



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR
D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



EVALUACIÓN DEL IMPACTO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO CON SACCHAROMYCES CEREVISIAE SOBRE LAS PROPIEDADES NUTRICIONALES Y FUNCIONALES DE LENTEJA PARDINA

MÁSTER EN CIENCIA E INGENIERIA DE LOS ALIMENTOS

Autor: Raúl Bayona Cuallado

Tutora: Ana María Andrés Grau

Cotutor: Andrea Asensio Grau

Director experimental: Janaina Sánchez García

Curso Académico: 2021-2022

València a febrero de 2022

EVALUACIÓN DEL IMPACTO DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO CON SACCHAROMYCES CEREVISIAE SOBRE LAS PROPIEDADES NUTRICIONALES Y FUNCIONALES DE LENTEJA PARDINA.

Raúl Bayona Cuallado, Ana María Andrés Grau, Andrea Asensio Grau, Janaina Sánchez García.

València, febrero de 2022

RESUMEN

La lenteja (*Lens culinaris*) es una de las leguminosas altamente consumidas en el mundo ya que son una fuente rica de proteínas, micronutrientes esenciales y antioxidantes (Khazaei et al., 2019). También hay que destacar, que la producción y consumo de este tipo de cultivo contribuyen a la sostenibilidad ambiental frente a los productos de origen animal que generan mayores emisiones de gases de efecto invernadero. A pesar de tener un perfil nutricional de buena calidad, las lentejas presentan limitaciones por la presencia de factores anti nutricionales como los fitatos, que limitan la digestibilidad y absorción de nutrientes. El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad fermentativa en estado sólido de lenteja pardina utilizando *Saccharomyces cerevisiae* sobre sustrato tanto en grano como harina. Se analizará la cinética de crecimiento de la levadura realizando análisis periódicos de pH, acidez, sólidos solubles, actividad de agua y tasa respiratoria durante el proceso de fermentación. También, se evaluarán las propiedades nutricionales y funcionales después de los diferentes tiempos de fermentación, tales como el contenido de proteína, almidón, anti nutrientes (ácido fítico), compuestos fenólicos y capacidad antioxidante por ABTS, DPPH y FRAP.

Palabras clave: Fermentación; levadura; lenteja; anti nutrientes; poder antioxidante; almidón; proteína vegetal.

RESUM

La llentilla (*Lens culinaris*) és una de les lleguminoses altament consumides en el món ja que són una font rica de proteïnes, micronutrients essencials i antioxidants (Khazaei et al., 2019). També cal destacar, que la producció i consum d'aquest tipus de cultiu contribueixen a la sostenibilitat ambiental en contra dels productes d'origen animal que generen majors emissions de gasos

d'efecte d'hivernacle. Malgrat tindre un perfil nutricional de bona qualitat, les lletilles presenten limitacions per la presència de factors anti nutricionals com l'àcid fític, que limiten la digestibilitat i absorció de nutrients. L'objectiu d'aquest treball és avaluar la capacitat fermentativa en estat sòlid de lletilla pardina utilitzant *Saccharomyces cerevisiae* sobre substrat tant en gra com farina. S'analitzarà la cinètica de creixement del rent realitzant anàlisis periòdiques de pH, acidesa, sòlids solubles, activitat d'aigua, i taxa respiratòria durant el procés de fermentació. També, s'avaluaran les propietats nutricionals i funcionals després dels diferents temps de fermentació, com ara el contingut de proteïna, midó, anti nutrients (àcid fític), compostos fenòlics i capacitat antioxidant per ABTS, DPPH i FRAP.

Paraules clau: Fermentació; rent; lletilla; anti nutrients ; poder antioxidant; midó, proteïna vegetal.

ABSTRACT

Lentil (*Lens culinaris*) is one of the most consumed legumes in the world because they are a rich source of protein, essential micronutrients and antioxidants (Khazaei et al., 2019). It is also worth to add that the production and consumption of this type of cultivation contributes to environmental sustainability in contrast to animal products that generate higher greenhouse gas emissions. In spite of having a good quality nutritional profile, lentils have limitations due to the presence of anti-nutritional factors such as phytic acid, which limit the digestibility and absorption of nutrients. The aim of this work is to evaluate the fermentative capacity in solid state of brown lentil using *Saccharomyces cerevisiae* on both grain and flour substrates. The growth kinetics of the yeast will be analysed by performing periodic analyses of pH, acidity, soluble solids, water activity and respiratory rate during the fermentation process. Also, nutritional and functional properties will be evaluated after the different fermentation times, such as protein content, starch, anti-nutrients (phytic acid), phenolic compounds and antioxidant capacity by ABTS, DPPH and FRAP.

Key words: Fermentation; yeast; lentil; anti-nutrients; antioxidant capacity; starch; vegetal protein.

1. INTRODUCCIÓN.

La lenteja pardina, (*Lens Culinaris*), es una planta de la familia de las Fabaceae y del género *Lens*. Su producción está concentrada entre 2 países, Canadá e India con 2.092 y 1.620 miles de toneladas por año, seguidos de EE. UU. y Turquía con 350.000 toneladas. España ocuparía el puesto número 15 con 42.827 toneladas (Atlasbig, 2014). En cuanto a su consumo, está en 4.900 miles de toneladas al año en todo el mundo y en 23,9 miles de toneladas en España (FAOSTAD, 2014). Por otro lado, el consumo de la lenteja ha ganado interés debido a la necesidad de priorizar la agricultura sostenible y de alimento de alta calidad (Johansson et al. 2014).

La lenteja es un alimento rico en proteína (20,6% a 31,4%) y bajo en grasa (0,7% a 4,3%) (Joehnke, M. S et al., 2020) y rica en carbohidratos de índice glucémico bajo, vitaminas del grupo B, minerales como el calcio, hierro o fósforo y fibra (Gujral et al., 2011, Boye JI et al., 2010). A su consumo se asocian beneficios como el aumento de la actividad antioxidante y prevención del cáncer (Mondor et al., 2009) y la reducción de la diabetes tipo 2, obesidad y ataques al corazón. Esto se debe a que su ingesta reduce los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y aumenta las de alta densidad (HDL) (Rizkalla, S. W et al., 2002).

Pero también hay que tener en cuenta factores negativos como son los alérgenos o los anti nutrientes, entre los cuales están los inhibidores de tripsina, los polifenoles y el ácido fítico (Sharma et al., 1996) Estos actúan interfiriendo con la digestión de las proteínas o creando interacciones covalentes con compuestos, que provocan una reducción de la biodisponibilidad de ciertos nutrientes de interés, reduciendo la biodigestibilidad de los componentes de la lenteja en general (Aryee and Boye, 2017).

Con el fin de reducir estos anti nutrientes se propone la fermentación y concretamente a la fermentación en estado sólido (SST). Esta es una técnica que consiste en la biotransformación de materia orgánica gracias a un determinado microorganismo y a las enzimas tanto del alimento como las excretadas por el propio microorganismo, todo ello con el fin de aumentar la biodisponibilidad y biodigestibilidad de sus componentes (Hotz and Gibson, 2007). Durante la fermentación se reduce el contenido en almidón, ya que se utiliza la glucosa como principal fuente de energía (Nkhata et al., 2019), aumenta la digestibilidad de las proteínas (Ali, El- Tinay, & Abdalla, 2003), debido a que algunos carbohidratos unidos a las proteínas se degradan y las hacen atacables por las enzimas (Sindhu & Khetarpaul, 2001). Por otro lado, el contenido en anti nutrientes se reduce ya sea taninos o ácido fítico, provocando a su vez que minerales como el magnesio, hierro o calcio se encuentren más biodisponibles y su absorción sea mejor al no poder formar enlaces con los anti nutrientes (Pranoto et al., 2013). Factores como el índice glucémico en este caso se ven aumentados debido a la hidrólisis del almidón y a la cantidad de fibra de la lenteja (Ihediohanma, 2011; Ihekoronye & Ngody, 1985).

