpo humano no puede sintetizar por sí mismo, y un contenido de lisina relativamente elevado y muy cercano a los requerimientos establecidos por la FAO para la nutrición humana. Los contenidos de metionina y cisteína también son altos en comparación a los cereales comunes; principalmente deficientes en lisina, treonina y triptófano (Motta et al., 2019). La presencia de estos aminoácidos podría solventar problemas de desnutrición proteica en países en desarrollo y subdesarrollo dependientes en gran medida de dietas basadas en cereales que carecen de uno o más aminoácidos esenciales (Hoffmann y Falvo, 2004). Además, esta composición aminoacídica balanceada y de gran valor biológico es incluso comparable a la proteína de la leche (Koziol, 1992; Ranhotra et al., 1993). Concretamente, la quinoa está formada mayoritariamente por proteínas solubles como las albúminas 2S y globulinas de tipo 11S, las cuales son más accesibles a proteasas que las gluteninas y gliadinas; estas últimas presentes mayoritariamente en cereales. Presenta un alto contenido en carbohidratos (51-61% en base seca) que le permite ser usada de la misma forma que los cereales para la producción de harinas (Repo-Carrasco et al., 2003; Mastebroek et al., 2000). Además, su contenido en fibra varía del 7 al 26,5% (Joshi et al., 2019) y está compuesta mayoritariamente de polisacáridos insolubles (78% del contenido total de fibra dietética) que incluyen homogalacturonanos y rhamnogalacturonano-I, así como xiloglucanos altamente ramificados (30%) y celulosa (Lamothe et al., 2015). Igualmente, contiene un contenido lipídico (4-7,5%) mucho mayor que otros cereales donde los ácidos grasos insaturados son los predominantes (71-84,5% de los lípidos totales). Estos ácidos grasos insaturados vienen representados por el linoleico (C18:2,  $\omega$ -6) y el ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3,  $\omega$ -3) (Vera et al., 2019). En términos de calidad nutricional de la fracción lipídica, la quinoa presenta una relación  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 de 7:1. Parece ser que el ratio  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 presentaría mayor importancia que el contenido total en ácidos grasos (Tang et al., 2016). Complementariamente, la quinoa es una excelente fuente de vitaminas B y E, antioxidantes ( $\alpha$  y  $\gamma$ -tocoferoles) y minerales como el calcio, hierro, potasio, magnesio, cobre y manganeso.

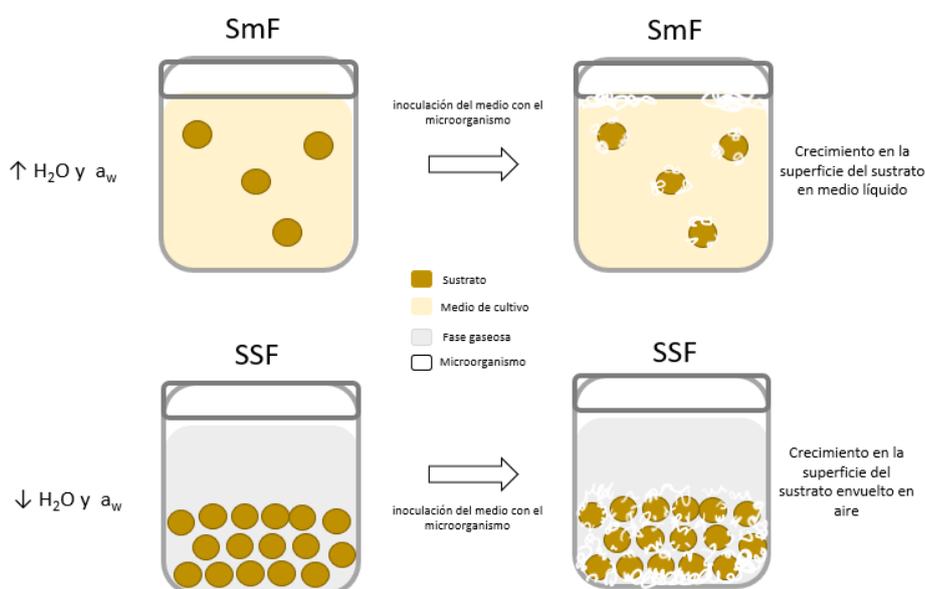
Más allá de su excelente perfil nutricional, la ausencia de gluten en este pseudocereal la convierte en una buena alternativa para el desarrollo de productos de alta palatabilidad que aseguren una ingesta adecuada de nutrientes en sujetos celíacos y, además, su bajo índice glucémico la posiciona como alimento clave para personas diabéticas.

Sin embargo, a pesar de estas cualidades nutricionales, la quinoa presenta algunos factores antinutricionales derivados del metabolismo secundario de las plantas. Los principales factores antinutricionales (FAN) identificados son las saponinas, el ácido fítico, los taninos, nitratos, oxalatos y los inhibidores de la tripsina. Las saponinas, presentes en las capas externas del grano (epispermo) son las que confieren sabor amargo. Asimismo, la presencia de fitatos y taninos reducen la biodisponibilidad de ciertos minerales, y por tanto su bioabsorción tras el proceso digestivo. El fitato (mio-inositol-6-fosfato) es el principal inhibidor de minerales; el ácido fítico se une a cationes con carga positiva como el hierro, zinc, calcio y proteínas formando complejos de fitato (IP6) que son estables a pH intestinal (6-7) (Schlemmer et al., 2009). Por tanto, su degradación es importante para mejorar la bioasimilación de estos minerales. Ciertos tratamientos térmicos como el tostado, secado o la cocción pueden ser aplicados con el objetivo de reducir el contenido en antinutrientes. Así mismo, ciertos bioprocesos como la germinación o fermentación microbiana también parecen tener un impacto positivo en la reducción de estos compuestos. Concretamente, diversos estudios apuntan a que el proceso de fermentación podría mejorar la calidad nutricional y organoléptica del sustrato, así como su aumentar la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos (Thakur et al., 2021) y disminuir la presencia de los FAN (Dulínski et al., 2017; Kumitch et al., 2019; Castro-Alba et al., 2019).

### 1.3. La fermentación en estado sólido como estrategia de mejora nutricional y funcional

La fermentación es una técnica de conversión biológica de sustratos complejos en compuestos simples mediante la utilización de microorganismos como bacterias u hongos. En el transcurso de esta acción metabólica se producen nuevos compuestos, pero además se liberan otros presentes en el sustrato. Entre los metabolitos secundarios producidos destacan los antibióticos, enzimas, péptidos o factores de crecimiento (Machado et al., 2004; Robinson et al., 2001). En los últimos años, la industria alimentaria ha mostrado un gran interés por los productos fermentados debido a su gran potencial para la salud. Ebner et al. (2014) y Chilton et al. (2015) sugieren la introducción de alimentos fermentados en la dieta y estudios clínicos recientes avalan su impacto positivo en la reducción de enfermedades cardiovasculares, diabetes de tipo 2, control del peso corporal y poder antiinflamatorio en determinadas patologías (Chen et al., 2014; Eussen et al., 2016; Tapsell et al., 2015; Marco et al., 2017).

La fermentación se puede realizar en estado líquido o sumergida conocida por sus siglas en inglés SmF (*Submerged Fermentation*) o bien en estado sólido, SSF (*Solid State Fermentation*) (figura 1). La SmF permite el crecimiento de microorganismos en medios líquidos ricos en nutrientes, un contenido de agua libre y de concentraciones de oxígeno elevadas. Además, presenta la ventaja de ser un proceso con un gran control de parámetros como la temperatura, humedad, pH o aireación (Garrido-Galand et al., 2021). Esta técnica es la más adecuada para microorganismos como las bacterias, las cuales requieren un mayor contenido en humedad (Babu y Satyaranyana, 1996). Por otro lado, la SSF involucra el crecimiento de microorganismos sobre sustratos sólidos rodeados por una fase gaseosa continua en ausencia o casi ausencia de agua libre. Por tanto, esta técnica fermentativa favorecería el crecimiento de hongos u otros microorganismos con menores necesidades de humedad. Sin embargo, el control de las condiciones de fermentación es complejo y se requieren biorreactores eficientes y de gran rendimiento (Mitchell et al., 2006).



**Figura 1.** Comparativa entre fermentación sumergida (SmF) y fermentación en estado sólido (SSF). Adaptado de Garrido-Galand et al., (2021).

Aun así, el interés por esta técnica con una trayectoria histórica de más de 2000 años se ha ido incrementando debido a la posibilidad de usar sustratos baratos como podrían ser los subproductos de la industria agroalimentaria y promover así, una alternativa medioambiental



que fomente el aprovechamiento de estos residuos orgánicos lignocelulíticos (Pandey, 2003). Además, la SSF presenta mayores rendimientos en la conversión del sustrato al producto final, es un proceso sostenible, menos susceptible a contaminaciones (debido a la baja actividad de agua) y con unos procesos de extracción del producto final más económicos y simples (Soccol et al., 2017).

Más allá de la importancia de los parámetros mencionados anteriormente, la estructura y tipo de sustrato a fermentar, así como el microorganismo utilizado son de gran importancia. Un proceso de molienda previo a la fermentación permite reducir el tamaño de partícula y por consiguiente aumentar el área de superficie entre el sustrato y el microorganismo (Olukomaiya et al., 2020). Este incremento en la superficie de contacto confiere un mayor acceso de las enzimas liberadas por los microorganismos y promueve la degradación de factores antinutricionales. Según Nkhata et al., (2018) esto ensalzaría la biodisponibilidad de los compuestos y la digestibilidad proteica.

Por ello, la fermentación en estado sólido es clave en la formulación de nuevos productos fermentados funcionales de valor añadido, y además promueve la bioconversión de residuos orgánicos u otros sustratos con la finalidad de obtener metabolitos biológicamente activos y poder llevar este proceso tecnológico a escala industrial.

En lo relativo a los microorganismos empleados en SSF destacan las levaduras, bacterias y hongos (Singhania et al., 2009). Los microorganismos pueden emplearse como cultivos puros o en forma de co-inóculo (Wu et al., 2018). Bacterias del género *Lactobacillus* como *L. plantarum* promovieron la degradación de los péptidos en quinoa fermentada y la liberación de aminoácidos y compuestos antifúngicos (Dallagnol et al., 2013). Li et al. (2020) fermentó harina de soja con *L. casei* y observó un aumento en la cantidad de compuestos antioxidantes y de aminoácidos esenciales. Asimismo, Rani et al. (2018) ha estudiado la capacidad de las levaduras de liberar compuestos fenólicos y bioactivos en fermentaciones en estado sólido en harinas de arroz y garbanzo negro. De igual forma, fermentaciones fúngicas con *L. rhamnosus* favorecieron el aumento de la actividad antioxidante en cereales. También es común el uso de *Aspergillus oryzae* (Saharan et al., 2017) y *Aspergillus niger* (Kumitch et al., 2019) quienes analizaron el impacto de esta fermentación sobre las propiedades nutricionales de harina de guisante, resultando en una alteración del perfil aminoacídico, así como una disminución de inhibidores de la tripsina y quimiotripsina.

De entre los microorganismos mencionados anteriormente, los hongos son los más utilizados generalmente en la fermentación en estado sólido. Son ricos en carbohidratos, aminoácidos esenciales, fibra, vitaminas y minerales, y su uso confiere una textura, sabor y valor nutricional únicos. Para su correcto crecimiento precisan de nitrógeno, compuestos inorgánicos y fuentes de carbono como la celulosa, hemicelulosa y lignina. Entre las distintas especies fúngicas utilizadas en la SSF destaca *Aspergillus oryzae* o *Rhizopus oligosporus* en la producción de exoenzimas; *Lentinus edodes* y *Pleurotus sp.* en la producción de metabolitos secundarios o *Trichoderma sp.* en bioremediación (Gowthaman et al., 2001). En concreto, las especies *Pleurotus* son degradadores eficientes de material lignocelulósico y pueden crecer en diferentes desechos agrícolas y con una amplia adaptabilidad a diversas condiciones agroclimáticas (Jandiak y Goyal, 1995). Requieren menos nitrógeno y más fuentes de carbono para crecer; por tanto, sustratos ricos en celulosa, hemicelulosa y lignina como el arroz, la paja de trigo, caña de azúcar y cáscaras de semillas de algodón, entre otros, serían sustratos buenos para su el crecimiento. *Pleurotus ostreatus* (seta de ostra) es el segundo hongo comestible más cultivado (Sánchez, 2010) y está reconocido como organismo GRAS (Generally Recognised As Safe). En varios estudios se observó cómo el tratamiento fermentativo de este hongo sobre legumbres o cereales como la avena mejoró su calidad nutricional (Espinosa-Páez, 2017) así



como un efecto positivo en cuanto a actividad antioxidante, contenido total de polifenoles, disminución de antinutrientes como los taninos y una digestibilidad de la proteína mejorada.

En este sentido, *Pleurotus ostreatus* sería un buen candidato para la mejora de las propiedades nutricionales de la quinoa en cuanto al aumento de compuestos bioactivos y el contenido proteico. Este proceso de fermentación fúngica estaría dirigido a la obtención de manera sostenible de un producto alimenticio con una funcionalidad y digestibilidad mejoradas que podría ser orientado a grupos de población específica (personas senior, celíacos, diabéticos, veganos...) y con perspectivas a una aplicación industrial.



## 2.OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

### 2.1 Objetivos

El presente trabajo se centra en evaluar la capacidad fermentativa en estado sólido del hongo *Pleurotus ostreatus* en granos y harina de quinoa y su repercusión sobre el perfil nutricional y funcional.

Para alcanzar el objetivo principal, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la influencia de la estructura del sustrato (grano o harina de quinoa) en la cinética de la fermentación fúngica.
2. Estudiar el efecto de la fermentación en las propiedades fisicoquímicas de los sustratos durante 14 días.
3. Analizar la contribución del proceso fermentativo a la capacidad antioxidante de los sustratos fermentados y al contenido en fenoles durante el tiempo de fermentación.
4. Evaluar la reducción en el contenido en antinutrientes en los sustratos, concretamente ácido fítico, durante la fermentación.