En cuanto al tipo de fermentación, fermentación en estado sólido (SST) hay que destacar que únicamente se puede emplear en condiciones de baja actividad del agua (a_w), lo que provoca que hongos y levaduras sean los únicos microorganismos capaces de llevarlas a cabo. Se ha elegido esta técnica y no

otra como la fermentación sumergida (SmF), ya que la SST impide en mayor medida la transferencia de materia entre el medio y el sustrato (Ashok Pandey, 2003). La SST presenta otras ventajas como pueden ser el costo, ya que es más barata de implementar, es más rápida y el hecho de no utilizar agua, sumado a la rapidez, provoca que se disminuya la probabilidad de contaminación con otros microorganismos indeseables (Asensio-Grau et al., 2020).

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Materia prima y reactivos.

Para este experimento se ha utilizado lenteja pardina como materia prima, adquirida en la Comunidad Valenciana.

Se utilizó una levadura la cepa *Saccharomyces cerevisiae* CECT 1319 de la Colección Española de cultivo Tipo (Burjassot, Valencia, España). Esta crece a pH entre 4,5 y 6,5 (Suárez-Machín et al., 2016), 26°C, en condiciones aerobias y cuyo uso principal es el de producir etanol (CECT, 2013).

Como reactivos se han utilizado: Un kit de detección de almidón total que contenía α -amilasa termoestable, amiloglucosidasa, tampón reactivo GOPOD, enzimas reactivas GOPOD, solución estándar de D-glucosa y control estandarizado de almidón de maíz. Por otro lado, también se han empleado reactivos tradicionales como hidróxido de sodio (NaOH), etanol (CH₃OH), ácido acético glacial, ácido acético (C₂H₄O₂), cloruro de calcio (ClCa₂), DPPH (C₃₃H₄₄N₅O₆), metanol puro (CH₃CH₂OH), y metanol al 80% (CH₃CH₂OH), ABTS (C₁₈H₂₄N₆S₄), persulfato potásico (K₂S₂O₇), acetato sódico (C₂H₃NaO₂), ácido acético (C₂H₄O₂), TPTZ (C₁₈H₁₂N₆), cloruro de hierro (III) hexahidratado (FeCl₃·6H₂O) y reactivo de Folin Ciocalteu.

2.2 Proceso de Fermentación.

El proceso se abordó principalmente en 5 etapas, preparación del medio de cultivo con levadura, preparación de los botes, inoculación de la levadura, fermentación en estado sólido en incubadora y las determinaciones previamente comentadas. En la figura 1 se puede ver mejor todo el proceso.



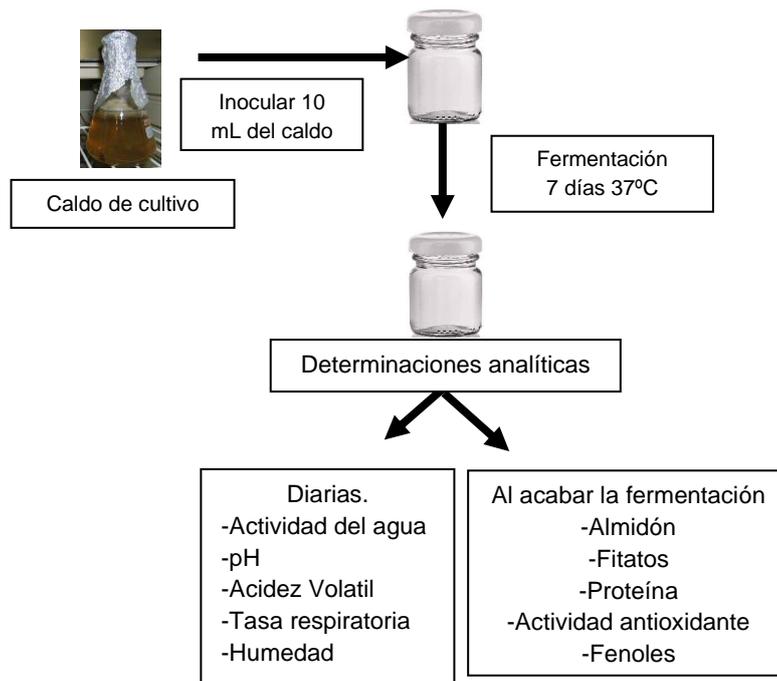


FIGURA 1. Esquema del experimento.

2.2.1 PREPARACIÓN DE LOS BOTES.

Para el experimento se usaron botes de 7,5 cm de altura y 7,6 de diámetro y en el caso del grano y de 7,1 cm de altura y 6,6 cm de diámetro para los botes con harina. Esta diferencia de tamaño es para asegurar el mismo espacio de cabeza, debido a la diferencia de volumen entre harina y grano. Por otro lado, todos los botes tenían un agujero en la tapa con el fin de poder medir la tasa respiratoria día tras día sin abrir los botes, cosa que arruinaría esta medición. El agujero de la tapa se cerró con un esparadrapo para que el aire no saliera del interior.

Para los botes con harina se trituró el grano y se filtró con un tamiz. Se emplearon 33 botes en total y en todos los botes se pesaron 30 gramos de harina y se inocularon 38,27 mL de agua. Por otro lado, para los botes con grano se pesaron 35 gramos de grano de lenteja pardina y se colocaron en la misma cantidad de botes con 45,63 mL de agua. Cabe decir que el volumen de agua es para asegurar la misma humedad en las dos partes del experimento, un 65%.

Los botes se cerraron firmemente y se llevaron a esterilizar durante 20 minutos a 121 grados, con el fin de destruir toda la contaminación inicial posible.

2.2.2 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

Para la preparación del medio, se abrió el líofilo según las indicaciones y se sembró en el medio de cultivo líquido indicado (10 g/L glucosa, 5 g/L mico peptona, 3 g/l extracto de levadura, 3 g/L extracto de malta). Los tubos se incubaron a 28°C durante 48 horas. Una vez crecido en medio líquido se

sembró en masa en agar YPD (Scharlab) (20 g/l peptona bacteriológica, 20 g/l glucosa, 10 g/l extracto levadura, 15 g/l agar) y se incubaron las placas a 28°C durante 24 horas. De estas placas se tomó cultivo con asa de siembra estéril y se preparó una suspensión de esta levadura en 200 mL de caldo YPD, hasta una concentración de 108 ufc/mL. Se confirmó la concentración de dicha suspensión mediante recuento en placa en agar YPD. Para ello se realizaron diluciones decimales seriadas a partir de la suspensión inicial hasta la dilución 10⁻⁷ y se sembró en superficie y por duplicado 0.1 mL de cada tubo en agar YPD. Finalmente se prepararon alícuotas de 10 mL de esta suspensión de *Saccharomyces cerevisiae* en caldo YPD para ser utilizadas en las diferentes inoculaciones.

Este procedimiento de obtención de caldo YPD con levadura a la concentración ajustada de 108 ufc/mL se repitió en cada ocasión que se realizaron inoculaciones en diferentes momentos del ensayo.

2.2.3 INOCULACIÓN CON LEVADURA.

Una vez los botes esterilizados y en una campana de flujo laminar Biostar Telstar®, con el fin de garantizar condiciones de asepsia, se inocularon 10 mL del caldo de cultivo con la levadura como se ha descrito anteriormente en los botes de 6h, 12h, 1 día..., hasta el día 7 y se dejaron 6 botes sin levadura, (los controles), a los que se le añadió 10 mL de agua destilada con la finalidad de tener todos los botes con el mismo volumen.

2.2.4. FERMENTACIÓN.

La fermentación se produjo a una temperatura de 37°C en una estufa durante 7 días, siendo retirados y analizados los botes según el día del ensayo.

2.2.5. DETERMINACIONES ANÁLITICAS.

Para preparar la muestra para el análisis, se machacó el producto fermentado con ayuda de un mortero, para conseguir una muestra totalmente homogénea.

Las determinaciones fueron diarias (pH, acidez titulable, grados brix, actividad del agua y tasa respiratoria) y con el experimento ya finalizado (Actividad antioxidante, proteína, fenoles, fitatos y almidón). Cabe recalcar que los ensayos de fitatos, almidón y proteína, se realizaron con la muestra secada 48 horas en una estufa a 60°C hasta llegar a peso constante.

Estas se realizaron de la misma manera en grano que en harina y por triplicado.

2.2.5.1. pH

Para realizar esta medición, se pesaron 5 gramos del extracto fermentado y se colocaron en un matriz aforado de 50 mL, que se enrasó con agua destilada. Una vez enrasado se pasó a un vaso de precipitado, donde se realizó la lectura de pH con la ayuda de un pH metro (Mettler Toledo Seven Compact).

2.2.5.2. ACIDEZ TITULABLE

Para la acidez titulable, se empleó el mismo pH metro y la muestra utilizada anteriormente para la determinación del pH. Para efectuar el cálculo se realizó una valoración con hidróxido sódico (NaOH) 0,1 M hasta llegar a un pH de 8,2. Con el propósito de obtener el porcentaje de ácido láctico se empleó la ecuación 1, propuesta según el estudio de Rani et al. (2018).

$$\text{Ácido láctico (\%)} = \frac{V_{\text{NaOH}} * m_{\text{ácido}} * V_{\text{final}}}{V_{\text{muestra}} * m_{\text{muestra}} * 1000} * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde: V_{NaOH} es el volumen de NaOH 0,1 M usado en la valoración, $m_{\text{ácido}}$ la peso equivalente del ácido (Mm ácido láctico= 90,08 g/mol), V_{final} el volumen final de la disolución (mL), V_{muestra} el volumen de la muestra (mL) y m_{muestra} su masa utilizada (g). Los otros factores son de conversión de unidades.

2.2.5.3. ACTIVIDAD DEL AGUA

Esta determinación se realizó con la ayuda del equipo AQUA LAB 4TE. Se cubrieron hasta la mitad placas especiales para el equipo con la muestra fermentada y se llevó a cabo la medición.

2.2.5.4. SÓLIDOS SOLUBLES.

En este ensayo, se realizó una disolución con 1 gramo de la muestra triturada y se enrasó en un matraz aforado de 10 mL con agua destilada. Los grados brix se midieron en un refractómetro ATAGOTM Abbe NAR-3T colocando varias gotas de la disolución en el aparato y tomando la medida.

2.2.5.5. TASA RESPIRATORIA.

La tasa respiratoria se obtuvo midiendo los porcentajes de CO_2 y O_2 en el espacio de cabeza con un equipo analizador de gases (Dansensor CheckPoint 3). Para la medición, se despegó el esparadrapo de todos los botes y se introdujo la aguja del medidor de gases por el orificio, obteniendo los valores.

La tasa respiratoria TR se calculó con las ecuaciones 2 y 3.

$$TR_{\text{O}_2} \left(\frac{\text{mL O}_2}{\text{kg} * \text{día}} \right) = \left(\frac{CO_2 t - CO_2(t+1)}{\Delta t} \right) * \left(\frac{V_{\text{aire}}}{m_{\text{sustrato}}} \right) \quad \text{Ecuación 2}$$

$$TR_{\text{CO}_2} \left(\frac{\text{mL } CCO_2}{\text{kg} * \text{día}} \right) = \left(\frac{CCO_2 t - CCO_2(t+1)}{\Delta t} \right) * \left(\frac{V_{\text{aire}}}{m_{\text{sustrato}}} \right) \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde: C_x la concentración de CO_2 o de oxígeno en el tiempo t (mL), $C_{(x+1)}$ la concentración del tiempo $t+1$ (mL) y Δt la diferencia de días entre las dos concentraciones.

Finalmente, se calculó el coeficiente espiratorio realizando el cociente entre el CO_2 y O_2 del espacio de cabeza con la siguiente ecuación.

$$RQ = \frac{[CO_2]_t}{[O_2]_t} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde: $[CO_2]_t$ y $[O_2]_t$ son las concentración de CO_2 y O_2 en el tiempo t.

2.2.5.6. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

La actividad antioxidante se midió con 3 métodos: FRAP ABTS y DPPH. En todos los casos se llevó a cabo una extracción hidrosoluble. Para ello se tomaron 0,5 gramos de muestra con 10 mL de metanol 80% en tubos falcon, se llevaron a agitación durante 2 horas a 55 rpm y posteriormente se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos con el fin de separar el sobrenadante del precipitado y obtener lo que llamaremos extracto metanólico.

Estos métodos se han obtenido del estudio de Thaipoin et al, (2006) y todas las mediciones se llevaron a cabo con un espectrofotómetro modelo Thermo scientific, modelo Helios Zeta UV/Vis.

A) FRAP.

Para ese método se necesitó de una disolución que combinó los siguientes elementos: buffer acetato 300mM ajustado a pH 3,6, que se obtiene al mezclar 1 litro de agua con 3,1 g de acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$) y 16 mL de ácido acético; 10 mM de solución TPTZ ($C_{18}H_{12}N_6$) en 40 mM de ácido clorhídrico (HCl) y cloruro de hierro 20mM ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$). Estos tres elementos se mezclaron en proporción 10:1:1 y fueron calentados a 37°C.

Para la medición de las muestras, en cubetas de 4 mL, se añadieron 2,85 mL de la disolución FRAP con 150 μ L del extracto metanólico (o el buffer de acetato en el caso de los blancos) y se dejó en oscuridad durante 30 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 593 nm.

El cambio de color se dio a cabo tras la reducción de Fe^{3+} del TPTZ a Fe^{2+} por los compuestos antioxidantes.

La expresión de los resultados se realizó una recta patrón con Trolox (0-200 mg/mL), un compuesto análogo a la vitamina E, como patrón y la absorbancia de la muestra. Los resultados se han expresado como mg equivalentes de Trolox por gramo de muestra.

B) DPPH.

En este caso se preparó una disolución de DPPH ($C_{33}H_{44}N_5O_6$) en metanol puro con una concentración de 0,039 mg DPPH/L de metanol. Con el fin de comprobar que estuviera bien ajustada, se midió la absorbancia a 515 nm, teniendo que estar cercano a 1,1. Las muestras se analizaron, añadiendo en cubetas de 4 mL, 2,92 mL de la disolución de DPPH y 75 μ L del extracto metanólico (75 μ L de metanol puro en el caso de los blancos). Para su medición se puso en oscuridad durante 15 minutos y se midió la absorbancia a 515 nm. En esta prueba el principio de cambio de color es el de reducción del DPPH por la creación de un radical H^+ debido a la actuación de los compuestos antioxidantes.

La cuantificación de los resultados se elaboró una recta patrón Trolox como patrón (0-200 mg/mL) y el porcentaje de reducción del DPPH, teniendo en cuenta la absorbancia obtenida. Los resultados se han expresado como mg equivalentes de Trolox por gramo de muestra.

C) ABTS.

En esta determinación, es necesario preparar una disolución 1:1 de ABTS ($C_{18}H_{24}N_6S_4$) 7,4 mM con persulfato potásico (K_2SO_8) 2,6 mM y mantenerla en condiciones de oscuridad durante 12 a 16 horas con el fin de que reaccionen correctamente. Una vez pasado ese tiempo, se añade metanol 80% en proporción 1:1. Para que el experimento sea correcto la absorbancia tiene que estar cercana a 1,1 con una longitud de onda de 734 nm.

Con el fin de medir la absorbancia de las muestras se colocaron 2,85 mL de la disolución ABTS, 75 μ L del extracto metanólico (75 μ L de metanol 80% en el caso de los blancos) y 75 μ L de metanol al 80%. Una vez mezclado, se conservó en oscuridad durante 2 horas y se midió la absorbancia a 734 nm. En el método ABTS lo que provoca el cambio de color es la reducción del radical ABTS por los compuestos antioxidantes.