### 2.2 Plan de trabajo

1. Caracterización de los sustratos de harina y grano de quinoa en términos de humedad, proteína, lípidos, cenizas y almidón.
2. Estudios preliminares de acondicionamiento del sustrato para la fermentación con *Pleurotus ostreatus*.
3. Inoculación y fermentación en estado sólido de los granos y harina de quinoa.
4. Determinación de las propiedades fisicoquímicas del sustrato durante la fermentación en términos de pH, actividad del agua, contenido en sólidos solubles y acidez.
5. Evaluación de la actividad metabólica del hongo mediante el seguimiento durante la fermentación de la tasa respiratoria, producción de biomasa, evolución del contenido en almidón y proteína.
6. Análisis de la actividad antioxidante (ABTS, FRAP y DPPH), así como del contenido en fenoles totales en los sustratos a lo largo de la fermentación.
7. Determinación del contenido en ácido fítico en los sustratos durante el proceso fermentativo.
8. Análisis estadístico de los resultados obtenidos y la estimación del tiempo de fermentación óptimo a partir de los parámetros evaluados.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materia prima

Para este trabajo se utilizaron granos de quinoa (*Chenopodium quinoa*) suministrados por la empresa Molendum S.L. (Zamora, España), número de lote 01406. Asimismo, se empleó harina de quinoa mediante la molienda de estos mismos granos con la ayuda del robot de cocina Thermomix® TM-6 y su posterior tamizado. La cepa de *Pleurotus ostreatus* se adquirió en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (20311/ Lote 18-10-2016).

#### 3.2 Reactivos

Los reactivos para el medio de cultivo fueron extracto de levadura, extracto de malta y glucosa procedentes de la casa comercial Scharlau (España).

Para la realización de las determinaciones analíticas se utilizaron los productos enumerados a continuación: acetilacetona ( $C_5H_8O_2$ ) y ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) de Carlo Erba Reagents (España); dodecahidrato de sulfato de amonio férrico ( $NH_4Fe(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ ) y ácido clorhídrico (HCl) de AppliChem Panreac (Estados Unidos); fitato de sodio de Biosynth Carbosynth® (Estados Unidos); carbonato sódico ( $Na_2CO_3$ ) de la casa comercial Scharlau (España) y etanol ( $CH_3OH$ ), metanol ( $CH_3OH$ ), ácido gálico ( $C_7H_6O_5$ ), hidróxido de sodio (NaOH), , trolox ( $C_{14}H_{18}O_4$ ) , TPTZ ( $C_{18}H_{12}N_6$ ), cloruro de hierro (III) hexahidratado ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ), ABTS ( $C_{18}H_{24}N_6S_4$ ), DPPH ( $C_{33}H_{44}N_5O_6$ ), ácido acético ( $C_2H_4O_2$ ), persulfato de potasio ( $(K_2S_2O_8)$ ), ácido acético glacial, cloruro de calcio ( $CaCl_2$ ), dihidrato, p-dimetilamino benzaldehído y glucosa de la casa comercial Sigma-Aldrich (España).

Para la determinación del almidón se empleó un kit enzimático de la casa comercial Megazyme (Total Starch AA/AMG assay, Megazyme, Irlanda).

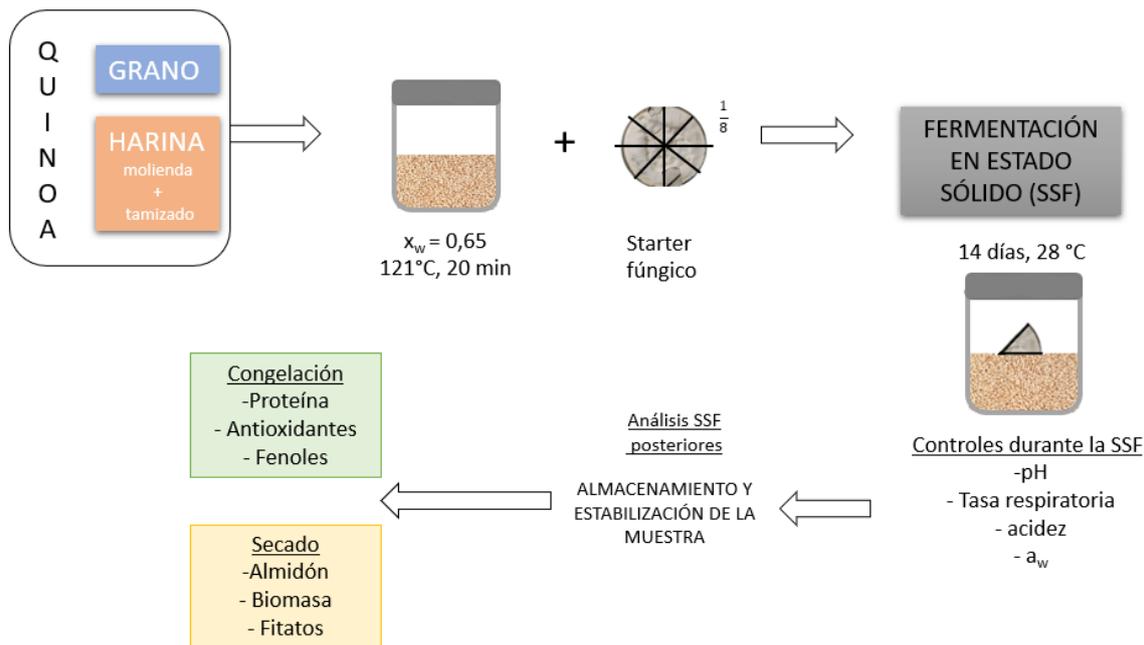
#### 3.3 Fermentación en estado sólido

##### 3.3.1 Preparación del inóculo

Se tomaron diferentes colonias procedentes del cultivo de *Pleurotus ostreatus* sembrado en placa y se inoculó caldo de cultivo compuesto por 0,4% de extracto de levadura, 0,1% de extracto de malta y 0,4% de glucosa. El inóculo líquido se incubó en la estufa durante 14 días a 28 °C. Posteriormente, se prepararon varias placas Petri de vidrio con 10 g de harina de quinoa y 15,09 g de agua para la obtención de un starter con una humedad de sustrato del 65%. Una vez esterilizadas a 121°C, se inoculó 1 mL de suspensión de esporas y se incubaron las placas a 28 °C durante 2 semanas hasta ocupar el micelio la superficie de la placa de forma homogénea. Asimismo, se realizó el balance de masas correspondiente para calcular el agua adicionada y se comprobó que al añadirla a los sustratos, la humedad quedaba en un 65% o cercana a esto.

##### 3.3.2 Preparación e inoculación del sustrato

La fermentación en estado sólido se realizó en quinoa en grano y en harina en botes de vidrio de 250 mL de capacidad. Para ello, se introdujeron 35 g de muestra de quinoa (harina o grano) en cada bote, se humidificaron hasta una humedad del 65% mediante la adición de 55,63 mL de agua y se autoclavó el sustrato húmedo a 121 °C durante 20 min. El sustrato una vez esterilizado, se inoculó con 1/8 de placa Petri del cultivo iniciador “starter” en su superficie y en condiciones de asepsia en la campana de flujo laminar (Telstar, Biostar®). La figura 2 contiene una representación visual del proceso.



**Figura 2.** Plan experimental del trabajo.

En total, se inocularon un total de 3 botes por tiempo de fermentación, los cuales fueron 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 días para grano y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 y 14 días para la harina. La diferencia establecida entre grano y harina en cuanto a los tiempos de fermentación se debe a una presumible cinética de crecimiento del micelio más rápida en harina que en grano. Adicionalmente, se prepararon dos controles de grano y harina sin inóculo (día 0 y día 14). Todo el proceso tuvo lugar en estufa de incubación (Selecta, modelo 2002961) a 28 °C. A cada uno de los tiempos, se retiraron los tres botes de la estufa (figura 3) para llevar a cabo las determinaciones analíticas detalladas a continuación.



**Figura 3.** Harina de quinoa inoculada con *Pleurotus ostreatus* tras 14 días de fermentación.

### 3.4 Determinaciones fisicoquímicas de seguimiento de la fermentación

Inmediatamente tras la recogida de muestras se analizó el pH, la actividad del agua, la acidez y los sólidos solubles (°Brix) en los distintos tiempos fermentativos. Posteriormente, se separaron 100 g de la muestra sobrante en una bandeja para su posterior secado y molienda (solo en grano de quinoa), y el resto se almacenó en el congelador a -20 °C. Las muestras congeladas y fermentadas se utilizaron para el análisis de la actividad antioxidante y contenido

proteico. Las muestras secadas y fermentadas se usaron para las determinaciones de biomasa, fitatos y almidón.

### 3.4.1 Tasa respiratoria (CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>)

La composición de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> se determinó en el espacio de cabeza de los botes mediante el analizador de gases (Dansensor CheckPoint3, Mocon). Para ello, se introdujo la sonda de aguja en las tapas de los botes previamente perforados y tapados con esparadrapo (siempre que no se realizara la medida) para evitar cualquier intercambio de gases con el exterior. Esta medida permitió un seguimiento de la actividad metabólica del hongo. En todo momento, se controló que los valores de CO<sub>2</sub> no superasen el 30% (Chang et al., 2004) y que la disponibilidad de oxígeno fuese suficiente para permitir las condiciones óptimas de crecimiento del hongo en aerobiosis. El medidor presentaba una sonda de aguja que se introdujo en las tapas de los botes previamente perforados y tapados con esparadrapo. Las medidas se tomaron diariamente en cada muestra y en la cabina de flujo laminar para mantener las condiciones de asepsia. Para el cálculo de la tasa respiratoria experimental (expresada en términos de consumo de O<sub>2</sub> o emisión de CO<sub>2</sub>) se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$TR_{O_2} = \left[ \frac{(G_{O_2})_t - (G_{O_2})_{t+1}}{\Delta t} \right] \cdot \frac{V_a}{M} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$TR_{CO_2} = \left[ \frac{(G_{CO_2})_{t+1} - (G_{CO_2})_t}{\Delta t} \right] \cdot \frac{V_a}{M} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde TR<sub>O<sub>2</sub></sub> y TR<sub>CO<sub>2</sub></sub> son las tasas respiratorias de O<sub>2</sub> (mL O<sub>2</sub>·kg<sup>-1</sup>·días<sup>-1</sup>) y de CO<sub>2</sub> (mL CO<sub>2</sub>·kg<sup>-1</sup>·días<sup>-1</sup>) respectivamente, G<sub>O<sub>2</sub></sub> y G<sub>CO<sub>2</sub></sub> son las concentraciones de gases en el espacio de cabeza (mL/mL aire), t el tiempo (días), V<sub>a</sub> el volumen de aire en el recipiente (mL) y M la masa de la muestra (kg).

Asimismo, el coeficiente de respiración (CR) se calculó como el cociente entre el porcentaje de CO<sub>2</sub> y el porcentaje de O<sub>2</sub> en el espacio de cabeza de los distintos recipientes inoculados.

### 3.4.2 pH y contenido en sólidos solubles (°Brix)

Para poder determinar el pH, y al ser una muestra sólida, previamente y con la ayuda de un mortero se trituraron 6 g de muestra de grano o harina de quinoa y se añadieron 60 mL de agua. Posteriormente, se mantuvo en agitación 2 min en un vaso de precipitado y se retiraron 10 mL para realizar la determinación de los grados °Brix. El volumen restante (50 mL) se utilizó para medir el pH con un pHmetro previamente calibrado (Mettler Toledo Seven Compact). Los °brix se determinaron añadiendo directamente 2-3 gotas con una pipeta Pasteur en el refractómetro (Atago Abbe NAR-3T, Japón).

### 3.4.3 Acidez

Para determinar la acidez se utilizó el método estandarizado propuesto por Rani et al. (2018). Para ello, una vez medido el pH, la muestra se neutralizó con NaOH 0,5 M hasta alcanzar un pH de 8,20. Finalmente, el valor de acidez se calculó siguiendo la ecuación 3:

$$\text{Ác. Láctico (\%)} = \frac{V_{NaOH} \cdot 0.1 \cdot V_{final} \cdot m_{ácido} \cdot 100}{V_{muestra} \cdot m_{muestra} \cdot 1000} \quad \text{Ecuación 3}$$



Donde  $V_{\text{NaOH}}$  es el volumen de NaOH consumido (mL),  $V_{\text{final}}$  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),  $V_{\text{muestra}}$  es el volumen de la muestra (mL) y  $m_{\text{muestra}}$  es la cantidad de muestra analizada (g).

#### 3.4.4 Actividad de Agua $a_w$

Se determinó la actividad del agua en las muestras fermentadas con un medidor de actividad de agua de punto de rocío (Aqualab 4TE).

### 3.5 Determinaciones analíticas sobre el sustrato antes y después de la fermentación

#### 3.5.1 Caracterización del sustrato no fermentado

La caracterización de la materia prima se realizó tanto en grano de quinoa como en harina. Para ello se determinaron la humedad, el contenido en proteína, lípidos y el contenido en cenizas. La humedad se determinó por gravimetría según el método oficial de la AOAC (2000). Para ello se introdujeron las muestras de peso conocido en la estufa durante 48 horas a 60°C y posteriormente en la estufa a vacío a 60°C durante 48 horas más y se comprobó que había alcanzado un peso constante. El contenido en proteína se estimó por el método de Kjeldhal según la AOAC (2000). Del mismo modo, y de acuerdo con la normativa de la AOAC (2000) se determinó el contenido lipídico por el método de Soxhlet. Seguidamente, se determinó el contenido en cenizas. El contenido en carbohidratos se calculó por diferencia teniendo en cuenta el contenido en lípidos, proteína, humedad y cenizas. Finalmente, el contenido energético se determinó aplicando la ecuación: Energía (kcal) = 4 x ( $g_{\text{proteína}}$  +  $g_{\text{carbohidratos}}$ ) + 9 x ( $g_{\text{lípidos}}$ ).