Para la cuantificación de los resultados, se elaboró una recta patrón con Trolox como patrón (0-200 mg/mL) y el porcentaje de reducción del ABTS, teniendo en cuenta la absorbancia obtenida. Los resultados se han expresado como mg equivalentes de Trolox por gramo de muestra.

2.2.5.7. POLIFENOLES.

La preparación de la muestra es idéntica a la preparación de la muestra en el ensayo de los antioxidantes y el procedimiento está basado en el del reactivo Folin- Cicalteau, del estudio de Chang et al., (2006). Una vez se tiene el extracto metanólico, se añaden 125 μ L del extracto (125 μ L de carbonato de sodio en el caso del blanco), 0,5 mL de agua bidestilada, y 125 μ L de reactivo Folin- Cicalteau, en cubetas de 4 mL y se incubó todo 5 minutos. Una vez pasado ese tiempo se añadieron 1,25 mL de carbonato de sodio y se dejó en reposo y en oscuridad durante 30 minutos, para, finalmente medir la absorbancia a 760 nm.

La expresión de los resultados se llevó a cabo una recta de calibrado, utilizando como ácido gálico (0-200 mg/mL) como patrón. El resultado final se expresó como mg de ácido gálico por g de muestra.

2.2.5.8. FITATOS.

Este ensayo fue obtenido del estudio de Peng et al., (2010). Para la realización del procedimiento se prepararon dos soluciones, una solución ácida de hierro (III) compuesta por 0,2 gramos de sulfato de amonio férrico dodecahidratado ($NH_4Fe(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) en 100 mL de HCl (2 M) y se ajustó 1 L con agua destilada y otra solución de bipyridina con 2'-bipyridina y ácido tioglicólico en proporción 1 g/mL y enrasada a 100 mL con agua destilada.

Para la preparación de la muestra se pesaron 50 mg y se extrajeron con 10 mL de HCl 0,2 N, dejándolo reposar toda la noche en oscuridad a 4°C. Una vez pasado el tiempo se recogieron 0,5 mL de este extracto en tubos de vidrio y se le añadió 1 mL de la solución ácida de hierro (III) a cada tubo y se pusieron en un baño con agua hirviendo durante 30 minutos. Posteriormente tras enfriar a temperatura ambiente, se le añadió 2 mL de la solución de biperidina. Finalmente, nada más añadir la segunda disolución se agitó con un vortex (Heidolph Reax top) y se leyó la absorbancia a 519 nm.

Los resultados se calcularon con una recta de calibrado con el ácido fítico como patrón (0-0,15 mg/mL) respecto a la absorbancia y se expresaron como mg de ácido fítico por gramo de muestra.

2.2.5.9. ALMIDÓN.

La determinación de almidón total se realizó siguiendo el método rapid total starch (RTS) del kit para la cuantificación del almidón total de la marca Megazyme.

En primer lugar, se preparó un tampón acetato 100 mM con cloruro cálcico, para el cual se añadió 5,8 mL de ácido acético glacial a 900 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 5 con hidróxido sódico, una vez ajustado se le adicionó 0,74 g de cloruro cálcico dihidratado para pasar a enrasarlo todo a 1L con agua destilada.

Para efectuar el ensayo, se colocaron 100 mg de la muestra seca por duplicado, (un tubo como blanco de la muestra (sample blank) y otro con la muestra (test sample)) y se añadieron 10 mL de tampón acetato más cloruro de calcio y 0,1 mL de α -amilasa termoestable (en el caso del sample blank 0,1 mL del tampón acetato). A continuación, los tubos se agitaron en un vortex (Heidolph Reax top) y se pusieron en un baño con agua hirviendo, donde a los 2, 5, 10 y 15 minutos los tubos se sacaron del baño y se agitaron en el vortex. Poniéndolos en el baño inmediatamente tras agitar. Una vez pasado ese tiempo se llevaron a otro baño con agua a 50 °C durante 5 minutos. En este punto se adicionaron 0,1 mL de amilogucosidasa (0,1 mL de tampón acetato en el caso del sample blank) y se homogeneizaron los tubos para llevarlos otra vez al baño de 50 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se mezclaron los tubos por inversión durante 10 minutos y de estos tubos se pipetearon 2 mL en tubos de microcentrífuga y se centrifugaron a 13000 rpm 5 minutos. Se tomó 1 mL del sobrenadante y se añadió a unos tubos que contenían 4 mL del tampón acetato.

Finalmente, se realizaron dos alícuotas de cada muestra de 0,1 mL y el sample blank, teniendo 3 tubos por muestra y se añadieron 0,1 mL de tampón acetato. A cada tubo se le añadieron 3 mL de reactivo GOPOD.

A su vez se efectuaron tres controles de glucosa (100 μ g/0,1mL) con 0,1 mL de la solución de glucosa con 3 mL de GOPOD y el reagent blank compuesto 0,1 mL del tampón acetato y 3 mL de GOPOD.

Por último, se incubaron todos los tubos a 50°C durante 20 minutos para medir la absorbancia contra el reagent blank a 510 nm.

Para la expresión de los resultados es necesario recurrir a la ecuación 5.

$$\text{Almidón (\%)} = \Delta A * F * EV * \frac{D}{W} * 0,9 \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde: ΔA es la absorbancia de las muestras respecto al blanco, F el factor de conversión como 100 μg glucosa entre la absorbancia de los controles de glucosa, EV el volumen de extracción de la muestra en mL, D la dilución de la muestra y W el peso de la muestra en mg.

Los resultados se expresaron como variación de almidón en masa (g almidón respecto a 100g de muestra) respecto al tiempo inicial teniendo, mediante la ecuación 6.

$$\Delta \text{Almidón (\%)} = \frac{(m_t * A_t) - (m_0 * A_0)}{m_0} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde: m_t es la masa de la muestra fermentada en el tiempo t (g), A_t es el contenido de almidón en la muestra fermentada a los t días (%), m_0 es la masa de la muestra en el tiempo 0 (g) y A_0 es el contenido de almidón en la muestra al inicio (%).

2.2.5.10. PROTEÍNA TOTAL.

Para el cálculo de la proteína total, se empleó el método LECO, con un test rápido de la marca EZ:faast kits. Los resultados se expresaron como % de proteína por 100 gramos de muestra, multiplicando el valor obtenido por 6,25, un factor de conversión proteína-nitrógeno.

3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Análisis de la materia prima previa a la fermentación.

Antes de realizar el experimento, se analizó la materia prima para comprobar cual eran los valores iniciales previos a la fermentación. Se analizó: humedad, proteína, grasas y cenizas, tanto en grano como en harina. La cantidad de hidratos de carbono se obtuvo mediante balances de materia.

Tabla 1. Valores referentes a la materia prima.

	Grano de lenteja	Harina de lenteja
Agua		
g/100 g de materia prima	9,22 \pm 0,04	8,56 \pm 0,02
Proteína		
g/100 g de materia prima	29,0 \pm 0,4	29,5 \pm 0,3
Grasas		
g/100 g de materia prima	0,78 \pm 0,007	1,09 \pm 0,09
Hidratos de carbono		
g/100 g de materia prima	58,5 \pm 0,6	58,5 \pm 0,5
Cenizas		
g/100 g de materia prima	2,5 \pm 0,08	2,36 \pm 0,05

Estos son los valores de la materia prima, el único valor que presenta una diferencia estadísticamente significativa es el de la humedad, pero ésta se ajustó a un 65% en los botes para fermentar. Otra diferencia entre ambos es la superficie de actuación para la levadura, que es una de las razones por la cual se ha realizado el experimento con grano y harina, con el fin de ver si hay diferencias.

3.2. Actividad del agua

La actividad de agua es un parámetro muy importante en las fermentaciones en estado sólido, ya que es necesario mantener una aw baja para que se produzca la fermentación. Por otro lado, una aw baja evita que se desarrollen otros microorganismos que puedan contaminar la muestra (Soccol et al., 2017).