#### 3.5.2 Crecimiento fúngico en biomasa

Para cuantificar el crecimiento del hongo durante la fermentación de la quinoa se estimó el contenido de glucosamina como medida indirecta del crecimiento fúngico. Los constituyentes de la pared celular del hongo presentan quitina que al descomponerse da lugar a glucosamina. En este sentido, la glucosamina es un indicador que puede orientarnos en el crecimiento fúngico. De acuerdo con Schmidt y Furlong, (2012) la hidrólisis de quitina da lugar a N-acetilglucosamina. Por ello, es posible relacionar el contenido en glucosamina con el crecimiento del hongo.

En primer lugar, para la determinación de glucosamina, la muestra se secó en estufa durante 48 horas a 65 °C. Para poder estimar el contenido en glucosamina, es necesario realizar la hidrólisis de la quitina de acuerdo con Scotti et al. (2001). Para ello, se incubaron 100 mg de muestra seca a 25°C con 2,4 mL de 72%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en un Erlenmeyer durante 24 horas. Seguidamente, se diluyeron las muestras con 55 mL de agua destilada y se autoclavaron durante 2 horas a 121°C para así producir hidrólisis de la quitina. Luego, se neutralizó el hidrolizado con NaOH 10 M y NaOH 0,5 M y con ayuda de un pHmetro se mantuvo el pH en 7.

Una vez hidrolizada la muestra, se realizó una medición colorimétrica de la glucosamina por espectrofotometría de acuerdo con el método publicado por Aidoo et al. (1981). Se tomó 1 mL de muestra hidrolizada tras la neutralización o de blanco (1 mL agua) y se añadió 1 mL de acetyl acetona en tubos de vidrio y se calentaron al baño con agua hirviendo durante 20 minutos. Posteriormente, se dejaron enfriar y se añadió 6 mL de etanol junto con 1 mL de reactivo

Erlick y se incubaron los tubos en la estufa a 65°C durante 10 minutos. Por último, los tubos se dejaron enfriar y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro (ThermoScientific, Helios Zeta UV/Vis) a 530 nm. De igual manera, se realizaron blancos siguiendo el procedimiento anteriormente expuesto pero sustituyendo la muestra hidrolizada por agua destilada. Las muestras y los blancos se realizaron por triplicado. Para la cuantificación del contenido en glucosamina se realizó una recta de calibrado con un patrón de glucosamina, comprendida entre 0-0,5 mg/mL. Los resultados se expresaron primeramente como la variación relativa de biomasa en función del tiempo de fermentación. Esto último de acuerdo con la ecuación 4:

$$\Delta M_{\text{biomasa}_t}(\%) = \frac{(x_t^G \cdot m_t) - (x_0^G \cdot m_0)}{m_0} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde  $m_t$  es la masa de fermentado en g a cualquier tiempo (t) en días,  $m_0$  es la masa de muestra seca en g a tiempo 0,  $x_t^G$  es la fracción másica de glucosamina a tiempo t ( $\text{g}_{\text{glucosamina}}/\text{g}_{\text{muestra seca}}$ ) y  $x_0^G$  es la fracción másica de glucosamina a tiempo 0 ( $\text{g}_{\text{glucosamina}}/\text{g}_{\text{muestra seca}}$ ).

### 3.5.3 Almidón total

El almidón total del conjunto de muestras se determinó mediante un kit enzimático (Total Starch AA/AMG assay, Megazyme) según el método Rapid Total Starch (RST). Las soluciones incluidas en el kit fueron:  $\alpha$ -amilasa (AM), amilogucosidasa (AMG) y tampón reactivo (GOPOD), y se prepararon siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Los reactivos no suministrados y que tuvieron que prepararse fueron: disolución de hidróxido de sodio (1,7 M) y tampón acetato de sodio (100 mM, pH 5) más cloruro de calcio (5 mM).

Para esta determinación, se pesaron 100 mg de muestra molida de quinoa por duplicado en tubos de cultivo Corning. Se rotularon, por un lado, los tubos correspondientes a muestra sin enzima y, por otro lado, los tubos con enzima. Se agregaron 10 mL de tampón de acetato de sodio 100 mM pH 5 más cloruro de calcio 5 mM a cada uno de ellos y se homogeneizaron en un vortex (Heidolph Reax top) durante 5 segundos.

A los tubos correspondientes a las muestras con enzimas, se les añadió 0,1 mL de  $\alpha$ -amilasa termoestable sin diluir. A los tubos sin enzima se introdujeron 0,1 mL de tampón de acetato de sodio 100 mM pH5 más cloruro de calcio 5 mM.

Se vortearon los tubos y se introdujeron en un baño de agua hirviendo durante 2 minutos. Se homogenizaron de nuevo con el vortex y se devolvieron al baño. Este proceso se repitió a los 5 y 10 minutos. Transcurrido el tiempo se pasaron por el vortex y transfirieron a un baño de agua de 50 °C para que se atemperasen. A los tubos de muestra con enzima se les añadió 0,1 mL de AMG y se vortearon 3 segundos. A los tubos sin enzima se añadieron 0,1 mL del tampón anterior. Se incubaron todos los tubos durante 30 minutos en el baño a 50 °C. Seguidamente, se transfirieron 2 mL de los tubos con y sin enzimas de cada muestra a tubos de microcentrífuga a 13000 rpm durante 5 minutos. Se transfirió 1 mL del sobrenadante a tubos nuevos con 4 mL del tampón y se vortearon. Para las muestras con enzima se transfirieron alícuotas triplicadas de 0,1 mL en tubos nuevos y para las muestras sin enzimas solo una alícuota de 0,1 mL. Se añadieron 3 mL de reactivo GOPOD y se incubaron los tubos a 50°C durante 20 minutos. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm.

Se incluyeron dos blancos, uno al que no se le adicionó muestra y otro blanco con la muestra, pero sin presencia de enzimas para discriminar cualquier posible coloración.

De igual manera, las determinaciones se acompañaron de controles de glucosa utilizando 3 mL del tampón GOPOD junto con 0,1 mL de disolución estándar de glucosa (1.0 mg/mL). El contenido en almidón se determinó de acuerdo con la ecuación descrita en el kit enzimático comercial. Finalmente, los resultados se expresaron gráficamente como la variación relativa de almidón a lo largo del tiempo fermentativo utilizando la ecuación 5.

$$\Delta M_{\text{almidón}_t}(\%) = \frac{(x_t^A \cdot m_t) - (x_0^A \cdot m_o)}{m_o} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde  $m_t$  es la masa de muestra fermentada a tiempo  $t$  (días) en g,  $m_o$  es la masa de muestra seca a tiempo 0 en g,  $x_t^A$  es la fracción másica de almidón a tiempo  $t$  ( $g_{\text{almidón}}/g_{\text{total}}$ ) y  $x_0^A$  es la fracción másica de almidón a tiempo 0 ( $g_{\text{almidón}}/g_{\text{total}}$ ).

#### 3.5.4 Proteína total

El contenido en proteína se estimó por el método de Kjeldhal según la AOAC (2000) en grano y harina de quinoa fermentada. Los resultados se expresaron como la variación relativa de proteína en función del tiempo de fermentación, siguiendo la ecuación 6:

$$\Delta M_{\text{proteína}_t}(\%) = \frac{(x_t^P \cdot m_t) - (x_0^P \cdot m_o)}{m_o} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde  $m_t$  es la masa de muestra fermentada a tiempo  $t$  (días) en g,  $m_o$  es la masa de muestra seca a tiempo 0 en g,  $x_t^P$  es la fracción másica de proteína a tiempo  $t$  ( $g_{\text{proteína}}/g_{\text{muestra}}$ ) y  $x_0^P$  es la fracción másica de proteína a tiempo 0 ( $g_{\text{proteína}}/g_{\text{muestra}}$ ).

#### 3.5.5 Polifenoles totales

Los polifenoles totales se cuantificaron tras la fermentación y en las muestras control de grano y harina de quinoa. Para ello, se realizó una extracción de las muestras con metanol al 80% en proporción 1:20 (p/v). Las muestras fermentadas y control se homogenizaron con un molinillo, posteriormente se pesó 0,5 g de muestra y se añadió 10 mL de metanol al 80%. Se agitaron los tubos durante 2 horas a 55 rpm a 25°C (J.P. SELECTA. Rotabit). A continuación, se centrifugaron durante 10 min a 8.000 rpm y se analizó la parte metanólica en la que se encuentran los compuestos fenólicos. El contenido en polifenoles se realizó siguiendo el ensayo de Folin-Ciocalteu de acuerdo con Chang et al. (2006). Para ello, se tomaron 125  $\mu$ L de extracto metanólico, 0,5 mL de agua bidestilada y 125  $\mu$ L de reactivo Folin-Ciocalteu y se mezclaron en cubetas de 4 mL. Después de 5 minutos de espera en oscuridad, se añadieron 1,25 mL de carbonato sódico al 7% (p:v) junto con 1 mL de agua bidestilada y se dejó en reposo durante 30 minutos en oscuridad. Finalmente se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 760 nm. Para el blanco, se sustituyó el extracto metanólico con el disolvente utilizado durante la extracción (metanol 80%). Para la cuantificación de los polifenoles se empleó ácido gálico como estándar interno en la recta de calibrado. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por g de muestra a cada tiempo de fermentación.

#### 3.5.6 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se determinó en las muestras control y fermentadas de grano y harina de quinoa congeladas. Se utilizó la misma extracción que en la determinación de



polifenoles (3.5.5). La actividad antioxidante se determinó de acuerdo con Thaipong et al. (2006) mediante tres métodos que se describen a continuación:

#### **I) FRAP (Capacidad de reducción férrica del plasma)**

El ensayo del FRAP mide la reducción de un complejo incoloro compuesto por un cromógeno como en nuestro caso el TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) y el  $\text{Fe}^{3+}$  a un complejo ferroso  $\text{Fe}^{2+}$  de tonalidad azul-verde cuando hay presencia de compuestos antioxidantes en un medio ácido a una absorbancia de 593 nm. Para realizar esta determinación es necesario la formación del radical libre  $\text{Fe}^{3+}$  en disolución. Por ello, se prepararon tres disoluciones: tampón acetato 300 mM, TPTZ (2, 4, 6- tripiridyl-s-triazina) 10 mM y  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mM y se mezclaron en proporción 10:1:1 a 37 °C. La determinación se realizó directamente añadiendo 2,85 mL de la disolución de trabajo en la cubeta junto con 150  $\mu\text{L}$  del extracto metanólico procedente de la extracción o de metanol al 80% (blanco). Posteriormente, las muestras se mantuvieron en reposo y oscuridad durante 30 minutos y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 593 nm. La cuantificación de la actividad antioxidante se realizó a partir de una recta de calibrado utilizado Trolox, un análogo de la vitamina E, como patrón de la recta (0-200 mg/mL). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de Trolox por g de muestra a cada tiempo de fermentación.

#### **II) DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)**

En este método se produce la reducción del radical libre DPPH<sup>+</sup> a DPPH-H. Esta reducción se traduce en un cambio de color de morado a marrón que puede detectarse en el espectrofotómetro a una absorbancia de 515 nm.

Para esta determinación, se preparó una disolución con el reactivo DPPH y metanol al 100% a una concentración de 0,041 mg/mL. Una vez realizada, se comprobó que la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm fuera de un valor próximo a 1,1. Para realizar la determinación, directamente se introdujo 2,92 mL junto con 150  $\mu\text{L}$  de extracto metanólico o metanol al 80% (blanco) y se dejó reaccionar durante 15 minutos en oscuridad. Pasado el tiempo de espera se midió la absorbancia por espectrofotometría a una longitud de onda de 515 nm. La cuantificación de la actividad antioxidante se realizó a partir de una recta de calibrado utilizado Trolox, un análogo de la vitamina E, como patrón de la recta (0-200 mg/L). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de Trolox por g de muestra a cada tiempo de fermentación.

#### **III) ABTS (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico)**

Este ensayo mide la capacidad de reducir el radical ABTS<sup>+</sup> de los compuestos antioxidantes de la muestra. La determinación se realizó a partir de una disolución madre de ABTS 7,4 mM y persulfato potásico 2,6 mM en proporción 1:1, que estuvo en oscuridad y temperatura ambiente hasta un máximo de 16 horas. Durante este tiempo se produjo la formación del radical ABTS<sup>+</sup>. Transcurrido ese tiempo, se diluyó 1 mL de esta disolución de trabajo con 60 mL de metanol puro para así obtener absorbancia de  $1,1 \pm 0,02$  a una longitud de onda de 734 nm.

Para la realizar la medida, se añadió directamente a la cubeta 75  $\mu\text{L}$  de extracto metanólico o metanol al 80% (blanco), 75  $\mu\text{L}$  de metanol 80% (para diluir más la muestra) y 2,85 mL de la disolución ABTS y se mantuvieron en reposo y oscuridad durante 2 horas para posteriormente medir la absorbancia a 734 nm. La cuantificación de la actividad antioxidante se realizó a partir de una recta de calibrado utilizando Trolox, un análogo de la vitamina E, como patrón de la



recta (0-200 mg/L). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de Trolox por g de muestra a cada tiempo de fermentación.

### 3.5.7 Fitatos

El contenido en fitatos de las muestras fermentadas se determinó de acuerdo con Peng et al. (2010). Se prepararon 3 disoluciones: disolución de referencia de fitato (0,7 mg ácido fítico/mL), disolución férrica ( $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O} + 2\text{N HCl}$ , 0,2% p/v, hasta 1 L de agua destilada) y disolución de biperidina (biperidina + ácido tioglicólico, 1 g/mL, hasta 1 L de agua destilada). Para analizar el contenido en fitatos de las muestras fermentadas se pesaron 0,5 g en tubos Falcon y se añadió 10 mL de 0,2 M HCl. Los tubos se homogeneizaron con la ayuda de un vortex y se dejaron durante 24 horas en reposo a 4°C en nevera para la extracción de los fitatos. Al día siguiente, los tubos se volvieron a homogeneizar con el vortex y se tomaron 0,5 mL del extracto. El extracto se colocó en un tubo de ensayo con tapón de vidrio esmerilado junto con 1 mL de disolución férrica. Se cubrieron los tubos con la tapa y se llevaron a un baño de agua hirviendo durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, las muestras se dejaron enfriar en agua fría hasta alcanzar la temperatura ambiente y se añadió 2 mL de disolución de biperidina. Inmediatamente después se vortearon los tubos y se transfirió el contenido a una cubeta de plástico de 4 mL de capacidad para medir inmediatamente la absorbancia a 519 nm. No se dejó transcurrir más de 1 minuto después de añadir la disolución de biperidina puesto que la biperidina reacciona con el sulfato de amonio férrico de la disolución férrica y la coloración cambia con el tiempo. Se realizó un triplicado tanto en las muestras como en los blancos (agua), realizados siguiendo el mismo procedimiento. Para la cuantificación de los fitatos se empleó un patrón ácido fítico como estándar interno en la recta de calibrado (0-0,15 mg/mL) Los resultados se expresaron como mg de ácido fítico por g de muestra a cada tiempo de fermentación.

### 3.6 Análisis estadístico de los resultados

Para evaluar las posibles diferencias significativas entre las muestras de grano y harina, así como el impacto entre los tiempos de fermentación, se realizaron análisis de varianza unifactoriales (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ) utilizando el software Statgraphics Centurion XIX. Se realizaron correlaciones de Pearson para detectar asociaciones entre la actividad antioxidante y el contenido total de polifenoles, almidón y biomasa, y ácido fítico y acidez. Todos los análisis estadísticos se realizaron en los triplicados de cada muestra.

## 4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización de la materia prima

La composición nutricional del sustrato de partida tanto en grano como en harina (quinoa molida y tamizada a partir de los granos) en términos de proteína, lípidos, carbohidratos, humedad y cenizas se recogen en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Composición nutricional de la materia prima en grano y harina de quinoa.

	Grano	Harina
<b>Proteína</b> (g proteína/g muestra)	0,2285 ± 0,0015 <sup>a</sup>	0,285 ± 0,003 <sup>b</sup>
<b>Lípidos</b> (g lípidos/g muestra)	0,031 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,079 ± 0,003 <sup>b</sup>
<b>Carbohidratos</b> (g carbohidratos/g muestra)	0,614 ± 0,004 <sup>b</sup>	0,516 ± 0,004 <sup>a</sup>
<b>Humedad</b> (g agua/g muestra)	0,0937 ± 0,0008 <sup>b</sup>	0,0823 ± 0,0005 <sup>a</sup>
<b>Cenizas</b> (g cenizas/g muestra)	0,0326 ± 0,0001 <sup>a</sup>	0,0375 ± 0,0002 <sup>b</sup>
<b>Energía</b> (kcal/g muestra)	3,65	3,91

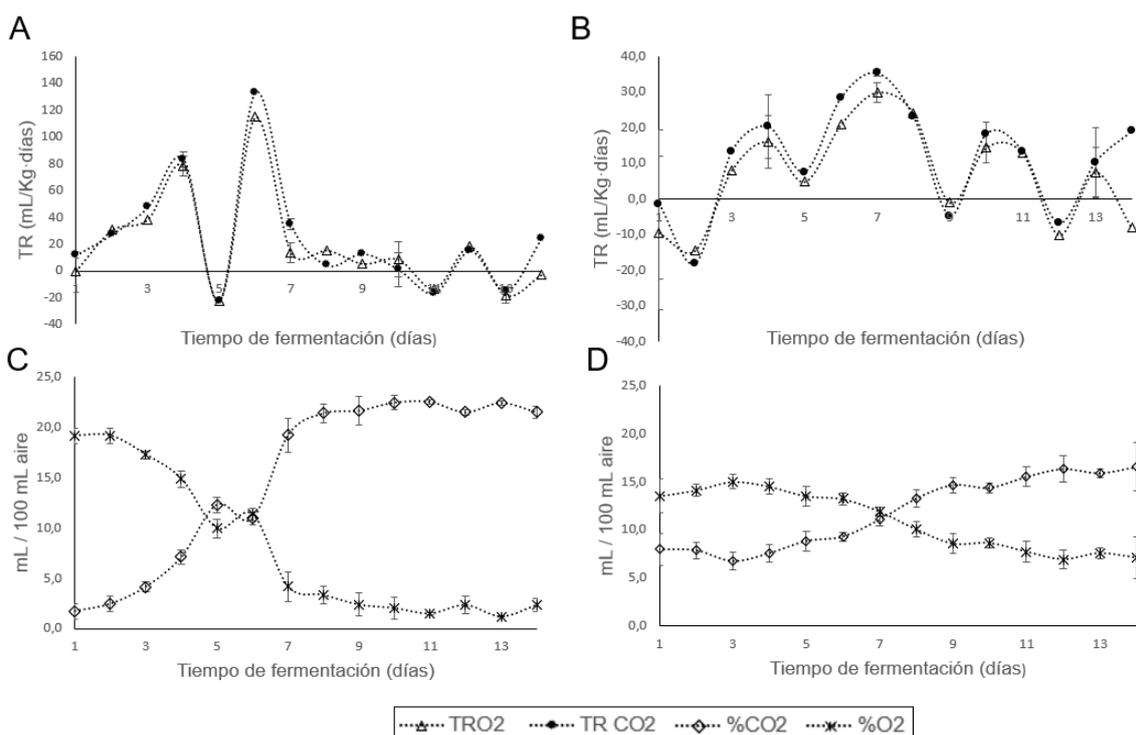
\*Los valores de la misma fila que difieren en la letra son diferentes significativamente ( $p < 0,05$ ).

Teniendo en cuenta los valores obtenidos, se aprecia cómo los carbohidratos son el macronutriente mayoritario en las muestras de quinoa seguido de proteína, lípidos y cenizas. La humedad presenta valores comprendidos entre 0,0823 y 0,0937 g/ g muestra. El contenido en carbohidratos fluctuó entre 0,5162 y 0,6139 g/g muestra, siendo el grano el que obtuvo las concentraciones medias más altas. Existen diferencias significativas en todos los parámetros nutricionales evaluados. En concreto, se observa un aumento de proteína y lípidos y un descenso de carbohidratos en el sustrato en forma de harina. La fracción de salvado de la quinoa consiste en la cubierta de la semilla y el germen o embrión. El embrión es rico en grasas y proteínas; componentes que se almacenan en los cuerpos lipídicos y proteicos (De Bock et al., 2021). Es posible que la fracción desechada durante el proceso de tamizado para la obtención de la harina de quinoa explique estas diferencias de composición entre los dos sustratos. Eso conllevaría una alteración de la composición proximal de partida y justificaría el aumento proteico y lipídico. En cuanto al descenso en carbohidratos, Wang et al. (2019) observó una alteración en la proporción de fibra soluble e insoluble en grano de quinoa pelada. La pérdida de parte de la cubierta exterior supuso una reducción de la fibra dietética insoluble e incrementó la proporción de fibra dietética soluble. Sería interesante para estudios posteriores analizar la proporción de fibra insoluble presente en cada sustrato con la finalidad de identificar mejor la procedencia del descenso de carbohidratos experimentado en este trabajo.

Asimismo, estos resultados difieren de los análisis proximales realizados por Pereira et al. (2018) y Repo-Carrasco et al. (2010) quienes encontraron menores contenidos de proteína (11,5-18,2%) y mayor contenido en carbohidratos (64-77%). Tales oscilaciones en el valor nutricional podrían ser explicadas por las diferentes variedades de quinoa e incluso también por diversos factores agronómicos como el tipo de suelo, concentración de minerales y aplicación de fertilizantes (Nowak et al., 2016).

#### 4.2 Cinética de crecimiento de *P. ostreatus*

Para el seguimiento adecuado de la evolución de la fermentación fúngica es necesario controlar y monitorear el crecimiento del hongo. Para ello, se midió la tasa respiratoria de todas las muestras diariamente siguiendo un método de análisis estático. Asimismo, se analizó la composición del aire en el espacio de cabeza de los recipientes inoculados. Estos resultados se recogen en la Figura 4.



**Figura 4.** Tasas respiratorias de consumo de O<sub>2</sub>, emisión de CO<sub>2</sub> en función del tiempo de fermentación en grano (A) y harina (B) de quinoa; mL de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> por 100 mL de aire en el espacio de cabeza de los botes inoculados en grano (C) y harina (D) de quinoa. Los datos se representan como la media y desviación estándar de 3 réplicas (n=3) por tipo de muestra.

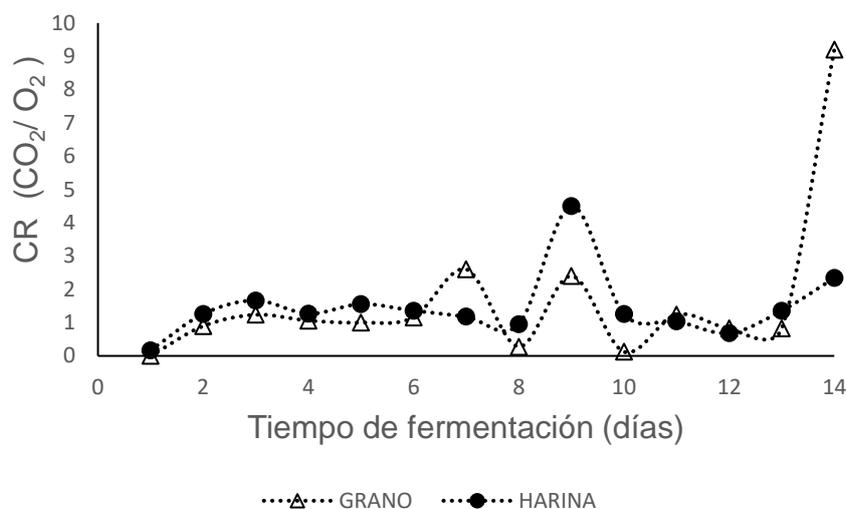
Se sabe que concentraciones superiores al 30% de CO<sub>2</sub> inhiben el correcto desarrollo de *Pleurotus ostreatus* (Suárez 2010), de ahí que se airearan los botes durante una hora cuando se detectaban en el espacio de cabeza concentraciones de CO<sub>2</sub> superiores al 15%. Tal vez como consecuencia de estos periodos de aireación las curvas correspondientes a la tasa de respiración en grano y harina de quinoa no siguen una tendencia clara. Adicionalmente, las desviaciones típicas observadas son relativamente grandes debido a la heterogeneidad de los valores de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> medidos en los triplicados de las muestras en cada tiempo de fermentación.

La tasa respiratoria de *Pleurotus ostreatus* en grano de quinoa incrementó de forma sigmoidea hasta alcanzar un máximo el día 6 y, posteriormente, descender y mantenerse en niveles bajos durante los ocho días de fermentación restantes. En harina, el máximo se alcanzó el día 7 de fermentación y, de la misma manera, fue descendiendo aunque de forma más inestable.

Los gráficos C y D de la figura 4 muestran las distintas concentraciones de  $O_2$  y  $CO_2$  en el espacio de cabeza de los botes inoculados a lo largo del proceso fermentativo. Estos gases alcanzaron valores estacionarios a partir del décimo día de fermentación. En concreto, estos valores fueron del 3% en grano y 8% en harina en oxígeno, mientras que los valores de  $CO_2$  fueron de un 22% en grano y un 17% en harina. Estos resultados coinciden con el modelo competitivo de Michaelis y Menten descrito por Torrieri et al. (2010) para describir la influencia de la composición de gases y temperatura en la tasa de respiración de brócoli procesado.

Respecto a la composición de aire en el espacio de cabeza, es esperable que la cantidad de dióxido de carbono producido en la SSF siga el mismo orden de magnitud que la cantidad de oxígeno consumido (Smits et al., 1999). El cociente respiratorio o CR (relación entre la tasa de  $CO_2$  producido y el  $O_2$  consumido) nos proporciona información acerca de la actividad metabólica del hongo, así como de la evolución de la población fúngica a lo largo del proceso fermentativo (Manan y Webb, 2021). Cuando los sustratos oxidados son carbohidratos, el valor de CR es 1. En la SSF, el sustrato sólido contiene una composición de nutrientes variable en cuanto a carbono y nitrógeno donde los hongos precisan utilizar los compuestos complejos y producir azúcares simples fermentables antes de que éstos sean consumidos. Por tanto, en términos prácticos es imposible obtener un CR igual a 1 sino que los valores obtenidos serán mayores o menores a la unidad. Cuando  $CR < 1$ , se asume que uno o más metabolitos no constitutivos están siendo producidos durante la fermentación fúngica. Entre ellos estarían el  $CO_2$ , agua, metabolitos secundarios o energía (ATP). Cuando  $CR > 1$ , indica un bajo aporte de  $O_2$  y un suceso de fermentación de la glucosa. Por tanto, valores de  $CR > 1$  se asocian a condiciones de respiración anaerobias mientras que  $CR < 1$  se asocia con procesos de aerobiosis. Sin embargo, procesos de aerobiosis podrían abarcar valores de CR de hasta 1,5.

Teniendo esto en consideración, los resultados de la figura 5 indicarían un predominio de la respiración aerobia durante la mayor parte del transcurso de la fermentación ya que los valores de CR no superan el 1,5. Sin embargo, en el noveno día se reflejarían condiciones de fermentación anaerobia en ambos sustratos, registrando valores de 2,2 en grano y 4,5 en harina, así como en los últimos días de fermentación. Asimismo, en la figura 4 se puede observar cómo los niveles de oxígeno más bajos y de dióxido de carbono altos alcanzados el día 6-7 en ambos tipos de sustrato provocan una reducción de la tasa de respiración en los sucesivos días de fermentación.