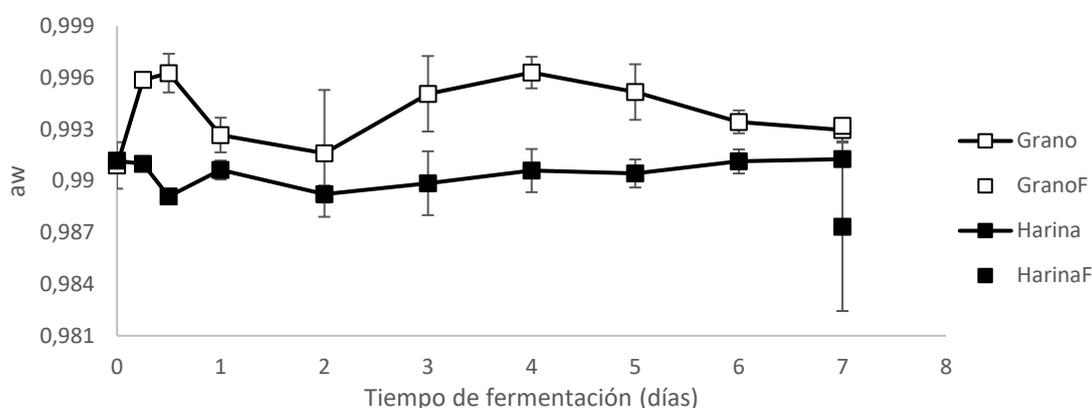


Figura 2. Avance de la aw y la humedad con el paso de los días, con el valor aislado de los controles finales el día 7.

Como se puede ver en la figura 2, tanto la actividad del agua se mantiene bastante estable con el paso de los días, con lo que se puede suponer que este parámetro está controlado y no va a suponer ningún problema en el experimento.

3.3. Cinética de crecimiento de la levadura.

Para comprobar el crecimiento de la levadura y su efecto se empleó la tasa respiratoria y las concentraciones de CO₂ y O₂ con el avance de los días.

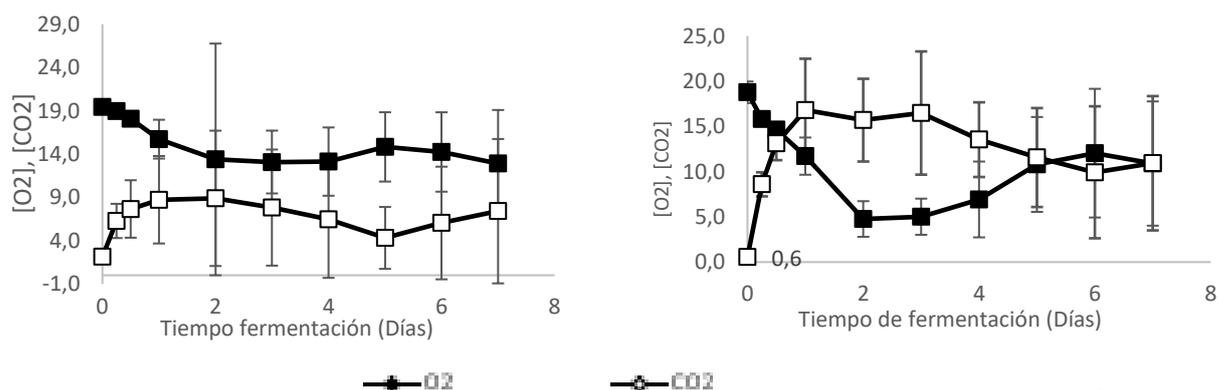


Figura 3. Representación del avance de la cantidad de O₂ y CO₂ en la harina de lenteja (derecha) y el grano (izquierda), respecto a los días de fermentación.

La tasa respiratoria, se midió teniendo en cuenta la cantidad de oxígeno y dióxido de carbono con el avance de los días. Se observó así el poder y el crecimiento de la levadura, ya que su metabolismo funciona tomando oxígeno y expulsando dióxido de carbono. Esta variación de gases puede propiciar que el crecimiento de la levadura y la conversión del sustrato se aleje o acerque a las condiciones óptimas del producto final, por lo que es importante encontrar el día óptimo de fermentación.

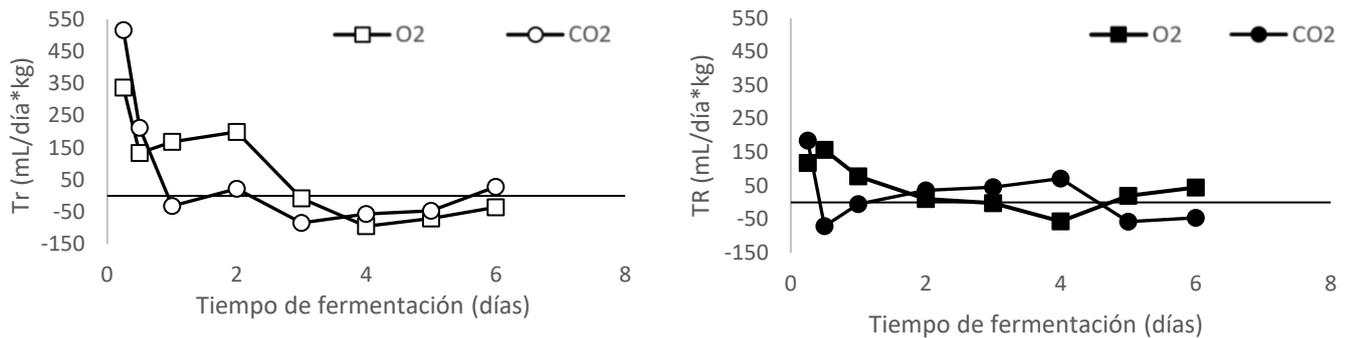


Figura 4. Tasa respiratoria de la harina de lenteja (derecha) y grano de lenteja (izquierda).

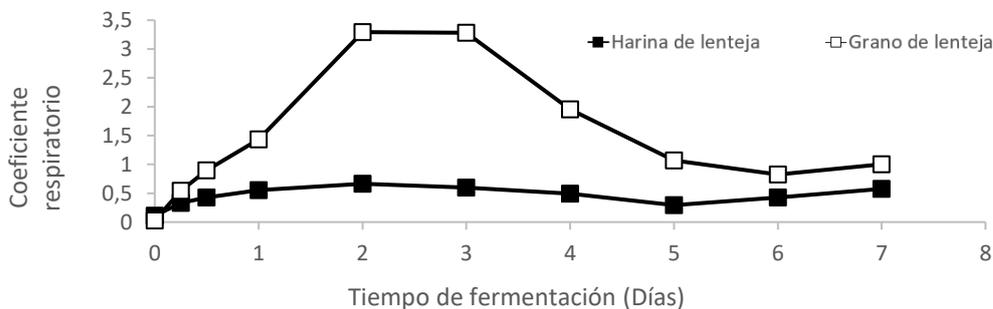


Figura 5. Coeficiente respiratorio (RQ) que mide el cociente entre las concentraciones de CO₂ y O₂, con respecto al avance de los días.

Viendo estos gráficos podemos deducir que la levadura empieza a consumir O₂ y a desprender CO₂ de una manera muy rápida, lo que se presume como la fase exponencial de crecimiento. A partir del día 2 en el caso de la harina y del día 3 en el caso del grano, la concentración de CO₂ empieza a disminuir, lo que sugiere que la levadura está empezando a morir, pero, aunque la levadura este empezando a morir, sus esporas aún pueden poseer poder fermentativo (Manan y Webb, 2021). A partir del día 7 se paró la fermentación, ya que la producción de CO₂ empezó a bajar.

Respecto a las tasas respiratorias, en el caso del grano, tenemos el máximo potencial respiratorio en el primer día, para O₂ y CO₂ mientras que este disminuye rápidamente hasta tener valores inferiores a 0 a partir del día 3. Esto suscita a pensar que la levadura para de fermentar a partir de estos días,

puesto que empiezan a aumentar el % de O₂ y disminuir el de CO₂. Por otro lado, en el caso de la harina se puede ver algo similar con el O₂, ya que el consumo del gas se empieza a ralentizar mientras que el CO₂ se produce muy rápido al principio, pero la tasa respiratoria cae hasta valores negativos y vuelve a seguir subiendo. En este experimento el punto de inflexión es el día 4 ya que las tasas de oxígeno CO₂ disminuyen. Cabe destacar que hay una pequeña subida en todas las tasas en los días 5 y 6.