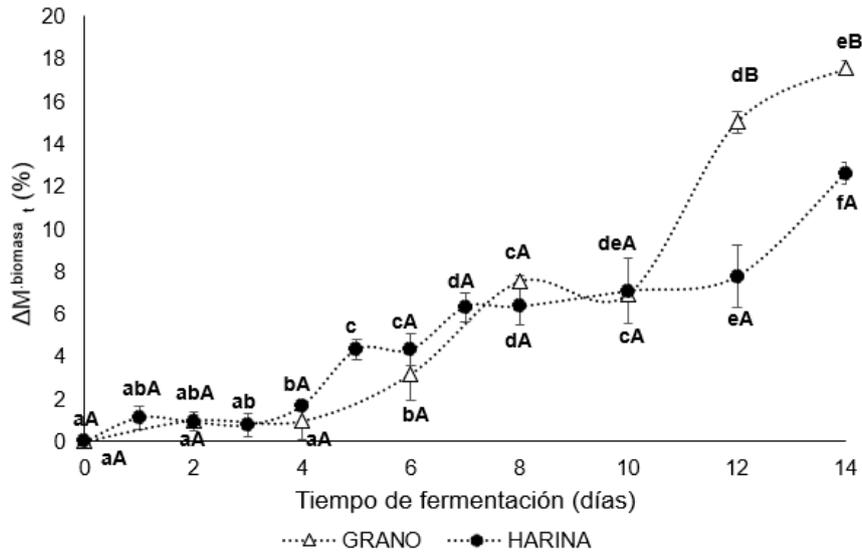
**Figura 5.** Coeficiente de respiración (CR) en grano y harina de quinoa durante el proceso fermentativo.

Otro parámetro para medir la correcta evolución del proceso fermentativo es la cuantificación de la biomasa. La biomasa fúngica es difícil de evaluar ya que las células fúngicas no se separan fácilmente de la matriz sólida. La medición de la glucosamina (monómero de la quitina y constituyente mayoritario de la pared celular en hongos) es un indicador bien adaptado a la estimación del desarrollo fúngico (Scotti et al., 2001).

El crecimiento de *Pleurotus ostreatus* se determinó midiendo la cantidad de N-acetil-D-glucosamina en las muestras de grano y harina de quinoa. La Figura 6 muestra la variación relativa de biomasa a lo largo del proceso de fermentación. El tramo inicial de la curva comprendida entre el día 0 y 4, podría semejarse a la fase de latencia del hongo. A partir del cuarto día de fermentación empieza a producirse un aumento más exponencial en el crecimiento del micelio en los dos tipos de sustrato, sin llegar a una fase estacionaria.

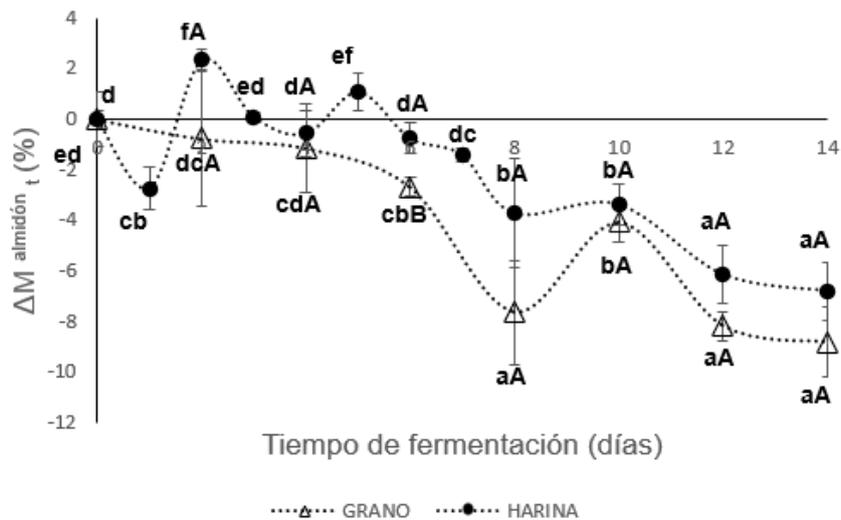
Existen diferencias significativas entre sustratos en los días 12 y 14; se aprecia un incremento mayor de biomasa en la fermentación en grano (17,6%) que en la fermentación en harina (12,6%) por lo que tanto la granulometría del sustrato como su composición afectan al crecimiento del hongo.

Los hongos de pobredumbre blanca (White-rot fungi) como *Pleurotus ostreatus*, presentan 2 tipos de sistemas enzimáticos extracelulares: un sistema hidrolítico que produce hidrolasas responsables de la degradación de polisacáridos; y un sistema lignolítico extracelular y oxidativo que degrada lignina (Ergun y Urek, 2017). Entre las enzimas hidrolíticas se encuentran las amilasas y xilanasas y entre las enzimas lignocelulósicas destacan las lacasas, manganeso peroxidasas, lignina peroxidasas y aril-alcohol oxidasas. En estudios comparativos de SSF entre *P. chrysosporium* y *P. ostreatus*, este último presentó mayor degradación de la lignocelulosa, mayores tasas de respiración y, por consiguiente, un mayor crecimiento de biomasa micelial (Kerem et al., 1992). Adicionalmente, Ergun y Urek (2017) observaron una mayor actividad de la lacasa por *P. ostreatus* en el sustrato con mayor cantidad de lignina. Teniendo en cuenta la alteración en la composición proximal en harina y, posiblemente, un contenido inferior en fibra insoluble, el hongo habría tenido menor material lignocelulósico en este sustrato con respecto al grano de quinoa.



**Figura 6.** Evolución de la biomasa presente en el medio durante el transcurso de la fermentación. Los distintos valores en letras minúsculas (a-f) indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre los distintos tiempos de fermentación. Letras mayúsculas distintas indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre grano y harina de quinoa al mismo tiempo de fermentación. Los datos se representan como la media y desviación estándar de 3 réplicas ( $n=3$ ) por tipo de muestra.

Otro parámetro que nos permite evaluar la acción hidrolítica del hongo y su impacto en la digestibilidad de los carbohidratos es la cuantificación del almidón en ambos sustratos. En la figura 7 se observa una disminución de almidón del 8,82% en grano y del 6,79% en harina que reflejarían la actividad enzimática de *Pleurotus ostreatus*.



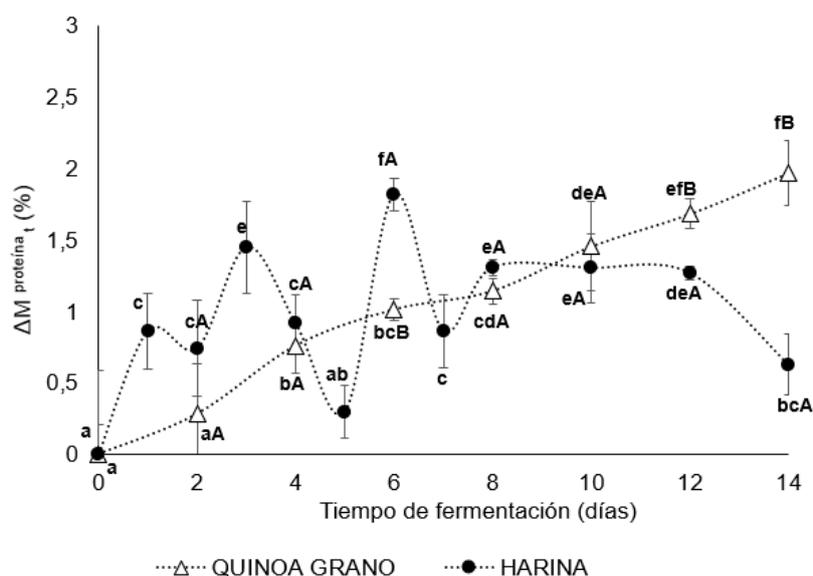
**Figura 7.** Evolución de la variación neta de almidón durante el transcurso de la fermentación. Los distintos valores en letras minúsculas (a-f) indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre los distintos tiempos de fermentación. Letras mayúsculas distintas indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre grano y harina de quinoa al mismo tiempo de fermentación. Los datos se representan como la media y desviación estándar de 3 réplicas ( $n=3$ ) por tipo de muestra.

Brijwani y Vadlani, (2011) reportan que el crecimiento y propagación del micelio de hongos sobre sustratos complejos ocurre mediante la producción de enzimas que desencadenan reacciones hidrolíticas. Estas reacciones hidrolíticas serían responsables de la generación de azúcares solubles que facilitan el crecimiento del hongo. Por ello, proponen que la hidrólisis es eficiente cuando los poros del sustrato son lo suficientemente grandes para acomodar los componentes enzimáticos, grandes y pequeños, para así mantener la acción sinérgica del sistema enzimático. Xu et al. (2018) realizaron un estudio comparativo con 3 hongos filamentosos y su impacto en las propiedades nutricionales de la quinoa observando una reducción del almidón y un aumento de los azúcares reductores. Se sugirió que estos hongos comestibles poseen la capacidad de producir  $\alpha$ -amilasa durante la fermentación en sólido en quinoa, siendo muy probable la hidrólisis del almidón en azúcares simples. Estudios de Rahardjo et al. (2005) muestran cómo sustratos con una estructura más porosa presentarían una mejor producción de enzima  $\alpha$ -amilasa en comparación a sustratos menos porosos. Adicionalmente, experimentos de Kang et al. (2017) y Zhai et al. (2015) sugieren que el inóculo empleado y los granos fermentados serían responsables de la mejora de las propiedades nutricionales del producto fermentado final y esto a la vez depende del mecanismo metabólico del hongo y de la estructura de almidón del cereal empleado. En base a lo anteriormente expuesto y teniendo en cuenta los resultados observados en este estudio, es posible que la estructura más compacta del sustrato haya comprometido la actividad enzimática del hongo.

Adicionalmente, sería interesante estudiar cómo el pretratamiento de esterilización ha podido llegar a influir en la estructura del sustrato y la acción del hongo sobre ella. Repo-Carrasco-Valencia et al. (2010) sugieren que la gelatinización del almidón después del tratamiento térmico de esterilización puede influir en la digestibilidad *in vitro*, ya que los gránulos de almidón de quinoa se encuentran rodeados de una matriz proteica y no son fácilmente hidrolizados por la  $\alpha$ -amilasa.

Por otro lado, Scotti (2001) observó contenidos mayores de glucosamina en medios ricos en glucosa, sacarosa y glicerol, frente a medios ricos en xilosa, maltosa y almidón. Los granos de quinoa presentaron una mayor degradación del almidón a partir del cuarto día de fermentación. Posiblemente, la liberación de  $\alpha$ -amilasa y amiloglicosidasa durante la fermentación fúngica resultaron en la hidrólisis del almidón en azúcares fermentables, los cuales favorecieron el contenido en glucosamina y, por consiguiente, el mayor crecimiento del hongo en grano. Para corroborar esta hipótesis, se realizaron correlaciones de Pearson para estudiar la asociación entre la reducción de almidón y el porcentaje de biomasa, resultando en un valor de -0,9372 en grano de quinoa y de -0,7994 en harina, lo que indica una correlación lineal fuerte y negativa, especialmente en grano.

La fermentación fúngica de quinoa está dirigida, entre otros aspectos, al enriquecimiento del sustrato en proteína. En la figura 8, se observa cómo los granos de quinoa fermentados con *Pleurotus ostreatus* experimentaron un incremento proteico del 1,96%. Sin embargo, en harina de quinoa no vemos una tendencia clara presentando una gran variabilidad a lo largo del tiempo fermentativo, ya que los días 3 y 6 presentan contenidos proteicos más elevados (1,45 y 1,82%, respectivamente) pero terminan decayendo el día 14. Esta heterogeneidad en el contenido proteico en harina según el día de fermentación se acompaña con unos valores de tasa respiratoria muy dispares que reflejarían un escaso control del proceso fermentativo.



**Figura 8.** Evolución del incremento neto de proteína durante el transcurso de la fermentación. Los distintos valores en letras minúsculas (a-f) indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre los distintos tiempos de fermentación. Letras mayúsculas distintas indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre grano y harina de quinoa al mismo tiempo de fermentación. Los datos se representan como la media y desviación estándar de 3 réplicas ( $n=3$ ) por tipo de muestra.

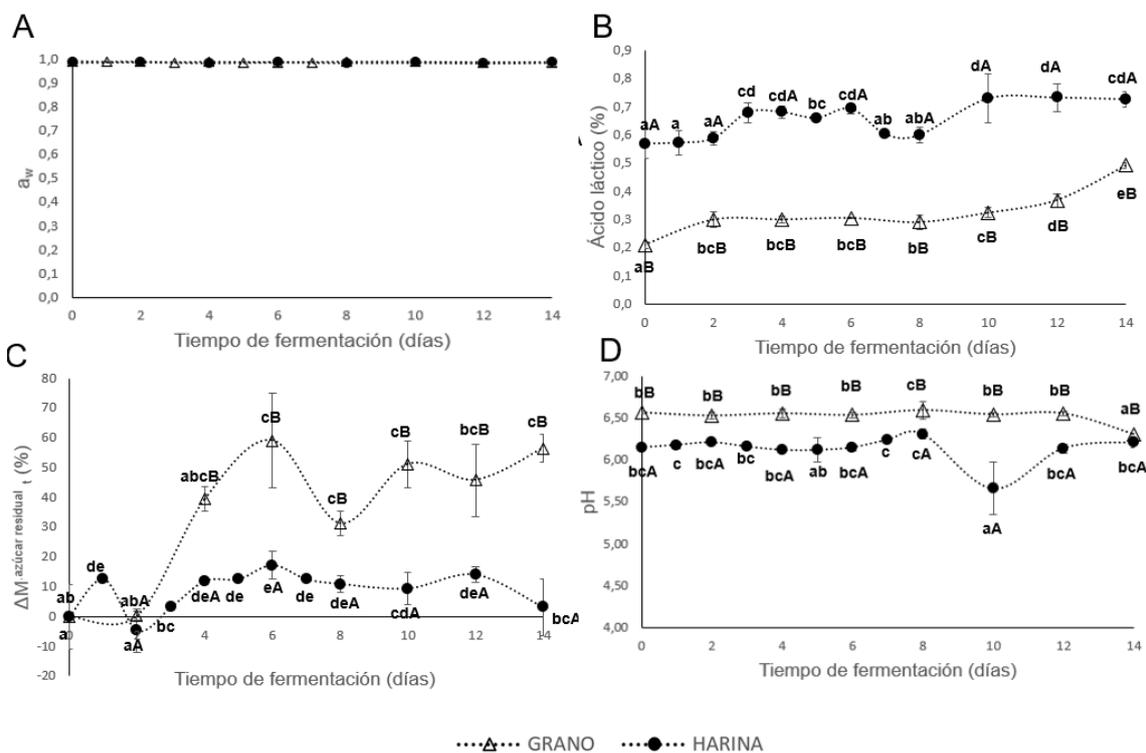
El incremento neto de proteína tanto en grano y harina de quinoa obtenidos en el presente trabajo fueron más bajos que aquellos registrados en literatura utilizando otros tipos de sustratos. Estudios anteriores de fermentaciones con *Pleurotus ostreatus* en frijoles y avena resultaron en un incremento del 13% y 6%, respectivamente, debido a la capacidad de este hongo de sintetizar aminoácidos durante la fermentación (Espinosa-Páez et al., 2017). Igualmente, se mostró un aumento en el contenido proteico de lentejas fermentadas con este mismo hongo del 18% (Asensio-Grau et al., 2020).

Así mismo, Gujjral et al. (1987) y Chang et al. (1981) señalan contenidos de proteína de la especie *Pleurotus* del 26-36% cultivada sobre distintos tipos de sustrato. Por tanto, la presencia de cantidades crecientes de micelio durante el proceso fermentativo participaría en este incremento proteico total. Según Asensio-Grau et al., (2020), el incremento en el contenido proteico también se podría atribuir a la bioconversión de algunos carbohidratos a proteína, así como la producción de enzimas extracelulares de *P. ostreatus* durante su crecimiento en el proceso fermentativo.

Aunque los contenidos en proteína total han sido cuantificados, el impacto que ha podido tener la fermentación en el balance aminoacídico no estaría definido. Según Mora-Uzeta et al. (2020), la fermentación de harina de frijol mediante *Phaseolus acutifolius* mejoró el contenido de aminoácidos esenciales y sugirió que el hongo no depende de ningún aminoácido concreto para crecer sino que la composición del sustrato intervendría en la composición aminoacídica final. SSF con *Rhizopus oligosporus* en quinoa favoreció un aumento de proteína total y un aumento de la calidad proteica puesto que todos los aminoácidos esenciales excedieron los niveles recomendados por la FAO (Starzynska-Janiszewska et al., 2016). Por tanto, la fermentación fúngica sobre quinoa en este trabajo ha favorecido un ligero aumento proteico y posiblemente haya contribuido a una mejora del balance aminoacídico.

### 4.3 Evolución de las propiedades fisicoquímicas del sustrato a lo largo del proceso de fermentación

Los parámetros fisicoquímicos fueron evaluados tanto en las muestras control de grano y harina de quinoa como en los sucesivos días de fermentación, tal y como refleja la figura 9.



**Figura 9.** Evolución del pH (A), acidez titulable (B), contenido en sólidos solubles (C) y actividad del agua (D) durante la fermentación fúngica en grano y harina de quinoa. Los distintos valores en letras minúsculas (a-f) indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre los distintos tiempos de fermentación. Letras mayúsculas distintas indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre grano y harina de quinoa al mismo tiempo de fermentación. Los datos se representan como la media y desviación estándar de 3 réplicas ( $n=3$ ) por tipo de muestra.

El parámetro de  $a_w$  (actividad del agua) se mantuvo constante y en valores cercanos a 0,99, de forma que la disponibilidad del agua libre fue siempre adecuada para el desarrollo del micelio. La relevancia de mantener una elevada disponibilidad de agua en el medio de cara a asegurar un óptimo crecimiento del inóculo ha sido evidenciada en estudios previos. Asimismo, este parámetro resulta crítico para la conversión del sustrato en ciertos metabolitos de interés. (Oriol et al., 1988; Pandey et al., 1994; Grajek y Gervais, 1987).

El pH inicial fue de 6,57 en grano y de 6,15 en harina de quinoa y presentó valores finales de 6,31 y 6,14, respectivamente. La fermentación fúngica en grano experimentó un descenso significativo en el pH en el día 14. Sin embargo, el progreso del proceso fermentativo no dio lugar a una variación significativa del valor de pH en ninguno de los sustratos estudiados. Chutmanop et al. (2018) afirma que los valores de pH constantes que obtuvo en la mayor parte de la fermentación con *Aspergillus oryzae* sobre sustratos agroindustriales se deben a que la mayoría de sustratos utilizados en SSF poseen excelente capacidad amortiguadora.

Sí se pudo constatar un ligero incremento de la acidez titulable, de 0,21 a 0,49% en grano, y de 0,57 a 0,73% en harina a lo largo de la fermentación. Este incremento podría ser consecuencia de una conversión de los carbohidratos complejos (almidón y fibra) en azúcares fermentables.



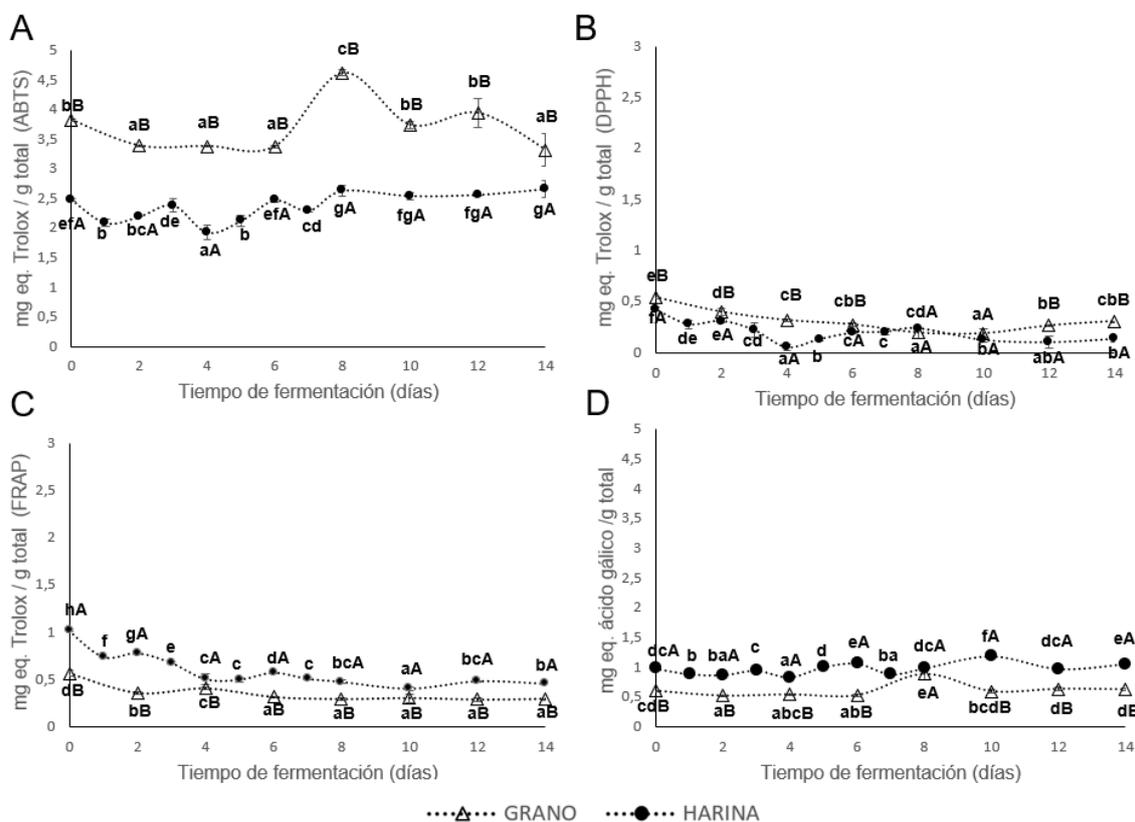
y, por consiguiente, en una producción posterior de ácidos orgánicos como el ácido láctico, ácido cítrico o acético (Rani et al., 2018). Autores como Rani et al. (2018) y Kaw y Mabesa, (1987) apuntan a que la reducción del pH, así como un incremento de la acidez titulable serían claros indicadores del progreso del proceso fermentativo.

Durante los 14 días de fermentación, el contenido de azúcares residuales experimentó un ligero incremento en harina de quinoa y un aumento del 56,5% en grano de quinoa, habiendo diferencias significativas según el tipo de sustrato. Estos hallazgos sugieren que *Pleurotus ostreatus* es capaz de descomponer los sólidos solubles de forma eficiente según el estado de la matriz alimentaria. Al final del proceso fermentativo, los dos tipos de muestra presentan a valores cercanos a 1 °Brix. En harina, el trascurso del tiempo tuvo un efecto mínimo en el aumento de los sólidos solubles. Sin embargo, en grano se partieron de valores cercanos a 0,6 °Brix que sugieren una menor accesibilidad enzima-sustrato debido a la morfología del grano entero y que, a lo largo del trascurso de la fermentación, iría produciéndose la conversión de los carbohidratos a azúcares residuales hasta alcanzar valores de 1 °Brix. Estos resultados difieren de la literatura previa, donde autores como Rani et al., (2018) reportan un descenso en azúcares residuales debido al consumo de la fracción de carbohidratos y la subsecuente conversión a alcoholes y ácidos orgánicos.

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

Uno de los objetivos perseguidos en las fermentaciones de cereales y legumbres es la producción de sustancias que incrementen la capacidad antioxidante del producto final y puedan proteger frente al estrés oxidativo. Se ha reportado que las fermentaciones fúngicas mejorarían los compuestos polifenólicos totales, así como las propiedades antioxidantes de los extractos de cereales (Zhai et al., 2015; Dulf et al., 2016; Kang et al., 2017).

En este trabajo se ha evaluado el contenido fenólico total y las propiedades antioxidantes durante el trascurso de la fermentación en estado sólido de *Pleurotus ostreatus*. Se utilizaron tres métodos analíticos (FRAP, DPPH y ABTS) para el estudio de las propiedades antioxidantes cuyos resultados se muestran en la figura 10.



**Figura 10.** Efecto de la fermentación fúngica en la actividad antioxidante evaluada mediante los métodos ABTS (A), DPPH (B) y FRAP (C) y el contenido en polifenoles (D) en grano y harina de quinoa. Los distintos valores en letras minúsculas (a-h) indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre los distintos tiempos de fermentación. Letras mayúsculas distintas indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre grano y harina de quinoa en los tiempos de fermentación pares. Los datos se representan como la media y desviación estándar de 3 réplicas ( $n=3$ ) por tipo de muestra.

Los distintos valores en antioxidantes según el día de fermentación pueden indicar que los compuestos antioxidantes son sometidos a distintas modificaciones durante la fermentación que pueden no solo depender del microorganismo involucrado, sino también de la composición del sustrato (Limón et al., 2015).

Las muestras fermentadas de harina y grano de quinoa presentaron un ligero aumento de la actividad antioxidante medida por ABTS. Sin embargo, en el resto de los métodos hubo un ligero descenso generalizado de ésta ya que, respecto a los controles iniciales, las propiedades antioxidantes de grano y harina de quinoa fermentada disminuyeron. Estos resultados difieren de los encontrados en literatura (Thaipong et al., 2006; Hye-Young, 2018; Espinosa-Páez et al., 2017) los cuales reportan aumentos significativos en las propiedades antioxidantes y contenido total de polifenoles durante el proceso de fermentación en estado sólido.

Los compuestos fenólicos presentan fuertes propiedades antioxidantes y juegan un papel importante en el mantenimiento de la salud humana (Ullah et al., 2016). La cantidad total de polifenoles a lo largo del periodo de fermentativo con *P. ostreatus* en grano y harina de quinoa se refleja en la figura 6 (D). En este caso, se aprecia una ligera tendencia en el incremento de polifenoles a medida que avanza el tiempo de fermentación. Espinosa-Páez (2017) reportó un aumento del contenido total de polifenoles en un proceso de fermentación fúngica en legumbres con *P.ostreatus* y atribuye los resultados a la secreción de fenol oxidasas como las

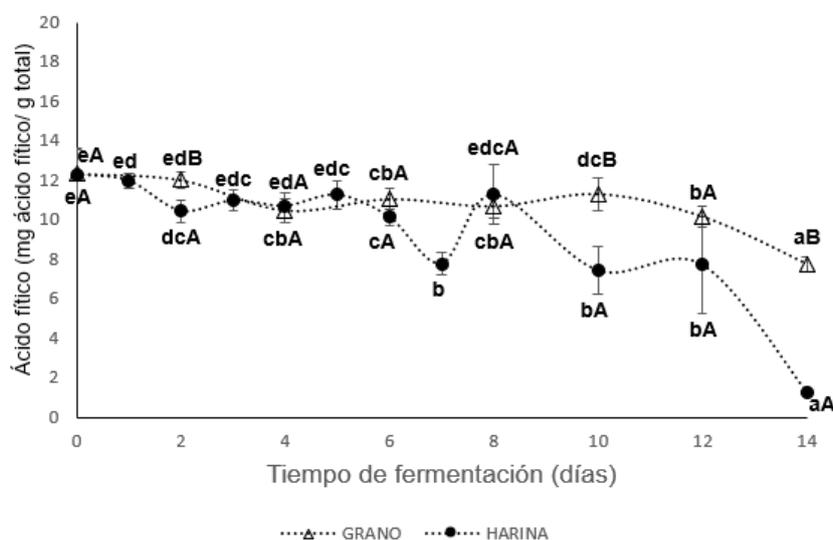
lacasas, las cuales podrían despolimerizar los compuestos fenólicos conjugados del sustrato empleado. Según I-Hsin Lee, (2007) los fenoles se encuentran de forma conjugada en grupos hidroxilo con azúcar y glucósidos. La catálisis y liberación de los fenoles totales y antocianinas en frijoles negros durante la fermentación con hongos filamentosos conllevarían al incremento observado en los compuestos fenólicos totales y se acompañaría de una mayor actividad antioxidante. En el presente trabajo, el aumento de polifenoles no ha sido muy sustancial lo que podría estar relacionado con la baja actividad antioxidante detectada.