El coeficiente respiratorio sirve para ver si el proceso se realiza en anaerobiosis o aerobiosis. Si este es inferior a 1 el proceso es aeróbico y si es superior anaeróbico. Como vemos en la figura 5 en la harina de lenteja no se consiguen condiciones de anaerobiosis, con lo que la fermentación no sería del todo exitosa. En el caso del grano de lenteja se puede observar que de los días 1 a 4 se producen condiciones anaerobias, por lo que el momento óptimo para la levadura se situaría en esos días.

Finalmente, se puede deducir que el tiempo útil de fermentación de la levadura es muy corto y por tanto no tendría mucho sentido alargar la fermentación.

3.4. Transformación del hidratos de carbono

Los cambios en el contenido en almidón también puede aportar información de cómo va el crecimiento, ya que la levadura utiliza fibras solubles gracias a la acción enzimática de celulosas y hemicelulosas.

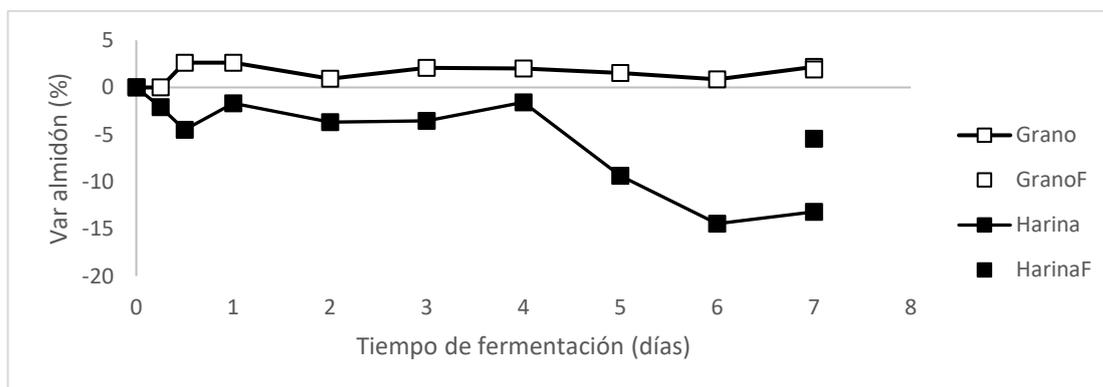


Figura 6. Representación de la variación del % de almidón con el paso de los días, con el valor aislado de los controles finales el día 7.

En el gráfico se puede observar como la cantidad de almidón se mantiene bastante similar e incluso sube un 2% respecto al control inicial en el caso de la lenteja en grano, pero en la harina de lenteja sí que se produce una bajada en toda la fermentación hasta llegar a una disminución de 13,2% en el día 7. Esta diferencia, se puede deber a que al estar el grano de lenteja triturado, el almidón es más accesible a la levadura, puesto que esta más desestructurada que en el grano entero. En ambos casos las muestras con levadura ofrecen una cantidad de almidón menor que en los controles, lo que lleva a pensar que la levadura genera enzimas que ayudan a descomponer el almidón en azúcares.

Con los azúcares simples, también podemos tener una base para averiguar la actuación de la levadura. Durante los procesos fermentativos se usa como

fuerza de la glucosa para obtener ATP y subproductos dependiendo del tipo de fermentación que se produzca, aunque esta bajada puede no ser muy grande ya que a la misma vez el almidón se está descomponiendo por acción de las enzimas.

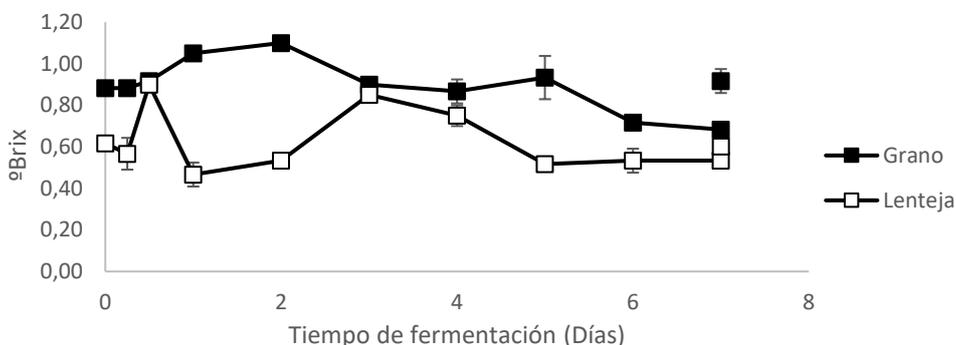


Figura 7. Avance de los grados brix con el paso de los días, con el valor aislado de los controles finales el día 7.

En la figura 7 se observa una gráfica creciente en ambos casos y después empieza a disminuir, comprobando lo que se ha dicho antes sobre el almidón. En un principio al descomponerse el almidón aumenta la cantidad de sólidos solubles, siendo más rápida la subida en el caso de la harina, a que es más accesible por las enzimas. A continuación se produce una bajada ya que estos azúcares se usan para la fermentación, bajando su cantidad.

3.5. Cambios en compuesto bioactivos: Antioxidantes, fitatos y fenoles.

Durante la fermentación se producen una serie de metabolitos secundarios que pueden ofrecer protección frente a agentes oxidantes. Mediante la determinación de la actividad antioxidante se quiere llegar a ver si existe una diferencia significativa entre el producto inicial y el producto fermentado. Este perfil se midió mediante DPPH, FRAP y ABTS, para tener información sobre la reducción de compuestos en diferentes casos. También con los polifenoles totales.

Como se puede ver en las gráficas, en todos los casos la cantidad de compuestos antioxidantes disminuyen o se mantienen muy similares. En el caso del FRAP, en el grano, el valor aumenta durante los primeros días de fermentación pero después disminuye hasta valores inferiores al del tiempo inicial, mientras que en la harina disminuye en más de medio mg el primer día y se mantiene durante los siguientes. Para el DPPH, los valores no fluctúan a penas en ambos casos y se mantienen estables durante la fermentación. Por último en el ABTS, se produce una bajada de casi 1 mg de TE/g de muestra en el día 2, aunque en los días finales crece el valor. Los valores para la harina se mantienen estables.

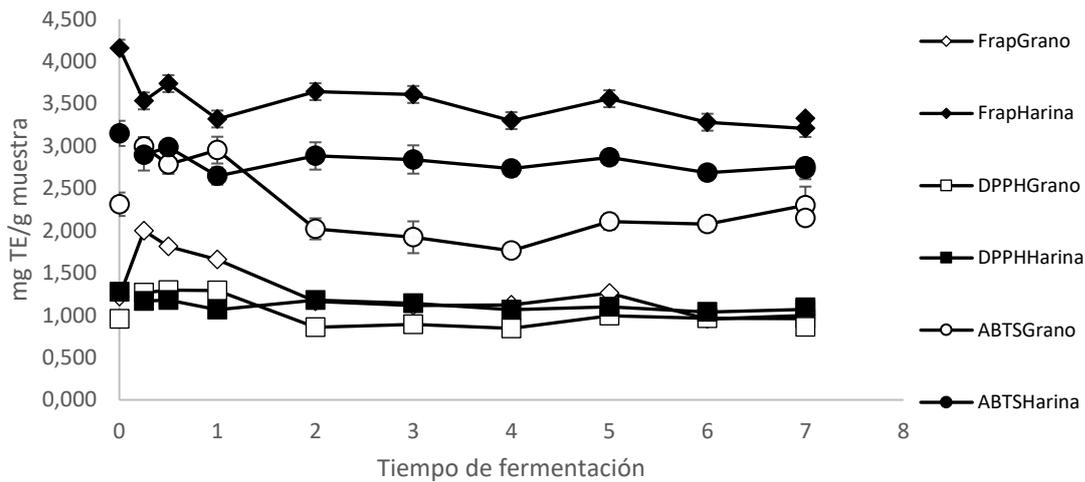


Figura 8. Avance de la cantidad de compuestos antioxidantes con el paso de la fermentación, con los valores aislados de los controles finales el día 7.