Ham et al. (2015) sugieren que el contenido total en polifenoles está asociado de manera moderada a alta con las propiedades antioxidantes. Las correlaciones de Pearson mostraron una asociación fuerte entre ABTS y el contenido de polifenoles en grano y harina con valores de 0,9049 y 0,6853, respectivamente. Sin embargo, DPPH y FRAP no muestran asociaciones fuertes con los polifenoles. Por tanto, el método ABTS sería más óptimo para estudiar la actividad antioxidante en quinoa fermentada. Fermentaciones de granos de cacao con distintas cepas de levadura mostraron un descenso generalizado de la actividad de captación de radicales libres de DPPH sugiriendo que, en la fermentación de cacao, las reacciones de hidrólisis enzimática provocan que los polifenoles contenidos en los granos sean propensos a la polimerización y formación de complejos con las proteínas, lo que a su vez disminuye la solubilidad de los polifenoles y su actividad antioxidante (Ooi et al., 2020). Asimismo, Kerem et al. (1992) señala que la degradación oxidativa de la lignina por medio de la lacasa puede conducir a una polimerización de los compuestos fenólicos resultantes. Por tanto, en vista a los resultados obtenidos, es posible que la acción enzimática fruto de esta fermentación fúngica haya conducido a una ligera reducción de los compuestos antioxidantes y cierta polimerización de los compuestos fenólicos que no habría dado lugar a ningún incremento final de éstos.

Por otro lado, las muestras fermentadas sufrieron un tratamiento térmico anterior a la inoculación del starter fúngico. Hye-Young (2018) reportó un descenso de polifenoles tras el pretratamiento térmico causado por la descomposición sustancial de residuos fenólicos. Sin embargo, tras la fermentación fúngica el contenido en compuestos fenólicos se incrementó por la liberación enzimática de compuestos fenólicos provenientes de las matrices insolubles. Sería interesante en estudios futuros tener en consideración cómo ha podido llegar a influir el pretratamiento térmico de las muestras en el contenido de polifenoles y antioxidantes.

Por tanto, este trabajo revelaría que la serie de procesos metabólicos producidos durante la fermentación han tenido un mínimo impacto en el contenido final de compuestos fenólicos seguramente debido a la acción enzimática del hongo y la mayor extractabilidad de los compuestos fenólicos libres en las muestras de quinoa.

Al igual que los cereales, los pseudocereales contienen compuestos que inhiben la absorción de minerales como el fitato (hexakisfosfato de mioinositol, IP6) el cual es el principal compuesto de almacenamiento de fósforo en granos maduros. Aproximadamente, las semillas contienen entre 1-2% de ácido fítico, aunque puede llegar a ser incluso del 3-6% (Febles et al., 2002). Los granos de cereales presentan un contenido en ácido fítico que variaría del 0,5 al 2% (Hidvegi y Lasztity, 2002). El ácido fítico no puede ser digerido por los animales monogástricos y termina siendo excretado. En humanos, dietas altas en ácido fítico pueden reducir significativamente la absorción de micronutrientes esenciales como el hierro y calcio (Hurrell et al., 2003), zinc (Guttieri et al., 2006) y magnesio (Bohn et al., 2004). Adicionalmente, se puede unir a proteínas o enzimas digestivas (proteasas y amilasas) resultando en una menor solubilidad proteica e inhibición proteolítica (Parea et al., 2018).



**Figura 11.** Efecto de la fermentación fúngica en el contenido de fitatos en grano y harina de quinoa. Los distintos valores en letras minúsculas (a-e) indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre los distintos tiempos de fermentación. Letras mayúsculas distintas indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre grano y harina de quinoa en los tiempos de fermentación pares. Los datos se representan como la media y desviación estándar de 3 réplicas ( $n=3$ ) por tipo de muestra.

La figura 11 muestra cómo la fermentación fúngica ha influido en una ligera degradación del fitato tanto en grano como en harina de quinoa. Este descenso fue de un 37% en grano de quinoa y de un 89% en harina. Los cambios empiezan a ser bastante significativos ( $p < 0,05$ ) a partir del décimo día de fermentación, y dependiente del tipo de muestra puesto que la degradación del fitato después de la fermentación fue mayor en harinas fermentadas que en granos. Vogelmann et al. (2009) sugieren que las saponinas presentes en quinoa podrían tener un efecto inhibitorio en la acción del microorganismo y, por tanto, necesitaría más tiempo para adaptarse al nuevo ambiente.

Estos resultados coinciden con Castro-Alba et al. (2019) quienes reportaron cambios en la degradación del fitato en quinoa, canihua y amaranto según la granulometría (grano o harina). Además, sugieren que la degradación mayor de fitato en harina puede depender de la activación de la fitasa endógena y de la producción de fitasa exógena del starter. Para discernir la procedencia de las fitasas analizaron la cinética de la degradación de fitato con el incremento de la acidez total, expresada como contenido de ácido láctico, y concluyeron que, asumiendo que la tasa de producción de ácido láctico es un buen indicador de la actividad fermentativa, en la degradación del fitato participaría en mayor medida la fitasa endógena que la fitasa producida por el microorganismo añadido. Las correlaciones de Pearson aplicada a los resultados del presente trabajo entre el descenso de ácido fítico y el incremento de acidez total mostraron asociaciones fuertes en ambos tipos de sustrato con valores de -0,92 y -0,61, en grano y harina respectivamente.

Sin embargo, en este trabajo las muestras control analizadas al final del estudio (muestras sin inocular de 14 días) presentaban ligeras degradaciones de fitato equiparables a 6-8 días de fermentación fúngica. Brehnholt et al. (2011) reportaron una reducción del 93% en la actividad de la fitasa endógena tras un tratamiento de calor ( $95^{\circ}\text{C}$ , 10 min). Las muestras experimentaron un pretratamiento térmico durante su autoclavado, por tanto, el descenso



notable de fitato en los últimos días de fermentación podría ser debido a la actividad de la fitasa del microorganismo añadido más que de la fitasa endógena.

## 5. CONCLUSIONES

1. El análisis proximal de los sustratos de partida, grano y harina de quinoa, evidencia diferencias significativas en cuanto a la composición, las cuales podrían haber influido en la acción posterior del hongo. La harina presentaba mayores niveles de proteína y lípidos y menor cantidad de carbohidratos.
2. El seguimiento de la Tasa de Respiración, la evolución en la composición de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> en el espacio de cabeza y el Coeficiente de Respiración resultaron ser parámetros adecuados para el control del correcto avance de la fermentación y permite garantizar que *Pleurotus ostreatus* creció en unas condiciones óptimas.
3. La variación neta del contenido en glucosamina a lo largo de la fermentación permitió estimar el crecimiento fúngico en términos de variación neta de biomasa. La evolución en el contenido en biomasa en el medio de fermentación se vio afectada por el tipo de sustrato, alcanzándose valores superiores en el grano que en la harina.
4. El descenso en el contenido en almidón durante el proceso fermentativo deja entrever la acción sinérgica de las enzimas liberadas por *Pleurotus* en el sustrato, probablemente por su consumo como fuente de carbono. Se observó una fuerte correlación entre el descenso de almidón y el incremento en el contenido en biomasa en grano y harina de quinoa.
5. La fermentación de la quinoa en grano con *Pleurotus ostreatus* provocó un ligero aumento en el contenido proteico a lo largo de la fermentación; sin embargo, los resultados observados en la fermentación de la harina fueron más dispares.
6. La  $a_w$ , acidez, contenido en sólidos solubles y pH como parámetros fisicoquímicos empleados para monitorizar la fermentación fúngica mostraron un aumento en la acidez y sólidos solubles en los días 10, 12 y 14 como consecuencia de la conversión de carbohidratos complejos en azúcares fermentables.
7. La actividad antioxidante determinada por los métodos FRAP y DPPH disminuyó de forma generalizada durante la fermentación, mientras que la actividad antioxidante medida por el método ABTS junto con la concentración de polifenoles se mantuvieron constantes.
8. La fermentación fúngica en quinoa redujo significativamente el contenido en fitatos (antinutriente), especialmente en la harina, lo que sugiere una mejora considerable en la bioaccesibilidad de nutrientes y digestibilidad del producto final.

En líneas generales, se puede concluir que el tiempo óptimo de fermentación depende del tipo de sustrato de partida, concretamente, el grano de quinoa favoreció la acción del hongo y su mayor impacto a lo largo del proceso fermentativo en los días 12 y 14, experimentando mayores porcentajes de proteína y descensos notables en almidón y fitatos de forma progresiva. Por el contrario, la harina de quinoa pudo haber comprometido el potencial del hongo y su acción hidrolítica sobre este sustrato. Aun así, se obtuvieron resultados significativos en todas las determinaciones, si bien no se observó una tendencia clara, y en algunos casos, los tiempos de fermentación más largos (días 12 y 14) causaron un impacto negativo en las propiedades del producto final. Así pues, la fermentación en el grano de quinoa sería la más indicada para la obtención de un producto con un mayor contenido en proteína y menos antinutrientes. No obstante, previamente a la elección entre ambos sustratos sería necesario estudiar el efecto de la estabilización (secado) de los productos fermentados. Análogamente, sería interesante realizar estudios de digestión in vitro con el fin de conocer el impacto de la fermentación en la digestibilidad de los macronutrientes y bioaccesibilidad de compuestos bioactivos de ambos sustratos, con perspectivas a una futura aplicación industrial.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

AIDOO, K. E., HENDRY, R., & WOOD, B. J. B. (1981). Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 12(1), 6-9.

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.

BABU, K. R., & SATYANARAYANA, T. (1995).  $\alpha$ -Amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 30(4), 305-309.

BOHN, T., DAVIDSSON, L., WALCZYK, T., & HURRELL, R. F. (2004). Phytic acid added to white-wheat bread inhibits fractional apparent magnesium absorption in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 79(3), 418-423.

BREJNHOLT, S. M., DIONISIO, G., GLITSOE, V., SKOV, L. K., & BRINCH-PEDERSEN, H. (2011). The degradation of phytate by microbial and wheat phytases is dependent on the phytate matrix and the phytase origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(8), 1398-1405.

BRIJWANI, K., & VADLANI, P. V. (2011). Cellulolytic enzymes production via solid-state fermentation: effect of pretreatment methods on physicochemical characteristics of substrate. *Enzyme research*, 2011.

CASTRO-ALBA, V., LAZARTE, C. E., PEREZ-REA, D., CARLSSON, N. G., ALMGREN, A., BERGENSTÅHL, B., & GRANFELDT, Y. (2019). Fermentation of pseudocereals quinoa, canihua, and amaranth to improve mineral accessibility through degradation of phytate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(11), 5239-5248.

CHANG, S. T., LAU, O. W., & CHO, K. Y. (1981). The cultivation and nutritional value of *Pleurotus sajor-caju*. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 12(1), 58-62.

CHANG, C. H., LIN, H. Y., CHANG, C. Y., & LIU, Y. C. (2004). Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *Journal of Food Engineering*, 77(3), 478-485.

CHEN, M., SUN, Q., GIOVANNUCCI, E., MOZAFFARIAN, D., MANSON, J. E., WILLETT, W. C., & HU, F. B. (2014). Dairy consumption and risk of type 2 diabetes: 3 cohorts of US adults and an updated meta-analysis. *BMC medicine*, 12(1), 1-14.

CHILTON, S. N., BURTON, J. P., & REID, G. (2015). Inclusion of fermented foods in food guides around the world. *Nutrients*, 7(1), 390-404.

CHUTMANOP, J., CHUICHULCHERM, S., CHISTI, Y., & SRINOPHAKUN, P. (2008). Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 83(7), 1012-1018.

DALLAGNOL, A. M., PESCUA, M., DE VALDEZ, G. F., & ROLLÁN, G. (2013). Fermentation of quinoa and wheat slurries by *Lactobacillus plantarum* CRL 778: proteolytic activity. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(7), 3129-3140.

DE BOCK, P., VAN BOCKSTAELE, F., RAES, K., VERMEIR, P., VAN DER MEEREN, P., & EECKHOUT, M. (2021). Impact of tempering process on yield and composition of quinoa flour. *LWT*, 140, 110808.



DULF, F. V., VODNAR, D. C., & SOCACIU, C. (2016). Effects of solid-state fermentation with two filamentous fungi on the total phenolic contents, flavonoids, antioxidant activities and lipid fractions of plum fruit (*Prunus domestica* L.) by-products. *Food chemistry*, 209, 27-36.

DULIŃSKI, R., STODOLAK, B., BYCZYŃSKI, Ł., POREDA, A., STARZYŃSKA-JANISZEWSKA, A., & ŻYŁA, K. (2017). Solid-state fermentation reduces phytic acid level, improves the profile of myo-inositol phosphates and enhances the availability of selected minerals in flaxseed oil cake. *Food technology and biotechnology*, 55(3), 413-419.

EBNER, S., SMUG, L. N., KNEIFEL, W., SALMINEN, S. J., & SANDERS, M. E. (2014). Probiotics in dietary guidelines and clinical recommendations outside the European Union. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(43), 16095.

ERGUN, S. O., & UREK, R. O. (2017). Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. *Annals of Agrarian Science*, 15(2), 273-277.