El poder antioxidante disminuye, a pesar de que en otros artículos, este aumenta (Alrosan et al., 2021). Esto se puede explicar con que la levadura no es capaz de reducir los radicales libres y en consecuencia no aumenta el poder antioxidante, si no que va disminuyendo con el paso de los días, hasta llegar a valores más bajos en todos los casos, por la degradación o hidrólisis de compuestos fenólicos (Adebo, y Gabriela Medina-Meza, 2020).

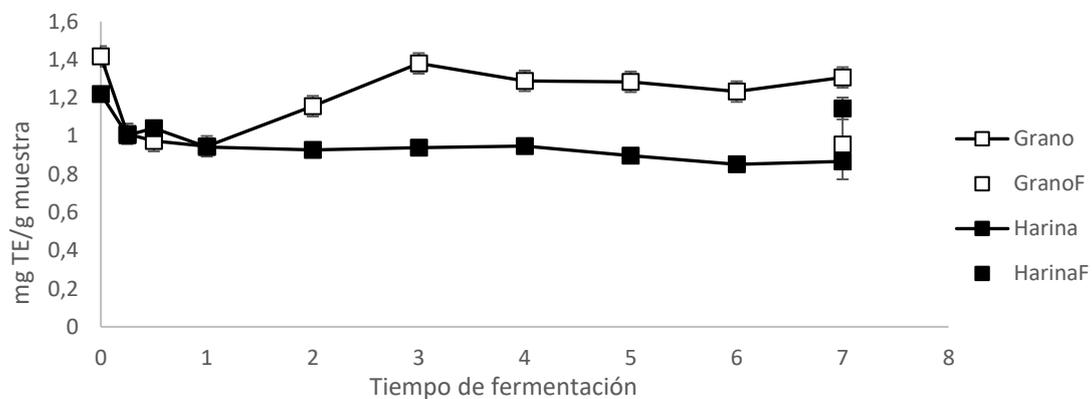


Figura 9. Contenido en fenoles, con el valor aislado de los controles finales el día 7.

Con respecto a los fenoles ocurre algo similar a los antioxidantes. En el caso del grano, se produce una fuerte bajada al principio, pero después aumenta hasta mantenerse en valores similares a los iniciales. Para la harina, en las primeras horas se da una disminución en la cantidad de compuestos fenólicos que se mantiene a lo largo de la fermentación, lo que indica que la levadura no ha sido capaz de producir dichos compuestos, debido a que no es eficaz en las características del medio propuesto como pH o temperatura.

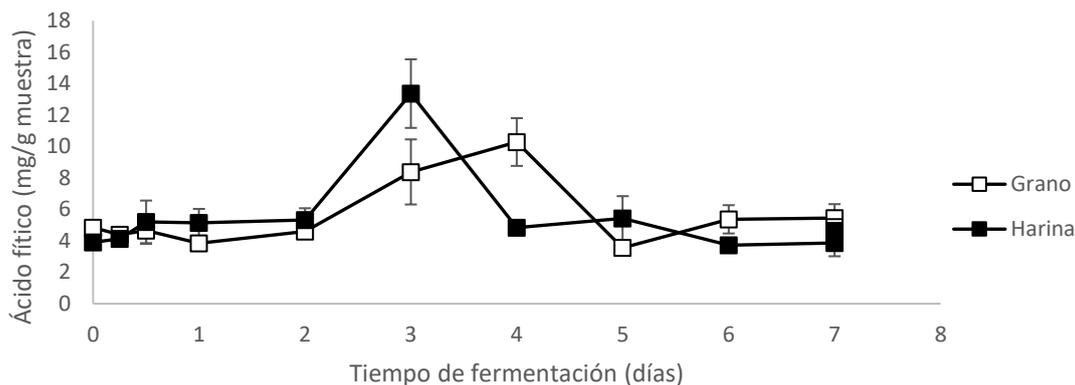


Figura 10. Contenido en fitatos, con el valor aislado de los controles finales el día 7.

La cantidad de fitatos tiene la misma función en ambos casos, se mantiene estable y luego aumenta rápidamente para después volver a decrecer y a mantenerse en valores cercanos a los iniciales en ambos casos. De esta gráfica se puede deducir que la cantidad de ácido fítico no disminuye y que los días 3 y 4 son los peores días para finalizar el experimento, ya que es cuando la cantidad de ácido fítico está más alta y cuando presumiblemente el producto tendría una peor digestibilidad.

3.6. Acidez titulable y pH.

La acidez titulable y el pH son parámetros que también nos ofrecen información sobre el experimento. Estos son útiles para comprobar que el medio es óptimo para la levadura, es decir, ente 4,5 y 6,5 (Suárez-Machín et al., 2016). Al mismo tiempo, el crecimiento de bacterias indeseadas también se puede detectar, ya que al producirse más ácido láctico, aumenta la acidez titulable y disminuye el pH.

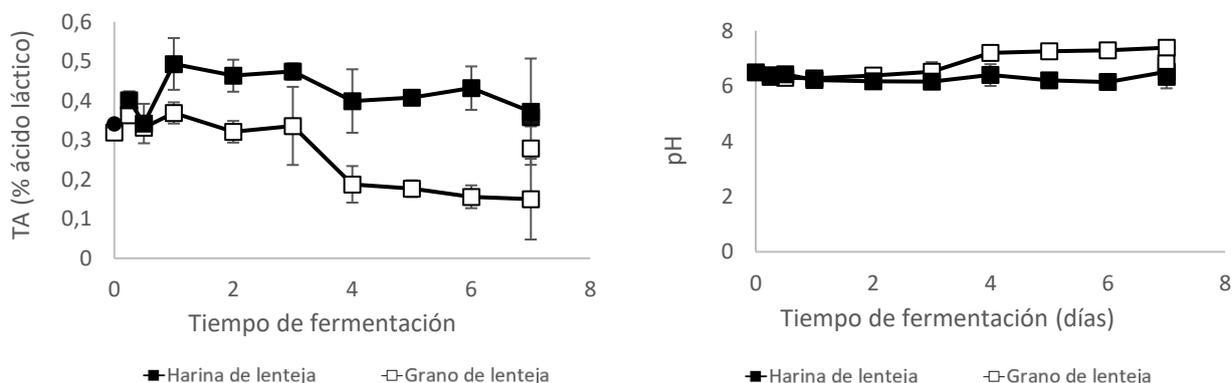


Figura 11. Acidez titulable y pH con el paso de los días durante la fermentación, con el valor aislado de los controles finales el día 7.

En la figura 11 se ve la misma tendencia en harina y en grano. Entre los días 3 y 4 se ve una disminución de la acidez titulable con el consecuente

aumento del pH. En el caso del grano esta subida se desplaza hasta valores de 7,38, con lo que la levadura no estaría en valores óptimos, cosa que podría haber afectado a la fermentación. Esta subida de pH se puede deber a la creación de aminas (Manpreet S et al., 2005).

3.7. Cantidad de proteína.

Para hallar la cantidad de proteína se halló la cantidad de nitrógeno por el método LECO, como se ha comentado anteriormente.