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

EUSSEN, S. J., VAN DONGEN, M. C., WIJCKMANS, N., DEN BIGGELAAR, L., ELFERINK, S. J. O., SINGH-POVEL, C. M., ... & DAGNELIE, P. C. (2016). Consumption of dairy foods in relation to impaired glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus: the Maastricht Study. *British Journal of Nutrition*, 115(8), 1453-1461.

FAO. (2017). *The future of food and agriculture—Trends and challenges* (Rome: Food and Agriculture Organisation).

FASOLIN, L. H., PEREIRA, R. N., PINHEIRO, A. C., MARTINS, J. T., ANDRADE, C. C. P., RAMOS, O. L., & VICENTE, A. A. (2019). Emergent food proteins—Towards sustainability, health and innovation. *Food Research International*, 125, 108586.

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.

GOWTHAMAN, M. K., KRISHNA, C., & MOO-YOUNG, M. (2001). Fungal solid state fermentation—an overview. *Applied mycology and biotechnology*, 1, 305-352.

GRAJEK, W., & GERVAIS, P. (1987). Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by *Trichoderma viride* TS in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 9(11), 658-662.

GUJRAL, G. S., BISARIA, R., MADAN, M., & VASUDEVAN, P. (1987). Solid state fermentation of *Saccharum munja* residues into food through *Pleurotus* cultivation. *Journal of fermentation technology*, 65(1), 101-105.

GUTTIERI, M. J., PETERSON, K. M., & SOUZA, E. J. (2006). Milling and baking quality of low phytic acid wheat.

HAM, H., WOO, K. S., LEE, B., PARK, J. Y., SIM, E. Y., KIM, B. J., ... & LEE, Y. Y. (2015). Antioxidant compounds and activities of methanolic extracts from oat cultivars. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 44(11), 1660-1665.

HÍDVÉGI, M., & LÁSZTITY, R. (2002). Phytic acid content of cereals and legumes and interaction with proteins. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 46(1-2), 59-64.



HOFFMAN, J. R., & FALVO, M. J. (2004). Protein—which is best?. *Journal of sports science & medicine*, 3(3), 118.

HURRELL, R. F., REDDY, M. B., JUILLERAT, M. A., & COOK, J. D. (2003). Degradation of phytic acid in cereal porridges improves iron absorption by human subjects. *The American journal of clinical nutrition*, 77(5), 1213-1219.

JACOBSEN, S. E., SØRENSEN, M., PEDERSEN, S. M., & WEINER, J. (2013). Feeding the world: genetically modified crops versus agricultural biodiversity. *Agronomy for sustainable development*, 33(4), 651-662.

JANDAİK, C. L., & GOYAL, S. P. (1995). Farm and farming of oyster mushroom (*Pleurotus* sp). *Mushroom Production Technology* (Eds. Singh, RP and Chaube, HS). GB Pant Univ. Agril. And Tech., Pantnagar India, 72-78.

JOSHI, D. C., CHAUDHARI, G. V., SOOD, S., KANT, L., PATTANAYAK, A., ZHANG, K., ... & ZHOU, M. (2019). Revisiting the versatile buckwheat: reinvigorating genetic gains through integrated breeding and genomics approach. *Planta*, 250(3), 783-801.

KANG, M., ZHAI, F. H., LI, X. X., CAO, J. L., & HAN, J. R. (2017). Total phenolic contents and antioxidant properties of buckwheat fermented by three strains of *Agaricus*. *Journal of Cereal Science*, 73, 138-142.

KAW, V., & MABESA, L. B. (1987). Physico-chemical properties of idli batters from rice with varied amylose content. *Phil J Crop Sci*, 12(2), 106-109.

KEREM, Z., FRIESEM, D., & HADAR, Y. (1992). Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and environmental microbiology*, 58(4), 1121-1127.

KOZIOŁ, M. J. (1992). Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of food composition and analysis*, 5(1), 35-68.

KROMHOUT, D., & DE GOEDE, J. (2014). Update on cardiometabolic health effects of  $\omega$ -3 fatty acids. *Current opinion in lipidology*, 25(1), 85-90.

KUMITCH, H. M., STONE, A., NOSWORTHY, M. G., NICKERSON, M. T., HOUSE, J. D., KORBER, D. R., & TANAKA, T. (2019). 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.

LAMOTHE, L. M., SRICHUWONG, S., REUHS, B. L., & HAMAKER, B. R. (2015). Quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) and amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) provide dietary fibres high in pectic substances and xyloglucans. *Food chemistry*, 167, 490-496.

LEE, I. H., HUNG, Y. H., & CHOU, C. C. (2008). Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 150-156.

LI, S., JIN, Z., HU, D., YANG, W., YAN, Y., NIE, X., ... & CHEN, X. (2020). Effect of solid-state fermentation with *Lactobacillus casei* on the nutritional value, isoflavones, phenolic acids and antioxidant activity of whole soybean flour. *LWT*, 125, 109264.

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.



MACHADO, C. M., OISHI, B. O., PANDEY, A., & SOCCOL, C. R. (2004). Kinetics of *Gibberella fujikuroi* growth and gibberellic acid production by solid-state fermentation in a packed-bed column bioreactor. *Biotechnology progress*, 20(5), 1449-1453.

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.

MARCO, M. L., HEENEY, D., BINDA, S., CIFELLI, C. J., COTTER, P. D., FOLIGNÉ, B., ... & HUTKINS, R. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current opinion in biotechnology*, 44, 94-102.

MARTÍNEZ, E. A., JORQUERA-JARAMILLO, C., VEAS, E., & CHIA, E. (2009). El futuro de la quínoa en la región árida de Coquimbo: Lecciones y escenarios a partir de una investigación sobre su biodiversidad en Chile para la acción con agricultores locales.

MASTEBROEK, H. D., LIMBURG, H., GILLES, T., & MARVIN, H. J. P. (2000). Occurrence of sapogenins in leaves and seeds of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(1), 152-156.

MITCHELL, D. A., BEROVIČ, M., NOPHARATANA, M., & KRIEGER, N. (2006). The bioreactor step of SSF: a complex interaction of phenomena. In *Solid-State Fermentation Bioreactors* (pp. 13-32). Springer, Berlin, Heidelberg.

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

MOTTA, C., CASTANHEIRA, I., GONZALES, G. B., DELGADO, I., TORRES, D., SANTOS, M., & MATOS, A. S. (2019). Impact of cooking methods and malting on amino acids content in amaranth, buckwheat and quinoa. *Journal of Food Composition and Analysis*, 76, 58-65.

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.

OOI, T. S., TING, A. S. Y., & SIOW, L. F. (2020). Influence of selected native yeast starter cultures on the antioxidant activities, fermentation index and total soluble solids of Malaysia cocoa beans: A simulation study. *LWT*, 122, 108977.

ORIOLE, E., RAIMBAULT, M., ROUSSOS, S., & VINIEGRA-GONZALES, G. (1988). Water and water activity in the solid-state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 498-503.

PANDEY, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 81-84.

PANDEY, A., ASHAKUMARY, L., SELVAKUMAR, P., & VIJAYALAKSHMI, K. S. (1994). Influence of water activity on growth and activity of *Aspergillus niger* for glycoamylase production in solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10(4), 485-486.

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.

PEREIRA, E., ENCINA-ZELADA, C., BARROS, L., GONZALES-BARRON, U., CADAVEZ, V., & FERREIRA, I. C. (2019). Chemical and nutritional characterization of *Chenopodium quinoa* Willd (quinoa) grains: A good alternative to nutritious food. *Food Chemistry*, 280, 110-114.

RAHARDJO, Y. S., WEBER, F. J., HAEMERS, S., TRAMPER, J., & RINZEMA, A. (2005). Aerial mycelia of *Aspergillus oryzae* accelerate  $\alpha$ -amylase production in a model solid-state fermentation system. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(7), 900-902.

RANHOTRA, G. S., GELROTH, J. A., GLASER, B. K., LORENZ, K. J., & JOHNSON, D. L. (1993). Composition and protein nutritional quality of quinoa. *Cereal chemistry*, 70, 303-303.

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.

RAY, D.K., WEST P. C., , CLARK, M., , GERBER, J. S., , PRISHCHEPOV, A. V., CHATTERJEE, S. (2019). Climate change has likely already affected global food production. *PLoS ONE* 14(5): e0217148.

REPO-CARRASCO, R., ESPINOZA, C., & JACOBSEN, S. E. (2003). Nutritional value and use of the Andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). *Food reviews international*, 19(1-2), 179-189.

REPO-CARRASCO-VALENCIA, R., HELLSTRÖM, J. K., PIHLAVA, J. M., & MATTILA, P. H. (2010). Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Food chemistry*, 120(1), 128-133.

ROBINSON, T., SINGH, D., & NIGAM, P. (2001). Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Applied microbiology and biotechnology*, 55(3), 284-289.

RODRÍGUEZ, J. P., RAHMAN, H., THUSHAR, S., & SINGH, R. K. (2020). Healthy and resilient cereals and pseudo-cereals for marginal agriculture: molecular advances for improving nutrient bioavailability. *Frontiers in genetics*, 11, 49.

SAHARAN, P., SADH, P. K., & DUHAN, J. S. (2017). Comparative assessment of effect of fermentation on phenolics, flavanoids and free radical scavenging activity of commonly used cereals. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 236-240.

SARWAR, M. G. M., & ISLAM, A. (2013). Multi hazard vulnerabilities of the coastal land of Bangladesh. In *Climate change adaptation actions in Bangladesh* (pp. 121-141). Springer, Tokyo.

SCHLEMMER, U., FRØLICH, W., PRIETO, R. M., & GRASES, F. (2009). Phytate in foods and significance for humans: food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Molecular nutrition & food research*, 53(S2), S330-S375.

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.

SHIN, H. Y., KIM, S. M., LEE, J. H., & LIM, S. T. (2019). Solid-state fermentation of black rice bran with *Aspergillus awamori* and *Aspergillus oryzae*: Effects on phenolic acid composition and antioxidant activity of bran extracts. *Food chemistry*, 272, 235-241.



SINGHANIA, R. R., PATEL, A. K., SOCCOL, C. R., & PANDEY, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 13-18.

SMITS, J. P., VAN SONSBEK, H. M., TRAMPER, J., KNOL, W., GEELHOED, W., PEETERS, M., & RINZEMA, A. (1999). Modelling fungal solid-state fermentation: the role of inactivation kinetics. *Bioprocess Engineering*, 20(5), 391-404.

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.

SUÁREZ ARANGO, C. (2010). Obtención in vitro de micelio de hongos comestibles, shiitake (*Lentinula edodes*) y orellanas (*Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*) a partir de aislamientos de cuerpos fructíferos, para la producción de semilla/In vitro micelia isolation of edible mushrooms, shiitake (*Lentinula edodes*) and oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius*) from fruiting bodies, for spawn production. Departamento de Química.

SUBRAMANIAM, 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.

STARZYŃSKA-JANISZEWSKA, A., DULIŃSKI, R., STODOLAK, B., MICKOWSKA, B., & WIKIERA, A. (2016). Prolonged tempe-type fermentation in order to improve bioactive potential and nutritional parameters of quinoa seeds. *Journal of Cereal Science*, 71, 116-121.

TANG, Y., LI, X., CHEN, P. X., ZHANG, B., LIU, R., HERNANDEZ, M., ... & TSAO, R. (2016). Assessing the fatty acid, carotenoid, and tocopherol compositions of amaranth and quinoa seeds grown in Ontario and their overall contribution to nutritional quality. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(5), 1103-1110.

TAPSELL, L. C. (2015). Fermented dairy food and CVD risk. *British Journal of Nutrition*, 113(S2), S131-S135.

THAIPONG, K., BOONPRAKOB, U., CROSBY, K., CISNEROS-ZEVALLOS, L., & BYRNE, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, 19(6-7), 669-675.

THAKUR, P., KUMAR, K., & DHALIWAL, H. S. (2021). Nutritional facts, bio-active components and processing aspects of pseudocereals: A comprehensive review. *Food Bioscience*, 101170.

TORRIERI, E., PERONE, N., CAVELLA, S., & MASI, P. (2010). Modelling the respiration rate of minimally processed broccoli (*Brassica rapa* var. *sylvestris*) for modified atmosphere package design. *International journal of food science & technology*, 45(10), 2186-2193.

ULLAH, F., AYAZ, M., SADIQ, A., HUSSAIN, A., AHMAD, S., IMRAN, M., & ZEB, A. (2016). Phenolic, flavonoid contents, anticholinesterase and antioxidant evaluation of *Iris germanica* var; florentina. *Natural product research*, 30(12), 1440-1444.

VERA, E. P., ALCA, J. J., SARAVIA, G. R., CAMPIONI, N. C., & ALPUY, I. J. (2019). Comparison of the lipid profile and tocopherol content of four Peruvian quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) cultivars ('Amarilla de Maranganí', 'Blanca de Juli', INIA 415 'Roja Pasankalla', INIA 420 'Negra Collana') during germination. *Journal of cereal science*, 88, 132-137.

VOGELMANN, S. A., SEITTER, M., SINGER, U., BRANDT, M. J., & HERTEL, C. (2009). Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. *International journal of food microbiology*, 130(3), 205-212.



WANG, Y., GONG, X., ZHANG, Y., GENG, D. H., CAO, L., RUAN, C., ... & TONG, L. T. (2020). Effect of peeling treatment on the physicochemical properties of quinoa flour. *Journal of Food Process Engineering*, 43(6), e13387.

WU, H., RUI, X., LI, W., XIAO, Y., ZHOU, J., & DONG, M. (2018). Whole-grain oats (*Avena sativa* L.) as a carrier of lactic acid bacteria and a supplement rich in angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides through solid-state fermentation. *Food & function*, 9(4), 2270-2281.

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.

ZHAI, F. H., WANG, Q., & HAN, J. R. (2015). Nutritional components and antioxidant properties of seven kinds of cereals fermented by the basidiomycete *Agaricus blazei*. *Journal of Cereal Science*, 65, 202-208.