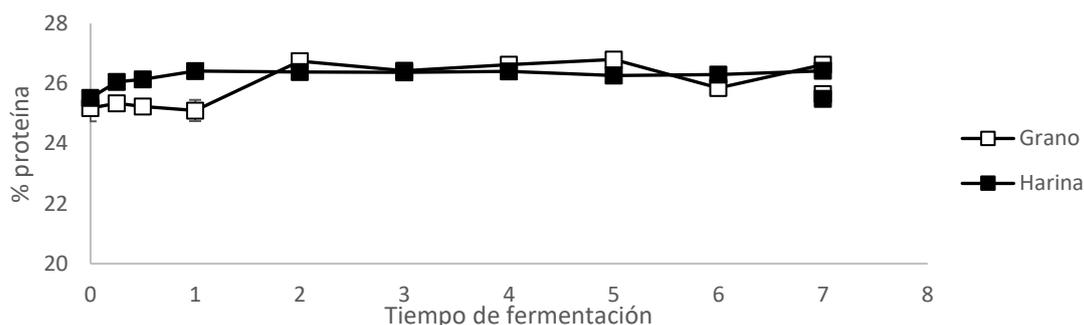


Figura 12. Contenido proteico, con el valor aislado de los controles finales el día 7.

En el contenido proteico sí que hay un crecimiento respecto al control inicial en ambos casos, habiendo una subida de 1,5 % en el caso del grano y un 0,9% para la harina. Por otro lado, existen diferencias significativas entre los dos controles finales y el día 7 de fermentación, lo que indica que la fermentación eleva el contenido proteico.

4. CONCLUSIONES.

Tras toda la realización del experimento, no se puede llegar a una conclusión clara sobre qué día es el óptimo para parar la fermentación. El día 3, se da una bajada en las tasas respiratorias de todos los casos menos la del CO₂ en la harina y en el día 4 se produce una subida del pH que hace que se desplace del óptimo y muy probablemente haya afectado a la fermentación, así como una bajada en la acidez titulable.

Respecto a los demás datos, la actividad antioxidante y los fenoles disminuyen respecto al tiempo inicial, mientras que la cantidad de ácido fítico se mantiene estable salvo el día 3 en harina y los días 3 y 4 en el grano, lo que indica que estos días no serían buenos para parar la fermentación. La actividad del agua y la humedad no ofrecen cambios con el paso de los días y son parámetros que están bajo control. La cantidad de hidratos de carbono y de azúcares libres ofrece diferentes datos, en el caso de la harina, se produce una bajada de 13,2% del almidón respecto al tiempo inicial y en el grano se da una subida de un 2%, lo que nos indica que el tamaño de la partícula sí que es algo destacable a la hora de fermentar la lenteja. El contenido proteico es otro dato

de interés, ya que este aumenta en ambos casos y habría que realizar digestiones con la materia fermentada para comprobar si la digestibilidad de esta también aumenta, ya que esta era uno de los objetivos de la fermentación.

Como conclusión final, tras ver los resultados obtenidos, sería necesario repetir el experimento para comprobar si estos son debidos al comportamiento de la levadura o por algún factor que no estaba correctamente bajo control.

BIBLIOGRAFÍA

Adebo, O.A.; Gabriela Medina-Meza, I. Impact of Fermentation on the Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Whole Cereal Grains: A Mini Review. *Molecules* **2020**, *25*, 927.

Alrosan, M., Tan, T., Mat Easa, A., Gammoh, S., & Alu'datt, M. (2021). Effects of Fermentation on the Quality, Structure, and Nonnutritive Contents of Lentil (*Lens culinaris*) Proteins. *Journal Of Food Quality*, *2021*, 1-7.

Asensio-Grau, A.; Calvo-Lerma, J.; Heredia Gutiérrez, AB.; Andrés Grau, AM. (2020). Enhancing the nutritional profile and digestibility of lentil flour by solid state fermentation with *Pleurotus ostreatus*. *Food & Function*. *11*(9):7905-7912.

Ashok Pandey, Solid-state fermentation (2003), *Biochemical Engineering Journal*, Volume 13, Issues 2–3, Pages 81-84, ISSN 1369-703X,

AtlasBig. Producción de lentejas por país. (2021). AtlasBig. Recuperado 2 de noviembre de 2021. Disponible en: <https://www.atlasbig.com/es-es/paises-por-produccion-de-lentejas>

Aryee, A.N. and Boye, J.I. (2017), Comparative Study of the Effects of Processing on the Nutritional, Physicochemical and Functional Properties of Lentil. *Journal of Food Processing and Preservation*, *41*: e12824.

Boye JI, Aksay S, Roufik S, et al. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques *Food Research International* (Ottawa, Ont.). 2010 Mar;*43*(2):537-546. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.07.021.

Carbonaro, M., Nardini, M., Maselli, P. *et al.* Chemico-physical and nutritional properties of traditional legumes (lentil, *Lens culinaris* L., and grass pea, *Lathyrus sativus* L.) from organic agriculture: an explorative study. *Org. Agr.* **5**, 179–187 (2015).

CECT. *Saccharomyces cerevisiae*. (2013). Recuperado 12 de enero de 2022, de <https://www.cect.org/vstrn.php?lan=es&cect=1319>

Gujral, Hardeep & Angurala, Mamta & Sharma, Paras & Singh, Jaspreet. (2011). Phenolic Content and Antioxidant Activity of Germinated and Cooked Pulses. *International Journal of Food Properties*. *14*. 1366-1374. 10.1080/10942911003672167.

Hotz, C., & Gibson, R. S. (2007). Traditional food- processing and preparation practices to enhance the bioavailability of micronutrients in plants-based diets. *Journal of Nutrition*, *137*, 1097–1100.

ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar [en línea]. 2016, *50*(1), 20-28 [fecha de Consulta 13 de Enero de 2022]. ISSN: 0138-6204. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223148420004>

Joehnke, M. S., Jeske, S., Ispiryan, L., Zannini, E., Arendt, E. K., Bez, J., Sørensen, J. C., & Petersen, I. L. (2021). Nutritional and anti-nutritional properties of lentil (*Lens culinaris*) protein isolates prepared by pilot-scale processing. *Food chemistry: X*, *9*, 100112.

Johansson E, Hussain A, Kuktaite R, Andersson SC, Olsson ME (2014) Contribution of organically grown crops to human health. *Int J Environ Res Pub Health* 11:3870–3893

Machín, Caridad & Antonio, Norge & Carralero, Garrido & Amarilys, C & Rodríguez, Guevara. (2016). LEVADURA SACCHAROMYCES CEREVISIAE Y LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL. Revisión bibliográfica. YEAST SACCHAROMYCES CEREVISIAE AND THE PRODUCTION OF ALCOHOL. A Review. *Revista ICIDCA*. 50. 20-29.

Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S. and Banerjee, U.C. (2005) Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation *Malaysian Journal of Microbiology*, Vol 1(2) 2005, pp. 1-9.

Mondor, M., Aksay, S., Drolet, H., Roufik, S., Farnworth, E.R., et Boye, J.I. (2009). « Influence of processing on composition and antinutritional factors of chickpea protein concentrates produced by isoelectric precipitation and ultrafiltration. », *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(3), p. 342-347.

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.

Pranoto, Y., Anggrahini, S., & Efendi, Z. (2013). Effect of natural and *Lactobacillus plantarum* fermentation on invitro protein and starch digestibilities of sorghum flours. *Food Bioscience*, 2, 46–52.

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.

Rizkalla, S. W., Bellisle, F., & Slama, G. (2002). Health benefits of low glycaemic index foods, such as pulses, in diabetic patients and healthy individuals. *British Journal of Nutrition*, 88 (Suppl 3), S255–S262.

Sharma, A., Jood, S. and Sehgal, S. (1996). Antinutrients (phytic acid, polyphenols) and minerals (Ca, Fe) availability (*in vitro*) of chickpea and lentil cultivars. *Nahrung*, 40: 182-184.

Sindhu, S., & Khetarpaul, N. (2001). Probiotic fermentation of indigenous Food mixture: Effect on anti-nutrients and digestibility of starch and protein. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 601–609.

Soccol, C.R., Scopel, E., Junior Letti, L. A., Grace, S., Woiciechowski, A., Souza Vandenberghe, L.P. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation, *Biotechnology Research and Innovation*, Volume 1, Issue 1, 2017, Pages 52-71, ISSN 2452-0721

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